



HAL
open science

Valorisation des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de Tunisie en tant que nouvelles substances antileishmaniennes

Zeineb Maaroufi

► **To cite this version:**

Zeineb Maaroufi. Valorisation des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de Tunisie en tant que nouvelles substances antileishmaniennes. Parasitologie. Université Paris-Saclay; Université de Carthage (Tunisie), 2020. Français. NNT : 2020UPASQ012 . tel-03917115

HAL Id: tel-03917115

<https://theses.hal.science/tel-03917115>

Submitted on 1 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Valorisation des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de Tunisie en tant que nouvelles substances antileishmaniennes

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Pharmacotechnie et biopharmacie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296,
Châtenay-Malabry, France.
Réfèrent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 06
novembre 2020, par

Zeineb MAAROUFI

Composition du Jury

Philippe LOISEAU Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Nabiha BOUZOUITA Professeure, Université Tunis El Manar	Rapporteur & Examinatrice
Philippe LEGRAND Professeur, Université de Montpellier	Rapporteur & Examinateur
Balkiss BOUHAOUALA ZAHAR Professeure, Université Tunis El Manar	Examinatrice
François-Hugues POREE Professeur, Université de Rennes 1	Examinateur
Florence AGNELY Professeure, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse
Manef ABDERRABBA Professeur, Université de Carthage	Co-Directeur de thèse
Ghozlène MEKHLLOUFI Maître de conférences, Université Paris-Saclay	Co-Encadrante de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été rendu possible grâce à l'implication, le conseil et le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, l'ouverture d'esprit et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis d'apprendre et de progresser énormément tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

J'adresserai remerciements et gratitude,

Au Professeur ***Elias Fattal*** pour m'avoir fait confiance et accepté de m'accueillir au sein de ses équipes à l'Institut Galien Paris-Sud.

Au Professeur ***Florence Agnely***, ma directrice de thèse et responsable de l'Equipe Physique Pharmaceutique (de l'Institut Galien Paris-Sud), pour son accompagnement, sa patience, ses conseils et ses suggestions pertinentes. Je tiens à la remercier pour sa grande disponibilité malgré ses longues journées. Travailler avec toi m'a énormément appris.

Au Professeur ***Manef Abderrabba***, mon directeur de thèse et responsable du Laboratoire Matériaux Molécules et Applications (IPEST, La Marsa, Tunisie) pour m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire, pour son écoute, pour ses conseils précieux et son soutien durant cette thèse.

Au Docteur ***Ghozlene Mekhloufi***, ma co-encadrante de thèse, pour son implication et son soutien au quotidien tout au long de cette thèse. Je tiens à te féliciter pour ton expertise et ton savoir-faire qui ont beaucoup contribué à la réussite de ce travail. Je te remercie pour ta patience, ton accompagnement et ton soutien sans faille, dans les moments les plus difficiles. J'ai été enchantée de partager ton bureau pendant ces années !

Au Professeur ***Philippe Loiseau***, pour m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire « Chimiothérapie antiparasitaire » (UMR 8076), pour m'avoir accordé sa confiance et impliqué dans son équipe. Je te remercie pour tes conseils et ta bienveillance.

A Docteur ***Sandrine Cojean***, pour m'avoir accompagné pour l'élaboration des tests de l'activité antileishmanienne, pour ta disponibilité et ton sérieux.

A ***Indira Dennemont***, la technicienne biologiste à UMR 8076, pour ton assistance et ton accompagnement tout au long de mes manip. Merci pour ton dévouement, et pour tout le temps que tu m'as consacré malgré ta charge de travail.

A **Catherine Cailleaux**, responsable de l'expérimentation animale à l'UMR 8612, pour son aide précieuse tout au long des manip *in vivo*. Merci surtout de m'avoir réconcilié avec les souris !

Au Docteur **Vincent Faivre**, de m'avoir formé à l'appareil de l'homogénéisateur haute pression, pour son assistance pour la préparation des nanoémulsions.

Au Docteur **Nicolas Huang** pour m'avoir formé et assisté à la plateforme de rhéologie.

Aux membres du labo LMMA en Tunisie, passés et présents : **Maroua, Imene, Marwa, Nesrine, Youssef, Salma...** pour les liens d'amitié sincères qui nous unissent et qui ont fait de ces années une belle aventure.

Aux membres de l'équipe 3, passés et présents : **Claire, Clémence, Sandrine, Bertrand et Nour Eddine**, pour votre sympathie, pour votre bonne humeur quotidienne et pour nos liens si humains.

A mes collègues de bureau : **Amine, Baptiste, Thomas, Céline, Candice et Fanny**, pour la joie et la bonne humeur que vous m'avez apportées au quotidien, pour nos éclats de rire, nos « sushi du mois », sans oublier nos séances karaoké. Merci pour votre soutien dans les meilleurs moments, comme dans les pires.

Je dédie cette thèse

A mon défunt père, **Mohamed Raies Maaroufi**, qui a tant attendu l'accomplissement de ce travail. Celui qui m'a toujours poussé à aller de l'avant ...

A ma mère, **Ahlem Ben Slama** ... Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tout l'amour et la force que tu m'apportes au quotidien.

A mon mari, **Escandar Ellafi**, mon amoureux, mon meilleur ami et mon confident... Tu as toujours été à mes côtés pour m'épauler. Merci pour ton amour et ton soutien inconditionnels !

A ma sœur, **Azza Maaroufi**, ma moitié, pour toute la complicité qui nous unit. Que ce travail témoigne de mon amour et ma gratitude.

A mon neveu, **Elyes Loukil**, pour l'espoir que tu as fait renaître ... Tu es le rayon de soleil qui est venu égayer ma vie.

Sommaire

Liste des abréviations et des principaux symboles.....	11
Introduction générale.....	13
Chapitre 1 : Revue bibliographique	19
Section I. Présentation générale de la leishmaniose.....	20
I.1. Les leishmanioses	20
I.1.1. Les protagonistes de la maladie	20
I.1.2. Le cycle biologique des parasites	22
I.2. Formes existantes.....	23
I.2.1. La leishmaniose viscérale	23
I.2.2. La leishmaniose cutanée	24
I.2.3. La leishmaniose muco-cutanée	24
I.3. Coinfection VIH/ <i>Leishmania</i>	25
I.4. Conclusion	25
Section II. La leishmaniose cutanée et ses traitements	26
II.1. La leishmaniose cutanée	26
II.1.1. Etiologie.....	26
II.1.2. Epidémiologie : incidence et répartition géographique	26
II.1.3. Description clinique de la LC.....	29
II.1.4. Facteurs de risque	30
II.1.5. Diagnostic	30
II.2. Les différents traitements possibles des LC et leurs évolutions pour une meilleure efficacité	32
II.2.1. Quand traiter la leishmaniose cutanée ?	33
II.2.2. Les options de traitements « non-médicamenteux ».....	35
II.2.3. La chimiothérapie	36
II.2.4. Les nouveaux axes de recherche	49
II.3. Conclusion	51
Section III. Approche alternative pour le traitement de la leishmaniose cutanée : la phytothérapie.....	52
III.1. La phytothérapie.....	52
III.2. La pratiques de la médecine traditionnelle pour traiter la leishmaniose cutanée	53
III.2.1. Habitudes et croyances des populations pour traiter les lésions de leishmaniose cutanée.....	53
III.2.2. Voie d'administration.....	53
III.2.3. Parties utilisées des plantes	54
III.2.4. Préparations réalisées à partir de plantes.....	54
III.2.5. Quelques plantes utilisées en usage traditionnel pour le traitement des LC	54

III.3. La phytothérapie : un traitement alternatif pour la leishmaniose cutanée.....	55
III.3.1. Quelques exemples de familles de molécules bioactives.....	56
III.3.2. Plantes étudiées pour le traitement de la leishmaniose cutanée due à <i>Leishmania major</i>	61
III.3.3. Conclusion.....	63
Section IV. Les plantes sélectionnées pour notre projet et leur potentiel antileishmanien	65
IV.1. <i>Artemisia Herba-alba</i>	65
IV.1.1. Description botanique	65
IV.1.2. Classification systématique de la plante	66
IV.1.3. Utilisation traditionnelle	66
IV.1.4. <i>Artemisia herba-alba</i> et leishmaniose.....	67
IV.2. <i>Pistacia lentiscus</i>	68
IV.2.1. Description botanique	68
IV.2.2. Classification systématique de la plante	69
IV.2.3. Utilisation traditionnelle	69
IV.2.4. <i>Pistacia lentiscus</i> et leishmaniose.....	70
IV.3. <i>Citrus limon</i>	72
IV.3.1. Description botanique	72
IV.3.2. Classification systématique de la plante	73
IV.3.3. Utilisation traditionnelle	73
IV.3.4. <i>Citrus limon</i> et leishmaniose.....	74
IV.4. Conclusion.....	76
Chapitre 2 : Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antileishmanienne des huiles essentielles et des extraits de différentes plantes	94
Section I. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antileishmanienne des huiles essentielles des différentes plantes	95
I.1. Récolte et préparation du matériel végétal.....	95
I.2. Technique d'extraction : l'hydrodistillation.....	95
I.3. Publication 1: <i>In vitro</i> antileishmanial efficacy of essential oils from selected Tunisian plants	96
PUBLICATION 1	97
1. Introduction	98
2. Materials and methods	101
2.1. Chemicals and Reagents.....	101
2.2. Selection and collection of plant materials	101
2.3. Essential oils extraction by hydrodistillation	101
2.4. Antioxidant activity	101
2.5. Characterization of essential oils.....	103
2.6. Antileishmanial activity	104

2.7. Statistical analysis	105
3. Results and discussion.....	105
3.1. Extraction yields.....	105
3.2. Chemical composition.....	106
3.3. Phenolic compounds and antioxidant activity of essential oils.....	112
3.4. Antileishmanial activity in axenic amastigotes and intramacrophage amastigotes, and cytotoxicity	114
4. Conclusion.....	120
Declaration of Interest.....	120
Acknowledgements	120
Section II. Caractérisation des extraits organiques des différentes plantes et évaluation <i>in vitro</i> de leur activité antileishmanienne	130
II.1. Matériels et méthodes	130
II.1.1. Technique d'extraction : la macération à froid.....	130
II.1.2. Techniques de caractérisation : Micro-extraction en phase solide	131
II.1.3. Activité antioxydante.....	132
II.1.4. Dosage des familles chimiques.....	132
II.1.5. Activité antileishmanienne et cytotoxicité	133
II.1.6. Analyse statistique	134
II.2. Résultats et discussion :.....	134
II.2.1. Rendements d'extraction par macération à froid.....	134
II.2.2. Armoise herbe-blanche	136
II.2.3. Pistachier lentisque	142
II.2.4. Citronnier.....	147
II.3. Conclusion	153
Section III. Choix de l'extrait à encapsuler et sa caractérisation par SPME/GC-MS	154
Conclusion.....	158
Chapitre 3 : Formulation de nanoémulsions encapsulant l'extrait : stabilité physicochimique et activité antileishmanienne.....	164
I. Contexte bibliographique.....	165
I.1 Généralités sur les nanoémulsions	165
I.2. Intérêt pharmaceutique des nanoémulsions en tant que vecteur antileishmanien pour la voie topique.....	165
I.3. Procédés d'obtention des nanoémulsions	168
I.4. Mécanismes de déstabilisations des nanoémulsions	169
I.5. Stabilisation des nanoémulsions	172
I.6. Conclusion	177
II. Matériel et méthodes.....	177
II.1. Matériel.....	177

II.2. Préparation d'une nanoémulsion avec ou sans extrait.....	177
II.3. Caractérisation des nanoémulsions.....	179
II.4. Evaluation de l'activité antileishmanienne et cytotoxicité des nanoémulsions..	181
II.5. Evaluation de la stabilité des nanoémulsions dans le milieu de culture biologique	183
II.6. Analyses statistiques des données	183
III. Résultats et discussion.....	183
III.1. Etude préliminaire de formulation des NEs	183
III.2. Caractérisation physico-chimique des nanoémulsions.....	184
III.3. Stabilité des nanoémulsions préparées dans le milieu de culture.....	190
III.4. Activité antileishmanienne et cytotoxicité des différents systèmes	193
IV. Conclusion.....	197
Chapitre 4 : Evaluation de l'efficacité antileishmanienne des nanoémulsions encapsulant l'extrait sur le modèle expérimental de leishmaniose cutanée à <i>L. major</i>	204
Introduction – Résumé	204
PUBLICATION 2	206
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> efficacy of <i>Citrus limon</i> extract loaded nanoemulsions for the topical treatment of <i>L. major</i> infected BALB/c mice	206
1. Introduction	207
2. Materials and methods.....	209
2.1. Materials.....	209
2.2. Preparation and characterization of nanoemulsions with or without <i>Citrus</i> extract	210
2.3. <i>In vitro</i> evaluation of the effect of nanoemulsions with and without <i>Citrus limon</i> extract on <i>L. major</i> intramacrophage amastigote form	211
2.4. <i>In vivo</i> evaluation of <i>Citrus limon</i> extract loaded nanoemulsions effect in <i>L. major</i> infected BALB/c mice.....	213
2.5. Statistical analysis	215
3. Results and discussion.....	216
3.1. Nanoemulsions characterization.....	216
3.2. <i>In vitro</i> evaluation of the effect of nanoemulsions with and without <i>Citrus limon</i> extract in <i>L. major</i> intramacrophage amastigote form	218
3.3. <i>In vivo</i> evaluation of <i>Citrus limon</i> extract nanoemulsions in <i>L. major</i> infected mice	222
3.4. Histopathology analysis of skin sections	231
4. Conclusion.....	235
Conclusion.....	241
Conclusions et perspectives	242
ANNEXE	252
3. Introduction	253
4. Choix des différents paramètres de l'étude	253

2.1. Cahier des charges.....	253
2.2. Choix des facteurs et réponses à étudier	254
2.3. Analyse statistique.....	255
5. Résultats	255
3.1. La significativité des facteurs sur les différentes réponses	256
3.2. Exemple de surfaces d'iso réponse	257
6. Conclusion.....	258

Liste des abréviations et des principaux symboles

ABTS	2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate	LC	Leishmaniose cutanée
AcOEt	Acétate d'éthyle	LV	Leishmaniose viscérale
Armoise	Armoise herbe-blanche	MCT	Medium chain triglycerids
β-lg	β -lactoglobuline	mEC	mg équivalent de catéchine
DLS	Dynamic light scattering	mEGA	mg équivalent d'acide gallique
DMEM	Dulbecco's modified eagles' medium	mEQ	mg équivalent de quercétine
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	NE	Nanoémulsion
EtOH	Ethanol	NFOH	Hydroxy méthyl nitro furazone
Extrait	Extrait organique ou aqueux	NO\cdot	Radical N-oxyde
FDA	Food and Drug Administration	O	Oil
Γ	Tension interfaciale	OMS/WHO	Organisation mondiale de la Santé
H/E	Huile-dans-eau	PB	Tampon potassium phosphate
HE	Huile essentielle	PCR	Polymerase chain reaction
HePC	Hexadécylphosphocholine	PDI	Polydispersity index
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique	PDMS	Poly (di-méthyl siloxane)
HHP	Homogénéisation haute pression	pI	Point isoélectrique
SO	Huile de Sésame	Pistachier	Pistachier lentisque
IC₅₀	Concentration d'inhibition à 50%	PLA	Poly (lactic acid)
IFN-γ	Interféron gamma	RPMI	Roswell park memorial institute medium
IL	Intralésionnel	Sb^{III}	Antimoine trivalent
IM	Intramusculaire	Sb^V	Antimoine pentavalent
IV	Intraveineux	SI	Selectivity index
SPME	Solid phase micro-extraction	W	Water
SVF/FVS	Sérum de veau foetal	XG	Xanthan gum
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale		
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine		

Introduction générale

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires ré-émergentes, dues à des protozoaires flagellés appelés *leishmania* et transmises par la piqûre de la femelle hématophage du genre phlébotome [1]. Il existe plus de 20 espèces de *leishmania* responsables de l'apparition de 3 formes cliniques différentes : la leishmaniose viscérale, la leishmaniose cutanée et la leishmaniose muco-cutanée. L'organisation mondiale de la Santé (OMS) a identifié les leishmanioses comme un problème de santé publique et les a classées parmi les maladies les plus négligées [2].

La leishmaniose cutanée (LC) représente la forme la plus répandue avec une incidence annuelle pouvant atteindre 1 million de nouveaux cas, répartis sur 85 pays à travers le monde [3]. Parmi les espèces *leishmania*, *L. major* représente l'une des espèces causant la majorité des cas [4]. Les patients manifestent généralement une lésion cutanée ulcérée qui apparaît sur le site de l'inoculation du phlébotome infecté. Cette affection laisse généralement apparaître des cicatrices inesthétiques indélébiles sur les parties exposées du corps, notamment le visage [5,6], ce qui cause une stigmatisation sociale importante des patients [7].

Actuellement, en absence de vaccin, les agents chimiothérapeutiques, à base d'antimoine, représentent le traitement de première intention de la LC. Ils présentent plusieurs limites liées notamment à leur toxicité cardiaque et hépatique, leur coût élevé, l'apparition de résistances, ainsi que le risque de rechute [8]. Des traitements de seconde ligne peuvent être proposés tels que l'amphotéricine B, la miltéfosine, la paromomycine, etc. Ceux-ci présentent également des effets indésirables tels que les nausées et vomissements... [9]. Afin de pallier aux problèmes de toxicité, diverses formulations alternatives d'amphotéricine B ont été développées comme par exemple des liposomes (AmBisome®) [10]. En dépit de leur efficacité, leur coût élevé représente un véritable frein à leur utilisation, notamment dans les pays sous-développés, où la leishmaniose est endémique [10].

Face à cette impasse thérapeutique, le développement d'un nouveau traitement, moins ou pas toxique, plus efficace, moins cher, accessible aux populations les plus démunies particulièrement touchées par la maladie, est devenu une priorité [11]. Parmi les stratégies

recommandées par l'OMS, le développement de nouveaux médicaments dérivés des produits issus de la biodiversité, en se basant sur les connaissances de la médecine traditionnelle représente une approche prometteuse [12]. En effet, le règne végétal regorge de molécules bioactives qui disposent d'une panoplie d'activités biologiques. De nos jours, la recherche scientifique a démontré que ces molécules représentent clairement une source potentielle de médicaments antiparasitaires [13].

Dans ce but, nous avons choisi de tester l'activité antileishmanienne d'extraits de plantes aromatiques et médicinales issues de la flore tunisienne. Ces plantes ont été sélectionnées suite à l'étude de l'état de l'art des pratiques traditionnelles ainsi que des travaux de recherches établis dans la littérature à ce sujet. Nous avons sélectionné trois espèces différentes : l'armoise herbe-blanche (*Artemisia herba-alba*), le pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus*) et le citronnier (*Citrus limon*). L'activité antileishmanienne intéressante des extraits d'armoise herbe-blanche a été citée dans plusieurs travaux antérieurs [14,15]. L'artémisinine, molécule présente dans l'extrait aqueux, a été isolée et sert actuellement de traitement au paludisme [16]. Des études préliminaires sur le fractionnement de l'huile essentielle issue des feuilles de pistachier lentisque ont démontré le potentiel de deux fractions obtenues à inhiber efficacement les parasites de *leishmania*. Ces résultats ont fait l'objet d'un brevet national tunisien (TN 2013/0129) [17]. Enfin, le choix du citronnier a été inspiré de différentes études d'ethnopharmacologie rapportant les bienfaits de cette plante pour les maladies de la peau [18,19]. Par ailleurs, nous avons visé à encapsuler l'extrait présentant la meilleure efficacité contre *Leishmania major* dans la phase dispersée lipophile d'un système de nanoémulsion (NE) afin de les protéger des conditions environnementales (lumière, chaleur...) et également pour améliorer leur efficacité antiparasitaire [20]. Ainsi, le développement de ce système d'administration de substances bioactives représente une stratégie complémentaire à la découverte de nouveaux traitements antileishmanien. En effet, les NEs permettent d'augmenter la solubilité, la biodisponibilité, d'améliorer la perméabilité transdermique des substances actives encapsulées et d'assurer leur transport et leur libération contrôlée au niveau des tissus infectés [20]. Suite aux travaux antérieurs de l'équipe, des NEs stabilisées par la protéine majoritaire du lait, la β -lactoglobuline, ont été développées dans notre étude. Il a été démontré que cette protéine confère au système une stabilité cinétique très intéressante grâce à une interface huile/eau viscoélastique [21]. Ce système a donc été sélectionné afin de faire la preuve de concept de l'efficacité par voie topique de l'extrait choisi sur le modèle expérimental de LC due à *L. major*.

Ce projet de thèse a été dirigé en cotutelle entre l'Université Paris-Saclay et l'Université de Carthage. Les travaux ont été réalisés en alternance entre l'Institut Galien Paris-Sud, UMR

CNRS 8612, à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Saclay, sous la direction du Professeur Florence Agnely et du Docteur Ghazlene Mekhloufi au sein de l'équipe 3 « Physique pharmaceutique » d'une part, et sous la direction du Professeur Manef Abderrabba à l'Institut préparatoire aux études scientifiques et techniques (IPEST) de l'Université de Carthage au sein du laboratoire de matériaux, molécules et application (LMMA) d'autre part. Ce projet a également donné lieu à une collaboration avec le Docteur Sandrine Cojean et le Professeur Philippe Loiseau, BIOCIS, UMR CNRS 8076, laboratoire « Chimiothérapie antiparasitaire » à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Saclay. Des travaux préliminaires de caractérisation à la SPME/GC-MS ont été réalisés avec le Docteur Ninette Aboumrad et le Professeur Fathi Moussa, UMR CNRS 8000, « Laboratoire de Chimie Physique » à la faculté de sciences à Orsay de l'Université Paris-Saclay.

Ce manuscrit comporte quatre chapitres :

- Le premier chapitre correspond à une synthèse de l'état de l'art du sujet de thèse. La leishmaniose ainsi que ses protagonistes sont d'abord présentées. Ensuite, la leishmaniose cutanée qui fait l'objet de notre étude ainsi que son épidémiologie et sa description clinique sont détaillées. Les différents traitements existants sont abordés, ainsi que leurs limites. La phytothérapie est ensuite présentée comme étant l'alternative à ces traitements. Les plantes choisies dans notre projet sont décrites ainsi que leur potentialité antileishmanienne.
- Le deuxième chapitre présente la première étape du travail expérimental qui traite la récolte puis l'extraction des molécules bioactives à partir des plantes, ensuite l'évaluation de l'activité *in vitro* sur deux formes du parasite *L. major*, ainsi que la cytotoxicité. Afin d'enrichir ce criblage biologique, nous avons choisi, d'une part, de réaliser, pour chacune des espèces choisies, des récoltes dans différentes sites de la Tunisie. D'autre part, différentes techniques d'extraction de molécules bioactives ont été mises en œuvre afin d'obtenir pour chaque matériel végétal une huile essentielle et différents extraits (organiques et aqueux). Le chapitre traite séparément la caractérisation et le criblage *in vitro* de l'activité antileishmanienne et cytotoxicité de ces deux types de mélanges de molécules bioactives dans la section I (pour les huiles essentielles, sous forme d'article) et la section II (pour les extraits). A l'issue de ce chapitre, la section III est dédiée à la sélection et la caractérisation de l'extrait le plus efficace contre les *L. major*.
- Le troisième chapitre est consacré au développement d'une NE encapsulant l'extrait choisi. Un rappel bibliographique aborde les NEs, leur intérêt dans le contexte de notre étude, leur aspects thermodynamiques ainsi que le procédé de fabrication. L'intérêt de l'utilisation des biopolymères, notamment la β -lactoglobuline, en tant qu'émulsionnant est mis en avant. La partie expérimentale traite l'influence de l'incorporation de différentes concentrations de l'extrait sélectionné sur la stabilité physicochimique de la NE sur 30 jours. L'efficacité *in*

vitro de ces NEs sur le parasite *L. major* intracellulaire a été ensuite évaluée, ainsi que leur cytotoxicité. Une étude de la stabilité des différentes NEs dans les conditions opératoires du test antileishmanien a été également réalisée. Ce chapitre est conclu par la sélection de la NE qui présente le meilleur compromis entre la stabilité du système et son efficacité antileishmanienne.

- Enfin, le dernier chapitre traite de l'évaluation de l'efficacité du traitement topique par la NE encapsulant l'extrait sélectionné sur le modèle expérimental de la LC. L'étude de l'évolution de la taille des lésions, la quantification de la charge parasitaire ainsi que l'analyse histopathologique des peaux de souris infectées, ont permis d'évaluer l'efficacité du traitement.

Références bibliographiques

- [1] S. Burza, S.L. Croft, M. Boelaert, Leishmaniasis, *Lancet*. 392 (2018) 951–970.
- [2] P.J. Hotez, D.H. Molyneux, A. Fenwick, E. Ottesen, S. Ehrlich Sachs, J.D. Sachs, Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria, *PLoS Med.* 3 (2006) e102.
- [3] WHO |, Global Health Observatory (GHO) data, Leishmaniasis. (2017).
- [4] M. Karami, M. Douidi, M. Setorki, Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran, (2013) 30–37.
- [5] K. Aoun, A. Bouratbine, Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite*. 12 (2014) 215–223.
- [6] B. Traoré, F. Oliveira, O. Faye, A. Dicko, C.A. Coulibaly, I.M. Sissoko, S. Sibiry, N. Sogoba, M.B. Sangare, Y.I. Coulibaly, P. Traore, S.F. Traore, J.M. Anderson, S. Keita, J.G. Valenzuela, S. Kamhawi, S. Doumbia, Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in Districts of High and Low Endemicity in Mali, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–12.
- [7] F. Bailey, K. Mondragon-Shem, P. Hotez, J.A. Ruiz-Postigo, W. Al-Salem, Á. Acosta-Serrano, D.H. Molyneux, A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0005739.
- [8] J. Chakravarty, S. Sundar, Drug Resistance in Leishmaniasis, 2 (2019) 167–176.
- [9] A. Oryan, M. Akbari, Worldwide risk factors in leishmaniasis, *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9 (2016) 925–932.
- [10] T.T. Pham, P.M. Loiseau, G. Barratt, Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments, *Int. J. Pharm.* 454 (2013) 539–552.
- [11] A. Oryan, Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis., *Iran. J. Vet. Res.* 16 (2015) 1–19.
- [12] WHO, World Health and Organization, Leishmaniasis Factsheets. (2000)
- [13] M. Kansole, Mémoire de diplôme d'études approfondies : Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques *Lamiaceae* du Burkinafaso : cas de *leucas Martinicensis* (Jacquin), 2009.
- [14] A. Mathlouthi, M. Belkessam, M. Sdiri, M.F. Diouani, A. Souli, S. El-Bok, M. Ben-Attia, Chemical Composition and Anti-Leishmania Major Activity of Essential Oils from *Artemisia* spp. Grown in Central Tunisia, *J. Essent. Oil-Bearing Plants*. 21 (2018) 1186–1198.
- [15] S. Hatimi, M. Boudouma, M. Bichichi, N. Chaib, N.G. Idrissi, Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso., *Thérapeutique* (2000) Manuscrit n°2162.
- [16] OMS, Récapitulatif de la politique de l'OMS - mai 2010 : Plan mondial de lutte contre le paludisme, Genève, OMS, coll. « Rapport techniques », 2010.
- [17] O. Bachrouch, M. Abderraba, F. Moussa, P. Loiseau, Brevet national tunisien TN 2013/0129, Fractions bioguidées extraites à partir de l'huile essentielle foliaire du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) potentiellement actives contre les parasites de la leishmaniose (*Leishmania donovani*), 2012.
- [18] G. Bertuzzi, B. Tirillini, P. Angelini, R. Venanzoni, Antioxidative Action of *Citrus limonum* Essential Oil on Skin, *European J. Med. Plants*. 3 (2013) 1–9.
- [19] W.M. Otang, A.J. Afolayan, Antimicrobial and antioxidant efficacy of *Citrus limon* L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa, *South African J. Bot.* 102 (2016) 46–49.
- [20] K. Jain, Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice, *Med. Princ. Pr.* 17 (2005) 89e101.
- [21] A. Ali, G. Mekhloufi, N. Huang, F. Agnely, β -lactoglobulin stabilized nanemulsions-Formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability, *Int. J. Pharm.* 500 (2016) 291-304.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

La première section de cette revue bibliographique concerne la présentation générale des leishmanioses et est subdivisée en 4 sections. L'état de connaissances sur cette pathologie sera tout d'abord décrit afin de comprendre la maladie, ses protagonistes notamment les parasites, ainsi que ses différentes formes. Dans la seconde section de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la leishmaniose cutanée qui fait l'objet de notre travail. Nous détaillerons l'épidémiologie, les souches causant la leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde, les recherches cliniques, les différents traitements existants ainsi que ainsi que leur évolution pour une meilleure efficacité thérapeutique. La troisième section sera dédiée à présenter la phytothérapie comme stratégie complémentaire aux traitements conventionnels, ainsi que son rôle pour la recherche de nouvelles molécules antileishmanienne. Elle abordera les préparations traditionnelles, notamment à base de plantes, pour le traitement de la leishmaniose cutanée, ainsi que les plantes ayant prouvé un potentiel antileishmanien. Des exemples de mécanismes d'action des molécules bioactives sur le parasite *Leishmania* sont décrits. Enfin, nous présenterons et détaillerons dans la dernière partie les plantes choisies dans le cadre de notre étude ainsi que leur potentiel dans l'activité antileishmanienne

Section I. Présentation générale de la leishmaniose

I.1. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires tropicales et sub-tropicales. L'Homme est confronté aux leishmanioses depuis des temps anciens. Ceci a été révélé grâce aux descriptions des lésions évoquant fortement les manifestations cliniques de la forme cutanée de la maladie datant d'environ 2500 ans avant J.C. et également grâce à la découverte de l'ADN leishmanien chez des momies d'Egypte antique [1].

De nos jours, les leishmanioses représentent une menace pour près de 350 millions d'hommes, femmes et enfants à travers 98 pays. L'OMS estime que 12 millions de personnes sont actuellement touchées à travers les 4 continents. Chaque année, entre 1,5 et 2 millions de nouveaux cas d'infections surviennent causant entre 20 000 et 30 000 décès [2–4]. Il est à noter qu'en raison du taux de sous-déclaration et de l'inexactitude des données notifiées par les pays les plus touchés, les chiffres délivrés par l'OMS s'avèrent largement sous-estimés [5]. Jusqu'à ce jour, et malgré les avancées de la recherche scientifique, ces maladies demeurent un grave problème de santé publique. Bien qu'elles représentent la neuvième plus grande cause de morbidité parmi les maladies infectieuses, les leishmanioses sont considérées comme faisant partie des maladies les plus négligées [6,7].

I.1.1. Les protagonistes de la maladie

a) Les parasites

Les leishmanioses sont provoquées par des parasites qui sont des protozoaires appartenant à l'ordre des *Kinétoplastidés*, au genre *Leishmania* et à la famille des *Trypanosomatidés*. On distingue aussi deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia* qu'on reconnaît grâce à l'endroit où se développe le parasite chez le vecteur (Tableau 1.1).

Ce parasite est di-morphique : il est transporté par une femelle de petit insecte diptère, le phlébotome sous la forme promastigote flagellée et mobile, et une fois inoculé à un mammifère, ce parasite se différencie au sein des cellules phagocytaires en une forme intracellulaire arrondie, dite amastigote [8,9].

On distingue plus de 30 espèces de *Leishmania* infectant les mammifères dont seulement une vingtaine sont pathogènes pour l'Homme. Ces espèces sont indistinguables morphologiquement, néanmoins chacune est caractérisée par des critères intrinsèques comme

le phénotype et le génotype. Afin de pouvoir les classer, on associe à chaque espèce un nombre de critères extrinsèques, comme la clinique, la géographie ou les hôtes.

Tableau 1.1: Taxonomie du parasite *Leishmania*.

Domaine : <i>Eukaryota</i>	Ordre : <i>Trypanosomatida</i>
Règne : <i>Excavata</i>	Famille : <i>Trypanosomatidae</i>
Enbranchement : <i>Euglenozoa</i>	Genre : <i>Leishmania</i>
Classe : <i>Kinetoplastida</i>	Sous-genre : <i>Leishmania</i> (L.) et <i>Viannia</i> (V.)

Du point de vue des techniques analytiques, l’OMS reconnaît l’utilisation de l’électrophorèse des isoenzymes comme méthode de référence pour l’identification des souches de *Leishmania* [10]. Néanmoins, les techniques de biologie moléculaire sont les plus répandues [11].

b) Les vecteurs

Les vecteurs des leishmanioses sont des femelles de phlébotomes hématophages de l’ordre des *Diptères*, du sous-ordre des *Nématocères* et de la famille des *Psychodidés*. On distingue le genre *Phlebotomus* et le genre *Lutzomyia* qui appartiennent respectivement à l’Ancien et au Nouveau monde. Ces phlébotomes font 2 à 3 mm de long et peuvent passer à travers les mailles d’une moustiquaire. On connaît près de 1000 espèces de phlébotomes dont moins de 50 d’entre elles constituent des vecteurs du parasite *Leishmania*. Ceci est attribué à l’incapacité de certaines espèces de phlébotome à favoriser le développement du stade infectieux du parasite dans leurs intestins et/ou à l’absence du contact écologique réservoir/hôtes. La femelle du phlébotome a une activité nocturne [13]. Elle se développe dans des sols riches en matières organiques où la présence de matières fécales issues de lagomorphes ou de rongeurs semble nécessaire [14]. Les conditions environnementales conditionnent fortement l’activité des phlébotomes. En effet, les phlébotomes commencent à piquer dès le crépuscule et pendant toute la nuit si les conditions hygrométriques, de température (supérieure ou égale à 19–20 °C), de vent (limite à 1 m/s) sont propices. Une température faible ou bien trop élevée constitue un facteur limitant pour l’activité du phlébotome [15]. Sa piqûre ne laisse pas de traces, mais est douloureuse.

Chez l’Homme, les parties les plus exposées à la piqûre sont les parties découvertes comme les pieds, les mains, le visage et le cou. Tandis que chez les mammifères, ce sont les parties les moins velues comme le museau ou les oreilles [16].

Par ailleurs, d’autres modes de transmissions chez l’Homme sont envisageables comme les transfusions sanguines, la transplantation d’organes ou par transmission congénitale [17]. On retrouve aussi dans la littérature des hypothèses concernant un nouveau mode transmission des leishmanioses qui est la transmission anthroponosique par le biais des seringues échangées par

les patients qui consomment de la drogue injectée par voie intraveineuse. Ceci expliquerait aussi la forte prévalence de leishmaniose chez les patients de toxicomanie intraveineuse (IV) séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [18].

c) Les hôtes et réservoirs

Selon le réservoir d'origine, on distingue deux grandes catégories de leishmanioses : les leishmanioses zoonotiques et les leishmanioses anthroponotiques.

Pour les leishmanioses zoonotiques, l'hôte/réservoir est un animal sauvage, commensal ou domestique (carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates...), alors que les leishmanioses anthroponotiques ont pour réservoir seulement l'Homme [13].

I.1.2. Le cycle biologique des parasites

a) Développement chez l'hôte invertébré : la forme promastigote

Pendant un repas sanguin, une femelle de phlébotome ingère les *Leishmania* présents dans la peau ou le sang d'un mammifère infecté. Au niveau du tube digestif du phlébotome, les parasites se différencient rapidement en forme promastigote et ensuite traversent la membrane péritrophique [11]. La forme promastigote est une forme allongée du parasite caractérisée par un flagelle d'une longueur de 20 µm assurant sa mobilité [19] (Fig. 1.1-A).

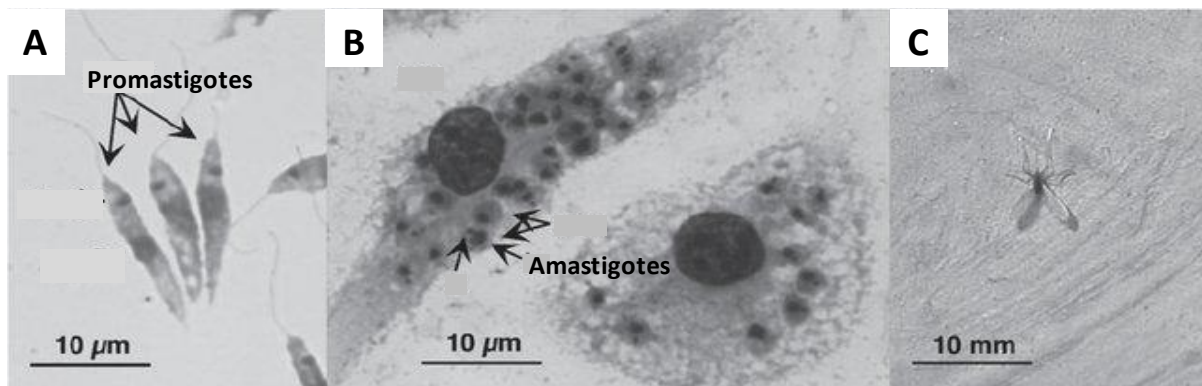


Figure 1.1 : Les différents stades du parasite et les vecteurs impliqués dans les leishmanioses. **A)** Les promastigotes (de *L. major*, *in vitro*). **B)** Les amastigotes intracellulaires de *L. major* dans des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse, 48 h après l'infection. **C)** Le phlébotome sur un mur recouvert d'argile [12].

Dans la lumière de l'intestin du phlébotome, une phase de multiplication a lieu qui est ensuite suivie par une migration des *Leishmania* vers la partie antérieure du tube digestif. A cette étape, les promastigotes deviennent infestant (appelés promastigotes métacycliques) et sont par la suite injectés chez un autre hôte mammifère lors d'une piqûre ultérieure [11,17].

b) *Développement chez l'hôte vertébré : la forme amastigote*

Suite à la piqûre par un phlébotome infecté, l'invasion des parasites au niveau du derme de l'hôte est souvent favorisée par des molécules contenues dans la salive du phlébotome qui exercent un rôle immunosuppresseur local [20]. Les promastigotes métacycliques ainsi inoculés sont phagocytés par des macrophages et des cellules apparentées du derme. Lorsqu'ils intègrent la vacuole parasitophore, ils se différencient en forme amastigote intracellulaire [21]. A ce stade, le parasite présente une forme ovale ou arrondie et mesure environ 2 à 3 μm (Fig. 1.1-B). Avec son flagelle réduit à la surface de la membrane cellulaire, cette forme possède une mobilité très limitée [11]. La différenciation du promastigote en amastigote permet au parasite de s'adapter aux conditions de vie intracellulaire avec une température à 37 °C et un pH acide ($\sim 5,0$) [22]. Suite à la multiplication des *Leishmania* et à l'éclatement de la cellule hôte (macrophage), les parasites sont capables d'infecter de nouvelles cellules phagocytaires locales du derme ou encore de migrer vers d'autres tissus [23]. L'étendue de l'infection dépend du tropisme de l'espèce *Leishmania* en cause, ainsi que des caractéristiques de l'hôte, à savoir son système immunitaire. Généralement, les défenses immunitaires permettent de limiter l'installation du parasite et son développement pour donner lieu à une infection asymptomatique. Sinon, l'infection se manifeste cliniquement [24,25].

I.2. Formes existantes

Les manifestations cliniques des leishmanioses dépendent des interactions complexes entre les caractéristiques de virulence de l'espèce de *Leishmania* infectante, la biologie du vecteur ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte. Le résultat de ces interactions est un spectre de maladie pouvant aller de lésions cutanées localisées à une atteinte diffuse du système réticuloendothélial [26,27].

Traditionnellement, les leishmanioses humaines sont classées en trois principaux syndromes cliniques : viscérale ou Kala-azar, cutanée et muco-cutanée. Cependant, il existe d'autres variantes de la maladie étant donné la grande diversité de l'espèce *Leishmania* et la réponse immunitaire qui diffère d'un hôte à un autre [28].

I.2.1. La leishmaniose viscérale

Annuellement, 0,2 à 0,4 million de personnes contractent la leishmaniose viscérale (LV) à travers le monde. Plus de 90 % des cas sont reportés dans six pays à savoir l'Inde, le Népal, le Bangladesh, le Soudan, le Brésil et l'Ethiopie. Selon les estimations de l'OMS, la LV cause entre 20 000 et 40 000 décès par an [4,5].

La LV est la forme la plus grave des leishmanioses puisqu'en absence de traitement, cette maladie peut engager le pronostic vital. Les manifestations cliniques sont caractérisées par une altération de l'état général. Généralement, ces manifestations sont dominées par des poussées de fièvre irrégulières et prolongées, une splénomégalie, une anémie ainsi qu'une perte de poids. Leur intensité reflète la multiplication et l'installation des parasites dans certains organes comme la moelle osseuse ou la rate [29] .

L'homme adulte développe rarement la LV puisque son système immunitaire lui permet de contrôler le développement des parasites. Les cas de LV concernent plutôt les sujets aux défenses immunitaires amoindries [30]. En effet, la LV était considérée comme une maladie pédiatrique et ce n'est que dans les années 1980 que des cas adultes de LV ont été décrits notamment chez des sujets immunodéprimés. Ceci est dû au fait que pour que l'organisme combatte une LV, il faut une coopération parfaite entre le système monocytes-macrophages et les lymphocytes, plus spécialement les lymphocytes CD4+. Ce système présente une déficience chez les sujets immunodéprimés [28].

On connaît deux souches de *Leishmania* responsables de LV : *L. donovani* qui est l'espèce *anthroponotique* dont la région de forte endémicité se situe en Afrique de l'Est et dans le sous-continent indien, et *L. infantum*, qui est l'espèce *zoonotique* (réservoir : chien) qui existe au niveau du pourtour méditerranéen, au Moyen-Orient ainsi qu'en Amérique du Sud [5,27].

I.2.2. La leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée (LC) est la forme de leishmanioses la répandue dans le monde. L'inoculation du promastigote au niveau de la peau induit, après une période d'incubation, une lésion cutanée qui s'élargit progressivement. Cette forme guérit spontanément mais laisse des cicatrices inesthétiques [31].

La LC sera davantage détaillée dans la section II.

I.2.3. La leishmaniose muco-cutanée

La forme muco-cutanée se manifeste par une destruction totale ou partielle de la muqueuse du nez, de la bouche et de la gorge [4]. Cette pathologie est particulière à l'Amérique du Sud et Centrale. Connue sous le nom de « *espundia* », cette forme commence par l'apparition de lésions cutanées parfaitement semblables à celles de la LC qui finissent par cicatriser en 6 mois à 1 an. Ces lésions sont suivies (ou concomitantes) d'une autre infection qui attaque les cavités nasales et buccales préférentiellement. Les lésions ulcéreuses peuvent s'étendre à l'oropharynx et à la trachée et ainsi mettre le pronostic vital du malade en jeu [26,27,32]. Cette pathologie est essentiellement provoquée par la souche *L. braziliensis*, mais les souches *L. panamensis*, *L. guyanensis* et *L. amazonensis* peuvent également être impliquées. Cette forme de leishmaniose

peut être très défigurante et les lésions nécrosées peuvent se surinfecter par des affections bactériennes qui auront pour conséquence l'apparition de difformités sérieuses au niveau du visage. Suite à cela, cette pathologie peut placer le malade au centre de discriminations socioculturelles importantes, voire menacer le pronostic vital du patient [32]. Dans les pays endémiques, le pourcentage de cas de LC pouvant avoir une atteinte des muqueuses est aux environs de 5 % mais peut atteindre les 20 % dans certains pays comme la Bolivie [33].

I.3. Coinfection VIH/*Leishmania*

La LV est la forme de leishmaniose la plus communément associée avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Toutefois, des cas de coinfection à *Leishmania* causant la LC associée au VIH ont été décrits. Cette coinfection est le résultat de la superposition géographique des infections au VIH et aux parasites *Leishmania*. En effet, le SIDA s'est disséminé de plus en plus vers les zones rurales et inversement et d'une manière simultanée, les leishmanioses se sont propagées vers les milieux urbains. Cette « nouvelle pathologie » s'individualise par des caractéristiques cliniques, épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques [34].

L'existence simultanée du parasite *Leishmania* et du VIH défavorise le développement de macrophages et de cellules dendritiques qui sont les cibles cellulaires communes au parasite et au virus. En effet, la coinfection VIH/*Leishmania* accentue leurs effets pathogènes respectifs, ce qui est préjudiciable pour leur hôte. Il a déjà été démontré que la présence d'une infection leishmanienne favorisait l'activation du virus latent *via* l'activation de gènes impliqués dans la réplication, engendrant l'augmentation de la charge virale et aggravant l'immunosuppression du patient. La coinfection entraîne alors une progression vers le stade SIDA plus rapide en comparaison avec un patient souffrant uniquement de VIH [34,35].

De la même manière, une personne infectée par le VIH, donc immunodéprimée, multiplie le facteur de risque pour développer une LV d'un facteur 100 à 2320 dans les zones endémiques [36]. Un patient immunodéprimé a tendance à développer les formes les plus sévères de leishmaniose [37].

I.4. Conclusion

Cette section a présenté les leishmanioses ainsi que ses différents acteurs, ses manifestations cliniques pouvant aller de lésions cutanées localisées à l'atteinte du système réticuloendothélial. Ce projet de thèse porte uniquement sur la forme cutanée (LC). Pour cela, dans la suite, nous présenteront d'une manière plus détaillée cette forme, son épidémiologie, son diagnostic ainsi que ses différentes manifestations cliniques. Tous les traitements existants seront présentés avec leurs avantages et inconvénients respectifs.

Section II. La leishmaniose cutanée et ses traitements

II.1. La leishmaniose cutanée

II.1.1. Etiologie

L'inoculation du parasite par le phlébotome est suivie par une période d'incubation allant de 1 à 4 mois. Par la suite, une lésion cutanée commence à apparaître sur le site d'inoculation [38]. La lésion évolue d'une petite papule inflammatoire recouverte de fines squames blanchâtres à un ulcère pouvant atteindre dix centimètres de diamètre [39]. Ces lésions sont généralement indolores mais peuvent devenir douloureuses à cause des surinfections bactériennes [39]. Elles peuvent persister jusqu'à 18 mois mais, qu'elles soient traitées ou non, ces lésions finissent souvent par cicatriser spontanément. Néanmoins, elles laissent apparaître des cicatrices indélébiles et parfois même défigurantes [40,41]. La stigmatisation sociale reliée aux cicatrices causées par la LC a été largement démontrée dans la littérature surtout que celles-ci touchent préférentiellement les zones visibles du corps notamment le visage. Les séquelles de LC sont donc lourdes tant sur le plan psychologique que sur le plan social sur la vie des patients [42].

II.1.2. Epidémiologie : incidence et répartition géographique

a) Incidence

Au cours des dernières décennies, le nombre de personnes touchées par la LC à travers le monde a considérablement évolué. La prévalence mondiale a augmenté entre 1990 et 2013 de 174 % [43]. A travers le monde, il existe 88 pays d'endémie répartis sur les 4 continents [44]. Selon les estimations, on compte entre 0,1 et 1,2 million de nouveaux cas chaque année [5]. L'OMS dénombre près de 10 millions de personnes touchées par cette maladie. Néanmoins, ces chiffres devraient augmenter en raison du réchauffement climatique de la planète, ainsi que l'évolution de l'écologie humaine [45,46].

La répartition géographique des cas de LC est inégale puisque environ 90 % de l'incidence mondiale est reportée dans les sept pays les plus endémiques qui sont les suivants : l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, l'Iran, la Syrie, le Pérou et l'Arabie Saoudite [5,44,47].

b) Répartition géographique des leishmanioses et les parasites responsables

La LC est largement répartie à travers le monde, essentiellement en zone intertropicale, mais débordant fortement sur les zones tempérées d'Afrique du Nord, du Sud de l'Europe (en particulier le Sud de la France) et d'Asie (Fig. 1.2).

De manière générale, la LC est une maladie zoonotique qui a un large éventail de réservoirs mammifères. Cependant, elle pourrait être anthroponotique dans les zones urbaines d'endémie, plus particulièrement au Soudan, en Afghanistan et en Inde [45].

Il est important de distinguer deux types de leishmanioses : celles de l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et celles du Nouveau Monde (Amérique du Nord, du Sud et Centrale) [48].

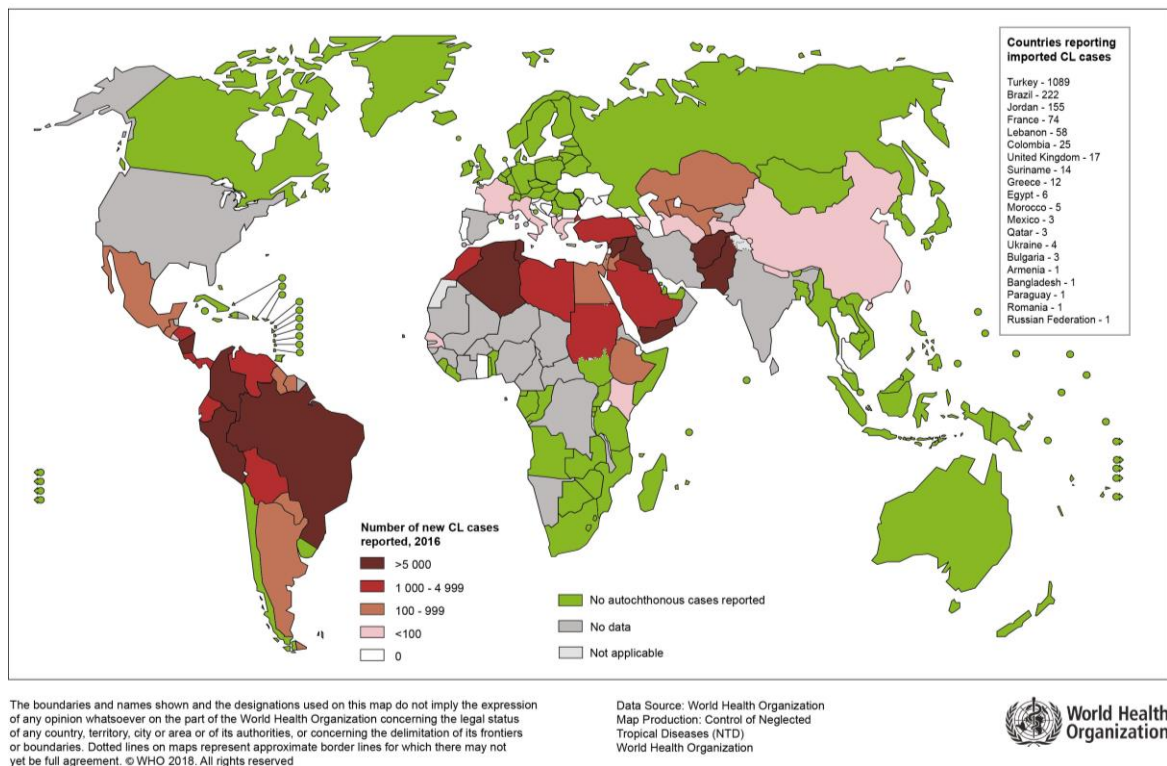


Figure 1.2 : Statut d'endémicité de la leishmaniose cutanée dans le monde en 2016 [49].

Dans l'Ancien Monde, la LC est principalement provoquée par les souches *L. tropica*, *L. major* et *L. aethiopica* qui sont présentes dans le sud de l'Europe, dans le nord de l'Afrique, autour du bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, dans le sous-continent indien et en Asie centrale [50–52] (Tableau 1.2). Les régions de forte endémie sont essentiellement la province de Balouchistan au Pakistan [53], la zone centrale de l'Iran [54], l'Arabie saoudite [55] et l'Éthiopie, dont la souche responsable est *L. aethiopica* [44].

Les deux souches qui sont responsables de la majorité des cas de LC en Afrique du Nord et au Moyen Orient sont *L. major* et *L. tropica*. Cependant, dans la région Sud-ouest de l'Europe (Espagne, Italie, France, Portugal et Malte), l'agent responsable de cette pathologie chez l'Homme est l'espèce *L. infantum* [56,57] qui est habituellement une espèce responsable de la leishmaniose viscérale.

Tableau 1.2 : Les leishmanioses cutanée et muco-cutanée dans l'Ancien Monde et le Nouveau Monde et les différentes espèces de *Leishmania* responsables.

Pathologie	Région	Groupe d'espèces	Espèces
LC	Ancien monde	<i>L (Leishmania)</i>	<i>L. major</i>
			<i>L. tropica</i>
			<i>L. aethiopica</i>
			<i>L. infantum*</i>
	Nouveau monde	<i>L (Leishmania) = L mexicana complex</i>	<i>L. mexicana</i>
			<i>L. amazonensis</i>
<i>L. venezuelensis</i>			
LC/ Muco-cutanée	Nouveau monde	<i>L (Viannia) = L braziliensis complex</i>	<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. colombiensis</i>
			<i>L. guyanensis</i>
			<i>L. panamensis</i>
			<i>L. peruviana</i>

* *L. infantum* cause principalement la LV, néanmoins des cas de LC à *L. infantum* ont été dénombrés dans l'Ancien Monde.

Quant aux leishmanioses cutanées du Nouveau Monde, les zones d'endémie de LC se trouvent dans certaines parties de l'Amérique Centrale, plus particulièrement au Mexique, ainsi que les pays d'Amérique du Sud, notamment le Pérou, la Bolivie, l'Equateur, la Colombie, la Guyane française et le Brésil [58]. Les parasites responsables de l'infection dite du Nouveau monde causent le plus souvent une forme de leishmaniose cutanée localisée et sont essentiellement soit de type *L. mexicana complex*, soit de sous-espèce *L. braziliensis complex* [59] (Tableau 1.2). La particularité des leishmanioses du Nouveau Monde, notamment de sous-espèce *L. (Vianna) braziliensis*, est leur sévérité par rapport à celle de l'Ancien Monde. En effet, en absence de traitement, elles présentent un fort risque de complication. Dans ce cas, la LC initialement localisée se dissémine pour attaquer les muqueuses et évoluer vers une forme plus sévère à savoir la leishmaniose mucocutanée [60,61].

Ce travail de thèse se concentre sur l'étude de la leishmaniose cutanée causée par une espèce de *Leishmania* de l'Ancien Monde, plus particulièrement *L. major*. Pour cela, nous développerons uniquement la clinique de LC de l'Ancien Monde dans ce qui suit.

II.I.3. Description clinique de la LC

Les souches de *Leishmania* qui sont responsables de la majorité des cas de LC dans l'Ancien Monde sont *L. tropica*, *L. major* et *L. infantum*. Malgré la superposition géographique de leurs zones d'endémie, les lésions cutanées, qui résultent de l'infection par ces souches, ont des caractéristiques considérablement différentes.

Généralement, une lésion typique de LC apparaît sous forme d'une papule érythémateuse à l'endroit où le parasite a été inoculé. Elle grossit progressivement et devient un nodule qui finit (ou pas) par s'ulcérer. En fonction de l'espèce en cause :

- le processus nécrotique peut être plus ou moins rapide ;
- la taille de la plaie peut être plus ou moins grande ;
- l'aspect de la plaie peut être creux, humide, indolent, avec ou sans ulcération ... ;
- l'emplacement de la plaie peut varier ;
- le temps nécessaire pour la cicatrisation (la guérison étant la règle) peut être variable.

Une équipe de l'Institut Pasteur de Tunis a pu décrire et mettre en avant les différents aspects des lésions de LC rencontrés en Afrique du Nord causées par *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* [39].

a) *Leishmaniose à L. major*

Les lésions provoquées par l'espèce *L. major* ont tendance à être humides et exsudatives en « forme de volcan » [45] (Fig. 1.3). La lésion typique à *L. major* est nettement plus grande que celle causée par d'autres souches. Son diamètre peut atteindre dix centimètres au maximum [39]. Généralement, cette forme cause des lésions multiples, généralement de un à vingt, situées sur les membres [62].



Figure 1.3 : Aspect d'une lésion typique à *Leishmania major* [64].

Les lésions évoluent d'une petite papule inflammatoire à un nodule dur sur lequel se forme progressivement une croûte épaisse. Par la suite, la croûte tombe et laisse place à une lésion d'aspect ulcéré profond et très humide avec une périphérie surélevée, en forme de bourrelet dur. Pour ce type de lésions, une surinfection ne constitue pas une exception. Ce facteur supplémentaire rend les lésions particulièrement douloureuses et retarde leur guérison [63]. La

cicatrisation pour les LC à *L. major* est spontanée, mais reste rapide par rapport aux autres formes. Généralement, elle ne dépasse pas les 8 mois [39].

b) Leishmaniose à L. tropica

Contrairement à *L. major*, les lésions à *L. tropica* ont tendance à être sèches. Généralement, elles ne s'ulcèrent pas. Elles gardent un aspect de nodule avec une surface lisse et légèrement crouteuse. La majorité des lésions à *L. tropica* se situent au niveau du visage. Elles évoluent lentement et leur diamètre est nettement inférieur à celui des lésions à *L. major*. De plus, cette forme présente moins de lésions inflammatoires. Certaines lésions persistent plus d'un an, ce qui reflète le caractère chronique de cette forme. Même en présence de traitement, les rechutes et les échecs thérapeutiques ne sont pas exceptionnels pour les lésions à *L. tropica* [39]. Il est à noter que les lésions nodulaires sont communes aux formes *L. tropica* et *L. aethiopica*. Néanmoins, la lésion à *L. tropica* se distingue par une couche hyperkératotique qui se forme au-dessus de la lésion [45].

c) Leishmaniose à L. infantum

Les lésions cutanées à *L. infantum* sont petites mais ulcérées à surface croûteuse. Les patients infectés par cette espèce présentent généralement une lésion unique au niveau du visage. De plus, elle est souvent entourée par une zone d'infiltration [39].

II.1.4. Facteurs de risque

L'augmentation de l'incidence et de la prévalence des LC est attribuée en grande partie à la pauvreté. En effet, les mauvaises conditions de logement et le manque d'hygiène domestique, par exemple l'absence de système de gestion des déchets ménagers, offrent un terrain propice à la reproduction des vecteurs de la maladie (les phlébotomes). De plus, ceci favorise son contact avec l'Homme. La malnutrition, également générée par la pauvreté, constitue aussi un facteur de risque [4]. La maladie est favorisée par les voyages, les migrations, les guerres, l'instabilité politique et l'augmentation du nombre des réfugiés qui peuvent apporter la maladie dans les zones non endémiques. Les changements environnementaux, tels que l'urbanisation, la déforestation ainsi que le développement des zones de peuplement dans les forêts, sont également des facteurs favorisant l'incidence de la LC [46]. Selon l'OMS, les changements climatiques qui affectent la température, la pluviométrie et l'humidité peuvent jouer en faveur du cycle de transmission du parasite. Ceci pourrait créer de nouvelles zones d'endémie de la maladie [4].

II.1.5. Diagnostic

Les lésions cutanées causées par la LC pourraient être confondues avec des piqûres d'arthropodes infectés, l'impétigo, les dermatophytoses, les infections cutanées causées par des

myobactéries, la sporotrichose (surtout en présence de lymphadénopathie localisée), et chez l'adulte les lésions pourraient être associées aux tumeurs malignes de la peau [65].

Ainsi, pour pouvoir diagnostiquer correctement la LC, il est recommandé de corroborer le test clinique aux résultats de laboratoire, qui ont pour but d'observer les amastigotes [4]. Pour ce faire, il existe un nombre de techniques conventionnelles, qui sont, entre autres, l'examen d'un frottis cutané, la mise en culture des parasites ou l'isolement des parasites chez un modèle d'expérimentation animale [66]. Cependant les techniques modernes, qui reposent sur des méthodes de biologie moléculaire, essentiellement la « Polymerase Chain Reaction » (PCR), semblent être privilégiées en raison de leur reproductibilité, leur sensibilité ainsi que leur rapidité [67].

a) Examen microscopique d'un frottis cutané

Le frottis cutané est préparé par raclage de la lésion en bordure de la face interne de l'ulcération à l'aide d'une lame chirurgicale stérile. Les parasites se situent généralement à la périphérie de la lésion. Ce raclage est réalisé jusqu'à obtention d'un frotti légèrement teinté de sang. Si la lésion est nodulaire, le frottis se fait par une ponction à la seringue.

Pour visualiser les amastigotes, le prélèvement est fixé à l'alcool puis coloré au May-Grünwald-Giemsa et observé à l'immersion sous un microscope optique [68]. Les parasites sont observables généralement à l'intérieur des macrophages mais peuvent être libres. Ils ont une forme de capsule ovoïde d'un diamètre de l'ordre de 2 à 6 μm . Leur cytoplasme est teinté en bleu. Il contient un noyau coloré en rouge violacé. L'appareil flagellaire rudimentaire est également visible [69].

La spécificité de cette méthode de diagnostic est de 100 %. Néanmoins, comme tous les examens par biopsie, cette méthode reste invasive [66]. Il est à noter que l'observation des amastigotes au microscope peut être difficile pour les stades les plus précoces de la leishmaniose, mais ceci n'exclut pas la maladie. Dans ce cas de figure, la méthode pour les isoler dans un milieu de culture pourrait être plus efficace [70].

b) Isolation des parasites dans un milieu de culture

A partir d'un frottis cutané, le parasite peut être isolé dans un milieu de culture approprié (gélose au sang, milieu de Schneider ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) [71]. L'incubation est réalisée à 28 °C. Cette méthode génère des parasites au stade promastigote. Pour cette technique, la spécificité est de 100 % tandis que le taux de sensibilité peut atteindre les 84 % [72].

c) Isolation des parasites via inoculation sur animaux

Cette méthode alternative repose sur l'isolation des cellules leishmaniennes à partir du matériel biologique et leur inoculation au niveau du coussinet, du nez ou à la base de la queue d'une

souris BALB/c ou d'un hamster. L'analyse histopathologique d'une biopsie peut être informative, mais rarement suffisante pour un diagnostic. Cette méthode est fastidieuse, elle n'est pas quantitative, et n'est pas réalisable sans l'accès à une animalerie [73].

d) *PCR conventionnelle*

Ces dernières années, le domaine des techniques de biologie moléculaire spécifique à des espèces de *Leishmania* différentes a connu une véritable avancée permettant la réalisation d'un diagnostic direct, rapide avec une forte sensibilité. En effet, la PCR est une technique qui permet d'amplifier l'ADN du parasite en utilisant des séquences de la région variable de l'ADN du kinétoplaste [74]. L'intérêt de cette approche qui met en œuvre des techniques d'amplification génétique et de séquençage, est de pouvoir utiliser des amorces « universelles » qui peuvent fonctionner avec toutes les espèces du genre *Leishmania*.

Les avantages que présente la PCR par rapport aux autres techniques sont les suivants [75,76] :

- elle est pratiquée directement sur les échantillons biologiques prélevés (biopsies cutanées, sang, moelle osseuse ...) ;
- elle a la meilleure sensibilité avec un délai de réponse rapide (quelques jours) ;
- elle est de plus en plus disponible dans les laboratoires et même sur le terrain.

II.2. Les différents traitements possibles des LC et leurs évolutions pour une meilleure efficacité

Etant donné que les patients ayant été atteints de leishmanioses sont capables de résister à une réinfection, cela implique que le développement d'un vaccin pour la prévention de cette maladie est réalisable. Cependant, en dépit des grandes avancées dans la compréhension de la biologie du *Leishmania* ainsi que la réponse de l'hôte, il n'a pas encore été possible de développer et commercialiser un vaccin afin de se de se prémunir des leishmanioses.

Des dizaines de vaccins candidats, tels que les protéines impliquées dans la virulence de la *Leishmania*, les antigènes élués de la surface des macrophages infectés, les antigènes potentiellement sécrétés ou excrétés, ainsi que plusieurs stratégies vaccinales comme les parasites vivants atténués, les vaccins ADN avec ou sans adjuvants, sont disponibles et leur efficacité a été prouvée pour protéger les souris de leishmaniose [77–79]. Des vaccins sont déjà commercialisés chez le chien. Toutefois, chez l'Homme, plusieurs essais n'ont pas abouti tels que le vaccin à base de parasites tués et d'autres essais sont encore très limités en termes de reproductibilité [80]. Tout comme les vaccins sous-unitaires, les parasites tués, considérés comme des vaccins de première génération, ont prouvé leur capacité à induire une réponse T CD4+ et des anticorps, mais ne peuvent pas induire la réponse T CD8+. D'après les dernières

études, la réponse cytotoxique anti-leishmanienne est indispensable dans l'acquisition de l'immunité et la protection [81]. La conception d'un tel vaccin exige donc l'induction de cette voie par l'expression de l'antigène dans les cellules de la personne vaccinée. Dans ce cas, ces cellules seront capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T afin de les activer. Dans ce contexte, deux modèles récents de vaccins sont proposés : le virus recombinant et le vaccin ADN [29]. Le premier type, qui est une protéine produite par des cellules génétiquement modifiée, représente le vaccin de deuxième génération. Cette protéine émulsifiée par un adjuvant (monophosphoryle lipide A), appelée LEISH-F1, a été développée par Infectious Disease Research Institute (IDRI, Seattle, WA, USA) et a atteint la Phase II des essais cliniques. LEISH-F1 additionné d'adjuvant a également prouvé son efficacité de traiter les formes de LC et de leishmaniose muco-cutanée et d'induire aussi une immunité protectrice chez des volontaires sains [82].

D'autre part, il a été démontré que la salive du phlébotome, composée d'une trentaine de protéines, possède un effet immunogène qui confère aux souris pré-exposées aux piqûres de phlébotome non infecté une protection en présence de cette salive. Cette protection a été associée à une réponse cellulaire de type Th1 qui est capable de créer un microenvironnement cellulaire (Th1) et cytokinique (IFN- γ) hostile à la prolifération parasitaire [83,84]. Dans ce contexte, des équipes de l'Institut Pasteur de Tunis s'intéressent à la composition de la salive du *Plebotomus papatasi* afin de pouvoir identifier des protéines cibles de réponses cellulaires qui pourraient faire l'objet de bons candidats vaccins [85].

Actuellement, en absence d'un vaccin approuvé pour l'Homme, le seul moyen de lutter contre la leishmaniose reste les traitements. Néanmoins, la leishmaniose fait partie des 17 maladies listées par l'OMS comme faisant partie des maladies tropicales les plus négligées et pour la traiter, la pharmacopée est très restreinte [86].

II.2.1. Quand traiter la leishmaniose cutanée ?

Bien que la LC ne soit pas fatale et qu'elle guérisse spontanément, il est fortement recommandé de traiter les lésions pour les raisons suivantes [87] :

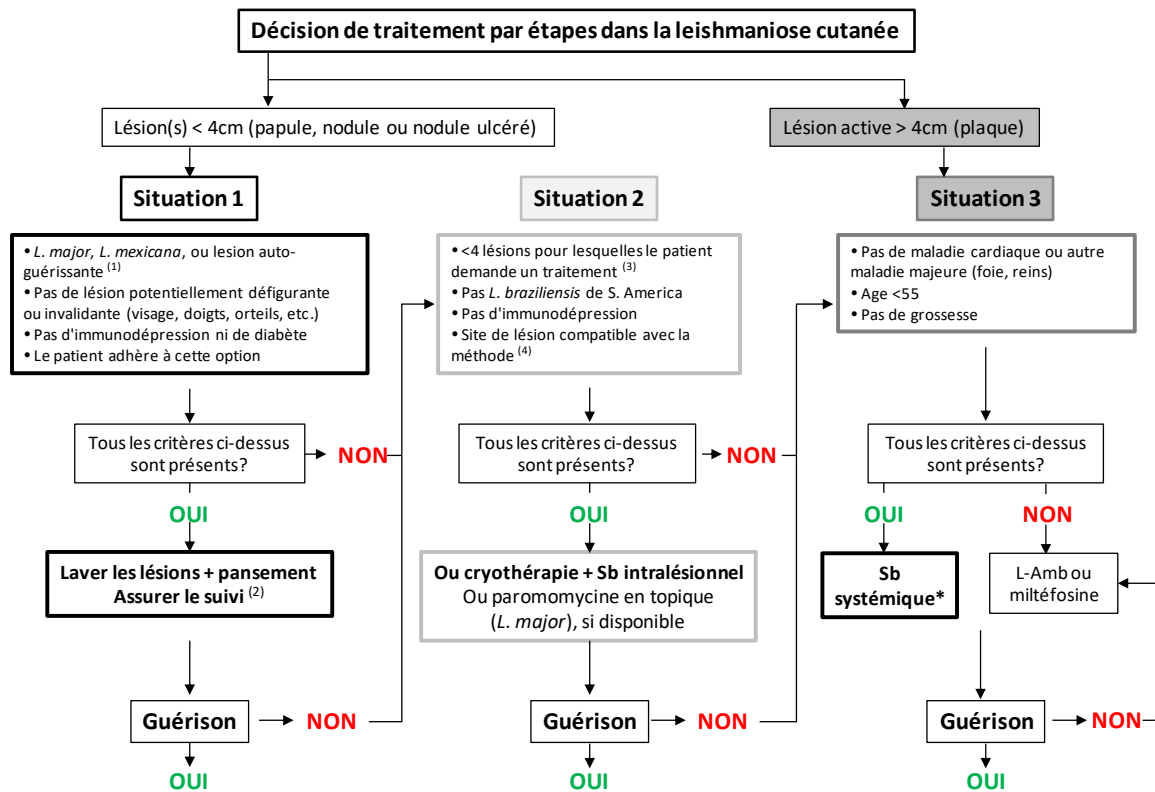
- la diminution du risque de dissémination de la LC dans les muqueuses, particulièrement pour les espèces du Nouveau Monde ;
- l'accélération de la guérison cutanée, l'amélioration de la cicatrisation, et la limitation de certaines complications comme les surinfections bactériennes ;
- la diminution du risque de récurrence par réactivation clinique des lésions ;
- la diminution de la morbidité par les lésions étendues et persistantes, en particulier, celles qui se situent au niveau du visage.

Dans les zones où l'Homme constitue un réservoir, la guérison sert à réduire le réservoir d'infection. Cependant, dans la pratique, ce n'est pas toujours le cas. En effet, la décision de traiter médicalement une LC est reliée à plusieurs paramètres. La décision doit être le fruit d'une étude de la balance bénéfique/risque [88]. Dans un manuel publié en 2014, l'OMS recommande une approche standardisée sous forme d'un logigramme (Fig. 1.4) pour la prise en charge de la LC dans la région de la Méditerranée orientale [88]. Ainsi, l'espèce infectante, la région géographique et le statut immunitaire du patient sont des paramètres qui peuvent avoir une incidence sur l'efficacité d'un traitement. Par exemple, dans le cas d'une infection due à *L. tropica* (espèce anthroponotique), un traitement rapide est recommandé afin d'améliorer l'état du patient et également de limiter le risque de transmission interhumaine. Comme le précise le logigramme, pour déterminer le traitement le plus propice, il est indispensable de collecter un nombre d'informations portant sur les cinq aspects cliniques suivants :

- la taille et l'aspect de la lésion : papule (< 1 cm), nodule (< 4 cm) ou plaque (\geq 4 cm),
- le nombre de lésions,
- la localisation des lésions sur le corps,
- l'évolution des lésions : durée, aggravation (lésion active), amélioration (auto-guérison),
- et l'état de santé immunologique et général du patient : immunodéprimé ou non, diabétique, troubles cardiaques, hépatiques ou rénaux...

La prise en charge des patients est donc adaptée au cas par cas. Néanmoins, elle inclut obligatoirement un lavage à l'eau propre et au savon des lésions. Par la suite, elles sont recouvertes d'un pansement remplacé trois ou quatre fois par semaine.

La surinfection bactérienne est une complication rare de la leishmaniose cutanée. En revanche, si les lésions montrent des signes évidents de surinfection bactérienne, c'est-à-dire une zone rouge, enflée et sensible s'étendant au-delà des frontières de la lésion de LC, il est alors justifié de prescrire des antibiotiques oraux efficaces contre les streptocoques et les staphylocoques communs, par exemple la cloxacilline, la pristinamycine ou l'amoxicilline plus l'acide clavulanique [88].



(1) Les lésions auto-guérisantes montrent un aplatissement ou une réduction de la surface de l'ulcération et/ou de l'induration.

(2) Le lavage des lésions, le pansement et le suivi sont effectués dans toutes les situations.

(3) La dissémination lymphatique en soi n'a pas d'influence sur la décision. Cependant, comme elle augmente le nombre de lésions nécessitant un traitement, il était parfois justifié d'utiliser un traitement systémique.

(4) La plupart des lésions des membres, du tronc, de la joue, de la joue supérieure, du menton et de la face sont injectées, y compris celles proches de grosses articulations. Les oreilles, les doigts et les orteils ne pas été injectés. Chez l'enfant la prémédication facilite l'injection.

* Pentamidine en systémique pour *L. guyanensis/panamensis*. Sb: Antimoine; L-Amb : Ambisome®

Figure 1.4 : Logigramme pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée [89].

II.2.2. Les options de traitements « non-médicamenteux »

Les traitements non-médicamenteux sont des thérapies locales généralement réalisées sur les lésions de LC en ambulatoire. Ces thérapies comprennent la cautérisation, l'excision chirurgicale et la cryothérapie.

L'application locale de la chaleur reste la technique la plus simple. En effet, étant donné que les parasites *Leishmania* sont thermolabiles, ce traitement local a démontré une efficacité remarquable dans des études contrôlées par placebo [90]. Pour cela, il existe un dispositif approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour traiter les maladies cutanées : le ThermoMeds® (ThermoSurgery Technologies, Inc, Phoenix, Arizona, États-Unis). Il transmet la chaleur générée par radiofréquences et localisée directement dans une lésion à l'aide de griffes placées dessus. Localement, la chaleur utilisée est de 50°C pendant 30 secondes. Cette procédure est douloureuse et nécessite un anesthésiant local [31]. Néanmoins, elle est aussi efficace que le traitement médicamenteux de référence à l'antimoine (Glucantime®) pour certaines souches comme *L. mexicana* du Guatemala [91]. De plus, cette thérapie est aussi

prometteuse pour les LC de l’Ancien Monde puisqu’elle a prouvé son efficacité chez 26 soldats revenant de la Guerre en Irak atteints de LC due à *L. major* [92].

La thérapie locale la plus couramment utilisée est la cryothérapie. Elle consiste en l’application locale répétée (2 à 3 fois à intervalles rapprochés) d’azote liquide à l’aide d’un coton-tige en appliquant une pression modérée de 15 à 20 secondes, et ce jusqu’à 2 mm à l’extérieur de la lésion. Une application adéquate de la cryothérapie se manifeste par un blanchiment de la peau allant à 2–3 mm en dehors de la lésion [90]. Quant à l’efficacité thérapeutique de cette méthode, une étude turque a montré un taux de guérison après 1 ou 2 séances de 77 % par rapport à 85 % après 1 mois de traitement au médicament de référence (Glucantime®) [93].

Le traitement non-médicamenteux inclut également le traitement simultané d’un des facteurs majeurs dans le développement des leishmanioses, qui est la malnutrition. En effet, cette dernière augmente la morbidité des lésions et diminue considérablement la réponse au traitement. Il est alors impératif de procurer aux patients des soins de soutien tels qu’un régime alimentaire hyperprotéique et hypercalorique, du repos ainsi que des transfusions sanguines [94].

II.2.3. La chimiothérapie

Il n’existe donc pas de traitement « miracle » contre les leishmanioses. Toutefois, Sharquie et ses collaborateurs ont imaginé le traitement idéal comme étant [95] :

- à efficacité thérapeutique considérable c'est-à-dire un traitement ayant une action rapide avec un taux d’efficacité élevé,
- sans risque de résistance,
- n'ayant pas de toxicité c'est-à-dire avec très peu ou sans effets secondaires,
- facilement administrable,
- accessible à un prix abordable,
- et toujours disponible.

De nos jours, pour traiter toutes les formes de leishmanioses, il est souvent nécessaire de recourir aux agents chimiothérapeutiques. En guise de traitement de première ligne, des dérivés d’antimoine sont prescrits. Depuis 1940, ces composés, dérivés d’antimoine pentavalents (Sb^V), sont le principal traitement utilisé dans le monde entier contre la leishmaniose. Ils ont été synthétisés la première fois en 1945 à partir d’un mélange d’acide gluconique et d’acide stibionique [96]. Ces traitements sont généralement administrés par voie parentérale mais la voie intralésionnelle a également été envisagée [97]. Si le traitement à l’antimoine pentavalent échoue, les cliniciens ont recours aux traitements de seconde ligne qui sont les molécules connues sous les noms suivants : amphotéricine B, miltéfosine, pentamidine et paromomycine.

Ces molécules peuvent être également recommandées comme traitement de première ligne par exemple dans le cas où le patient est immunodéprimé. Cependant, ces traitements représentent des inconvénients reliés aux toxicités sévères qu'ils entraînent ainsi que leur coût élevé qui représente une véritable barrière pour les pays d'endémie. Généralement, ces limites sont associées au mode d'administration parentéral qui porte préjudice au patient vu qu'il exige une hospitalisation de longue durée durant laquelle le médicament est injecté par voie systémique. Comme alternative, la voie d'administration locale est parfois privilégiée. En effet, le traitement par voie locale est recommandé pour les formes simples de LC qui ne présentent pas de risque de complications nécessitant un traitement systémique.

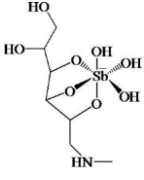
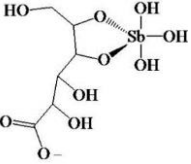
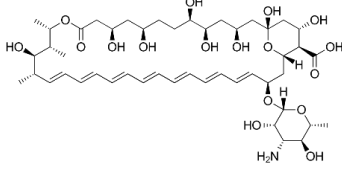
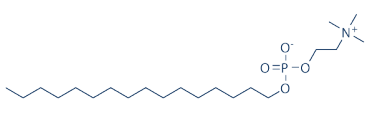
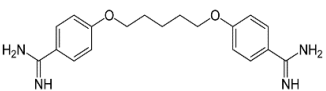
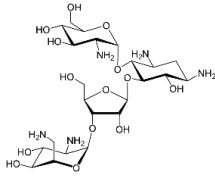
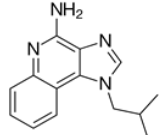
Les formulations pour une application topique offrent des avantages intéressants par rapport au traitement par voie parentérale tels que la réduction considérable des effets indésirables, l'augmentation de la concentration du médicament dans le site de la lésion, la facilité d'administration, ainsi que la rentabilité [98]. Cependant, une investigation du potentiel topique que présente un certain nombre de médicaments antileishmaniens est nécessaire. En effet, plusieurs molécules antileishmaniennes possèdent des propriétés physicochimiques qui ne sont pas compatibles avec une libération transdermique. Dans ce cas, une nouvelle stratégie doit être mise en œuvre afin d'améliorer leur pénétration cutanée. Les formulations topiques doivent donc tenir compte des propriétés physicochimiques de la molécule active, de leur effet sur l'absorption percutanée ainsi que de leur action sur la rétention ou la libération dans le site de l'infection au niveau du derme. Par conséquent, l'efficacité thérapeutique exige à la fois un profil de perméation adéquat ainsi qu'une activité pharmacologique importante [99,100].

a) Traitement de première ligne : Dérivés antimoniés

De nos jours, deux sels d'antimoine pentavalent (Sb^V) sont utilisés : le stibogluconate de sodium et l'antimoniote de méglumine. Ces deux molécules sont commercialisées, respectivement, sous les noms de Pentostam[®] (GSK) (dans les pays anglo-saxons) et Glucantime[®] (Sanofi) (dans les pays francophones et hispaniques) [101]. Le mécanisme d'action des Sb^V a été largement étudié (Tableau 1.3). En effet, les Sb^V s'activent par un mécanisme méconnu pour se convertir en antimoniés trivalents (Sb^{III}), ces derniers ayant une activité considérable contre les leishmanies. Ceci conduirait à définir les Sb^V comme des prodrogues. L'action antileishmanienne du Sb^{III} est possible *via* la fragmentation de l'ADN chez les espèces *Leishmania*, rappelant ainsi un processus similaire à l'apoptose [102,103].

Si les Sb^V sont les substances actives les plus utilisées contre les leishmanioses, c'est parce que leur efficacité thérapeutique est de 95 % dans les pays endémiques [99]. Néanmoins, une résistance est apparue en Inde (Bihar) pour la forme générique du stibogluconate de sodium, ce qui a entraîné une diminution de l'efficacité thérapeutique de près de 50 % [104].

Tableau 1.3 : La chimiothérapie actuelle ainsi que ses mécanismes d'action.

Molécule active	Nom commercial, voie d'administration, dose, durée traitement	Mécanismes d'action
 <p>Antimoniate de méglumine</p>	<p><u>Glucantime®</u> (solution)</p> <p>- IV ; 20 mg/kg/jour (21 j)</p> <p>- IL ; 0,2 - 0,8 mL / lésion (60 – 240 mg / lésion), 1 jour sur 2 (30 j)</p>	<p>- Le Sb^V s'active en Sb^{III} par des mécanismes méconnus</p> <p>- Sb^{III} et Sb^V sont médiateurs de la fragmentation de l'ADN des parasites : apoptose [102,103].</p>
 <p>Stibogluconate de sodium</p>	<p><u>Pentostam®</u> (solution)</p> <p>- IV ; 20 mg/kg/jour (21 j)</p> <p>- IL ; 0,2 - 0,8 mL / lésion (20 – 80 mg / lésion), 1 jour sur 2 (30 j)</p>	
 <p>Amphotéricine B</p>	<p><u>Fungizone®</u> (dispersion colloïdale)</p> <p>IV ; 0,6 – 1 g/kg/jour (4 semaines)</p>	<p>- Forme un complexe avec l'ergostérol de la membrane parasitaire, provoque la formation de pores, modifie de la perméabilité membranaire aux ions [105,106].</p>
 <p>Miltéfosine</p>	<p><u>Impavido®</u> (gélule)</p> <p>Orale, 150 mg/kg/jour (28 j)</p>	<p>- Interfère avec les mécanismes lipidiques du parasite [107].</p> <p>- Induit l'apoptose chez le parasite [107].</p>
 <p>Pentamidine</p>	<p><u>Pentacarinat®</u> (poudre)</p> <p>IM ; 4 mg/kg</p> <p>1 jour sur 2 (30-40 j)</p>	<p>- S'accumule dans la mitochondrie [108].</p> <p>- Inhibe la topoisomérase II mitochondriale [108].</p>
 <p>Paromomycine</p>	<p><u>Leishcutan®</u> (pommade)</p> <p>Topique ; 2 applications / jour (28 j)</p>	<p>- Cible les ribosomes [109].</p> <p>- Modifie la fluidité et la perméabilité des membranes mitochondriales [109].</p>
 <p>Imiquimod</p>	<p><u>Aldara®</u> (crème)</p> <p>Topique : 2 applications / jour (28 j) en combinaison avec un traitement à Sb</p>	<p>- Action immunomodulatrice [110]</p>

IV : voie intraveineuse, IL : voie intra-lésionnelle, IM : voie intramusculaire, Sb : antimoine.

Malgré leur efficacité thérapeutique importante, ces traitements présentent plusieurs inconvénients (coût élevé, résistance, effets secondaires) qui limitent leur utilisation. Leur administration se fait par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire. Durant toute la durée du traitement estimée à 4 semaines, une hospitalisation est donc nécessaire [88]. Le problème

réside alors essentiellement dans l'accès du patient à ce traitement qui voit son coût augmenter avec une hospitalisation de 4 semaines, la disponibilité des lits limitée ainsi que les jours de travail perdus. D'autre part, les antimoniés pentavalents sont considérés comme coûteux dans les pays en développement. Par exemple, un traitement au stibogluconate de sodium coûte 180-200\$. Son générique coûte 4 fois moins cher mais son usage soumet le patient, ainsi que la zone d'endémie, au risque de résistance [99] comme cela a été observé en Inde [88].

La dose recommandée d'antimoine par l'OMS est une dose journalière de 20 mg/kg sur une période minimale de 20 jours consécutifs [88]. Toutefois, une résistance a été observée lorsque la dose d'antimoine administrée était inférieure ou égale à 10 mg/kg/jour ou bien quand la période de traitement était réduite [101].

La longue période d'administration des antimoniés pentavalents n'est pas sans effet sur les patients. Elle provoque les effets secondaires suivants :

- la stibiointolérance : il s'agit des effets de type anaphylactique qui se manifestent chez les patients dès les premiers jours de traitement. On cite par exemple des douleurs abdominales, des nausées et vomissements, une diarrhée, des éruptions et démangeaisons, une fièvre, une toux, une tachycardie, une fatigue ... [11,99]
- la stibiotoxicité : il s'agit des signes qu'on observe en fin de cure, et qui sont généralement dus à une exposition à de fortes doses d'antimoine. Les patients peuvent présenter des troubles cardiaques, pancréatiques, rénaux, hépatiques et hémorragiques. Plus rarement, des effets neurologiques réversibles peuvent être constatés [11].

Afin de réduire ces effets indésirables, l'infiltration locale (ou injection intralésionnelle) à l'antimoine pentavalent au niveau des lésions de LC s'est avérée une option thérapeutique prometteuse. Il est à noter qu'une injection d'antimoine en sous-cutanée n'est pas convenable vu que la substance active est rapidement absorbée sans atteindre le site de l'infection [90]. Le but de l'injection intralésionnelle est de remplir la zone infectée du derme avec la substance active pour concentrer celle-ci au niveau du site de l'infection et limiter sa propagation dans d'autres tissus non ciblés. Ceci implique d'infiltrer soigneusement la zone autour de la lésion, y compris à la base de la lésion. La difficulté est d'atteindre le derme vu que l'espace entre les tissus est très petit. Les effets secondaires générés par le passage systémique du médicament sont ainsi limités. Néanmoins, dans ce cas, le traitement intralésionnel ne permet pas d'atteindre les sites d'infection métastatique [31,90]. L'efficacité thérapeutique de cette infiltration locale, notamment sur les souches de la LC de l'Ancien Monde, est très variable car la sensibilité est différente d'une souche de *Leishmania* à une autre. Dans ce contexte, une étude randomisée a été réalisée sur des patients infectés par *L. major* lors d'un essai clinique pour comparer

l'efficacité du Glucantime® selon le mode d'administration. Des injections intralésionnelles (0,2 à 0,8 mL / lésion tous les deux jours pendant 30 jours), correspondant à une dose de 60 à 240 mg/ lésion, ont été comparées aux injections intramusculaires (seulement 15 mg/kg/jour, 6 jours par semaine pendant 2 semaines). Dans ce cas, le mode d'administration n'a pas eu d'effet statistique sur l'efficacité du traitement [111]. Cependant, pour une infection à *L. tropica*, les injections intralésionnelles de Glucantime® semblent être moins efficaces que la voie intramusculaire [112].

Selon l'OMS, les injections intralésionnelles à l'antimoine pentavalent figurent parmi les options thérapeutiques à considérer lorsque la LC en question n'a pas tendance à évoluer vers des formes plus compliquées. Il est donc possible d'appliquer cette stratégie pour les lésions à *L. major*, *L. peruviana*, *L. mexicana*... [88], et lorsque [99] :

- les lésions ne sont pas des ulcères ouverts,
- il ne s'agit pas de plusieurs lésions,
- et les lésions ne se situent pas à proximité d'un canal lymphatique et/ou dans des zones difficiles à guérir (les articulations...).

b) Traitements de deuxième ligne

Généralement, les molécules suivantes sont prescrites lorsque les antimoniés pentavalents s'avèrent inefficaces.

- ***Amphotéricine B et ses formulations***

L'amphotéricine B est une molécule naturelle, de la famille des polyènes, qui a été isolée pour la première fois en 1955, à partir de *Streptomyces nodosus*. Cette molécule a la particularité d'interagir avec les stérols membranaires et plus précisément l'ergostérol. Ceci est l'explication principale de son efficacité contre les leishmanies. En effet, l'amphotéricine B est capable de former un complexe avec les stérols membranaires du parasite provoquant ainsi la formation de pores au niveau de la membrane. Il en découle la modification de la perméabilité ionique et causant ainsi la mort cellulaire [105,106] (Tableau 1.3).

Commercialisée sous le nom de Fungizone® (Bristol-Myers Squibb Co, Princeton, NJ.), elle se présente sous la forme d'une dispersion colloïdale de désoxycholate d'amphotéricine B. Fungizone® est largement utilisé pour le traitement antifongique de plusieurs infections dont *Candida albicans* chez le nouveau-né [113]. Ce n'est qu'au début des années 1960 que l'utilisation de l'amphotéricine B a été étendue au traitement des lésions de leishmaniose muco-cutanée ainsi que celles de la leishmaniose cutanée à risque de dissémination (LC du Nouveau Monde). Cette molécule a surtout été prescrite aux Etats-Unis où les antimoniés pentavalents ne sont pas autorisés par la FDA à cause de leur toxicité [114]. Dans l'état du Bihar, en Inde,

les injections à l'amphotéricine B ainsi que la pentamidine, ont montré une efficacité importante pour le traitement des patients atteints de parasites résistants au stibogluconate de sodium [115]. Cependant, les propriétés physicochimiques de l'amphotéricine B ne font pas de cette molécule le traitement idéal. En effet, elle appartient à la famille IV de la classification des systèmes biopharmaceutiques [116]. Sa solubilité très limitée dans l'eau (< 1mg/L ; pH 6–7) ainsi que sa perméabilité membranaire très réduite en raison de sa masse molaire relativement élevée (924 g/mol) constituent des freins à sa biodisponibilité [113]. De plus, en raison de son absorption gastrointestinale très faible, l'amphotéricine B libre ne peut pas être administrée par voie orale [117]. L'administration se fait alors par voie intraveineuse. L'injection est préparée habituellement dans du désoxycholate de sodium qui a le rôle d'agent dispersant [113]. Cette voie d'administration a plusieurs inconvénients tels que la douleur locale, l'hospitalisation du patient, la surveillance médicale ainsi que le coût élevé qui en découle [118]. Les effets secondaires de ce traitement ne sont pas négligeables. L'un des plus fréquents est une néphrotoxicité importante pouvant aller jusqu'à une insuffisance rénale. Généralement, ceci entraîne la difficulté d'observance thérapeutique ainsi qu'un échec éventuel du traitement [114].

Afin de pallier les problèmes de toxicité, cette même molécule a été formulée sous différentes formes. Les formulations développées et commercialisées sont à base de lipides, et sont l'amphotéricine B sous forme liposomale (AmBisome®), les complexes lipidiques d'amphotéricine B (Abelcet®) et les complexes d'amphotéricine B associé à du sulfate de cholestérol (Amphocil®). Ces trois médicaments ont démontré leur capacité à réduire les effets indésirables notamment la néphrotoxicité de la forme conventionnelle d'amphotéricine B (Fungizone®). De plus, ils permettent d'augmenter les doses administrées aux patients [119–124].

L'usage clinique a privilégié la forme liposomale (AmBisome®) qui a prouvé un indice thérapeutique élevé notamment pour le traitement de la forme viscérale à une dose unique élevée (7,5 à 10 mg / kg) [125]. Néanmoins, l'usage d'AmBisome® pour le traitement des LC n'est pas systématique car son efficacité n'a toujours pas été confirmée [126]. Par ailleurs, l'utilisation de l'AmBisome® comme un traitement de première intention reste un privilège des pays développés notamment les Etats-Unis. En effet, l'exigence de la chaîne de froid ainsi que le coût élevé (18\$ par flacon, prix négocié *via* le programme de donation de l'OMS [127]) rendent difficiles l'accès et la disponibilité de cette formulation dans les pays défavorisés où les leishmanioses sont endémiques [128]. De plus, après de nombreuses années d'usage clinique, une résistance à l'AmBisome® a été détectée en 2017 [129].

Dans certaines études, les formulations d'amphotéricine B, notamment l'Amphocil® ou encore l'Abelcet®, ont été testées sur des modèles de LC expérimentale mais en administration topique.

Ces formulations ont été dispersées dans des solutions aqueuses contenant 5 à 25 % d'éthanol et ont démontré un effet curatif à la suite d'un traitement par voie topique sur une période de 21 jours. Toutefois, le même traitement à la Fungizone[®] n'a eu aucune efficacité thérapeutique [130]. À la suite de cette étude, un essai clinique a été réalisé avec de l'Amphocil[®] dispersé dans une solution d'éthanol à 5 %. La guérison des lésions de LC a été accélérée par le traitement à l'amphotéricine B topique pour 16 patients sur 17. Un seul patient a présenté la même évolution que celle du traitement par le placebo. Ceci est dû au fait que ses lésions au début du traitement étaient ulcérées et plus profondes que pour les autres patients [131]. Par conséquent, l'amphotéricine B sous forme de dispersion colloïdale (l'Amphocil[®]) administrée par voie topique pourrait présenter un traitement alternatif des lésions de LC à un stade précoce. Dans ce contexte, en 2011, un brevet (WO2012042072) a été déposé par une équipe de recherche de l'Université de Madrid concernant la dispersion de l'Amphocil[®] dans une solution éthanolique pour une éventuelle application topique [132].

D'autre part, une formulation nano-liposomale à l'amphotéricine B de taille moyenne de 100 nm (appelée Sina AmphoLeish[®]) a été développée en Iran et a fait l'objet d'un dépôt de brevet (US Patent application number: US 20150147382A1). Récemment, cette formulation a démontré une activité intéressante *in vitro* sur les souches de l'Ancien Monde notamment *L. major* et *L. tropica*. Cependant, son efficacité thérapeutique n'a été validée que pour la souche *L. major* dans le modèle expérimental de LC chez les souris [133]. Une étude récente réalisée par Eskandari *et al.* a évalué le risque d'irritation par cette formulation sur la peau des lapins (Draize test) [134]. En appliquant 0,4% du gel Sina Ampholeish[®] sur la peau de lapins néo-zélandais albinos rasés, aucune réaction cutanée n'a été observée jusqu'à 72 heures après le traitement. Les peaux ne présentaient ni érythèmes ni œdèmes. De plus, aucune différence significative n'a été constatée dans le groupe traité au gel Sina Ampholeish[®] par rapport aux groupes traités au placebo (liposomes sans amphotéricine B) et au groupe contrôle (traité au tampon phosphate). Les résultats de cette étude montrent que la formulation Sina Ampholeish[®] est sans danger et pourrait être testée sur l'Homme dans des essais cliniques ultérieurs [134].

- **Miltéfosine**

La miltéfosine ou hexadécylphosphocholine (HePC), commercialisée sous le nom Impavido[®], est le premier traitement par voie orale contre les leishmanioses (Tableau 1.3). A l'origine, il s'agit d'un traitement antitumoral oral qui inhibe la biosynthèse des phospholipides et interfère avec les voies de transduction du signal cellulaire. Toutefois, son action sur les leishmanies reste méconnue. Il a été décrit que la miltéfosine est capable d'interférer avec les mécanismes lipidiques chez le parasite et induire ainsi un phénomène d'apoptose chez celui-ci [107]. Utilisée communément pour traiter les formes viscérales, cette molécule a prouvé une efficacité

thérapeutique en Inde avec un taux de guérison de 94 % [135]. Néanmoins, son efficacité pour le traitement des formes cutanées par voie orale n'est toujours pas confirmée [90]. En effet, il a été démontré que la sensibilité à ce traitement diffère considérablement d'une espèce de *Leishmania* à une autre (Tableau 1.4).

- **Sensibilité des espèces du Nouveau Monde à la miltéfosine :**

En 2001, un premier essai clinique évaluant l'efficacité de la miltéfosine contre les lésions de LC (à *L. amazonensis*) a été réalisé sur des soldats colombiens en utilisant un essai ouvert avec un schéma posologique augmentant les doses de 50 mg/jour pendant 20 jours à 150 mg/jour durant 28 jours. Le taux de guérison constaté était de 81 % pour la dose la plus élevée et 60 % pour la plus faible [136]. En 2008, une autre étude a comparé l'efficacité thérapeutique de la miltéfosine (pour 44 patients ayant reçu 2,5 mg/kg/jour pendant 28 jours) à celle de l'antimoine administré par voie intramusculaire (pour 18 patients ayant reçu 20 mg/kg/jour pendant 20 jours) pour traiter la LC provoquée par *L. braziliensis* en Bolivie. Le taux de guérison était de 94 % pour l'antimoine contre 88 % pour la miltéfosine. Cette différence n'est pas considérée comme significative [137]. Cependant, les données montrent que l'efficacité de la miltéfosine est différente au sein d'une même espèce de *Leishmania* appartenant à différentes zones géographiques [138]. En effet, une étude réalisée sur la même souche provoquant la LC (*L. braziliensis*) mais au Guatemala a donné un taux de guérison largement inférieur (33 %) [139].

- **Sensibilité des espèces de l'Ancien Monde à la miltéfosine :**

Dans ce contexte, la sensibilité de l'espèce *L. major* qui existe en Iran a été comparée entre des patients traités à la miltéfosine orale (à 2,5 mg/kg/jour pendant 28 jours) et des patients traités à l'antimoniote de méglumine par voie intramusculaire (20 mg/kg/jour pendant 14 jours). Le taux de guérison constaté était de 81,3 % et 80,6 %, respectivement pour la miltéfosine et l'antimoine [140]. Néanmoins, pour une même durée de traitement (20 jours au lieu de 14 jours), l'efficacité du traitement à l'antimoine serait moins intéressante [138]. Dans une autre étude rétrospective et observationnelle, 88 % des patients militaires néerlandais atteints de LC à *L. major* ont guéri suite à l'administration orale de la miltéfosine [141].

Parmi les effets indésirables signalés associés à l'administration orale de miltéfosine, on retrouve essentiellement les nausées, les vomissements, la diarrhée ainsi que les douleurs abdominales. Ces effets secondaires ont été observés chez 21 à 60 % des patients [136,137,139,140,142,143]. Dans la majorité des cas, ces effets ne sont pas graves et s'estompent avec le temps. En comparaison avec l'antimoine pentavalent, l'incidence des effets

indésirables est à peu près similaire puisqu'elle atteint les 70 % pour les deux traitements [142], ou moins fréquente mais plus grave, à l'exception des troubles gastrointestinaux [143]. Il est également à noter que la miltéfosine est tératogène et ne peut donc pas être prescrites aux femmes enceintes ou allaitantes [138]. D'autres essais cliniques contrôlés portant sur différentes espèces de *Leishmania* sont indispensables, afin de pouvoir proposer la miltéfosine en tant que traitement de routine contre la LC.

Tableau 1.4 : Essais cliniques mettant en évidence l'efficacité de la miltéfosine par espèce de *Leishmania* et par traitement par rapport à l'antimoine pentavalent dans le Nouveau Monde.

Dose de miltéfosine administrée	Espèce de <i>Leishmania</i>	Taux de guérison pour la miltéfosine	Taux de guérison pour l'antimoine pentavalent	Essai clinique et pays
De 50 mg/jour (20 j) à 150 mg/jour (28 j)	<i>L. panamensis</i>	72 %	-	Ouvert non contrôlé Colombie [136]
	<i>L. amazonensis</i>	64 –100 %		
2,5 mg/kg/jour (28 j)	<i>L. panamensis</i>	91 %	38 %	A double-insu contrôlé par placebo Colombie et Guatemala[139]
	<i>L. mexicana</i>	64 %	21 %	
	<i>L. braziliensis</i>	33 %	21 %	
2,5 mg/kg/jour (28 j)	<i>L. major</i>	81,3 %	80,6 %	Ouvert randomisé Iran [140]
2,5 mg/kg/jour (28 j)	<i>L. braziliensis</i>	88 %	94 %	Ouvert randomisé Bolivie [137]
150 mg/jour (28 j)	<i>L. panamensis</i>	60 %	71,9 %	Ouvert randomisé Colombie [143]
	<i>L. braziliensis</i>	49 %	65,4 %	
2,5 mg/kg/jour (28 j)	<i>L. braziliensis</i>	75 %	53 %	Ouvert randomisé Brésil [142]
2,5 mg/kg/jour (28 j)	<i>L. guyanensis</i>	71 %	54 %	Ouvert randomisé Brésil [146]

Quant à la miltéfosine par voie locale, actuellement, elle est approuvée et commercialisée sous le nom de Miltex[®] dans 22 pays. Elle appartient à la classe des antimitotiques locaux et sert à traiter les métastases cutanées du cancer du sein. Miltex[®] est composé de 6 % de miltéfosine dans un véhicule composé de de 3-propyloxypropylène glycol, de 3-hexylpropylène glycol et de 3-nonylpropylène glycol [144]. Jusqu'à ce jour, aucune étude clinique ni observationnelle n'a été rapportée dans la littérature sur l'efficacité du Miltex[®] pour le traitement des lésions de LC. Selon la communication personnelle de Bachmann, cette formulation n'a pas d'activité pharmacologique suite à deux essais cliniques, l'un en Syrie (16 patients) et l'autre en Colombie (19 patients) [145]. Néanmoins, des études précliniques chez l'animal ont démontré un potentiel thérapeutique du Miltex[®] dans le traitement des infections expérimentales à *L. mexicana* et à *L.*

major, notamment pour réduire significativement la taille des lésions et entraîner la guérison [147]. Ces deux observations cliniques contradictoires pourraient être dues soit à une absence de pénétration de la substance active dans la lésion, soit à une posologie ou une durée de traitement insuffisante ou encore à une formulation de la miltéfosine pas adaptée pour la voie topique [148].

- **Pentamidine**

La pentamidine est une diamine aromatique ayant prouvé une activité importante chez certains protozoaires comme les trypanosomes africains, les *Leishmania* et le champignon *Pneumocystis jiroveci* (Tableau 1.3) [90]. La pentamidine agit sur les parasites *Leishmania* en s'accumulant considérablement au niveau des mitochondries parasitaires. Elle favorise ainsi l'inhibition du complexe de la chaîne respiratoire de la mitochondrie [108].

Depuis 1950, et pendant des années, cette molécule a été utilisée pour traiter la forme viscérale de leishmaniose. Jusqu'en 1980, en France, le traitement consistait à alterner les antimoniés pentavalents et la pentamidine, auparavant commercialisée sous forme de mésylate de pentamidine (Lomidine[®], Sanofi), sur une période de 45 jours [149]. Afin de réduire ses effets secondaires, le mésylate de pentamidine a été remplacé par l'iséthionate de pentamidine commercialisé sous le nom de Pentacarinat[®], et ce vers la fin des années 1980. Le Pentacarinat[®] est communément prescrit contre la forme de leishmaniose cutanée du Nouveau Monde (sud-américaine), plus précisément celle causée par l'espèce *L. guyanensis*. En effet, pour cette dernière, la pentamidine représente le traitement de première intention puisque cette espèce semble avoir acquis une certaine résistance à l'antimoine [90]. En Guyane Française, où *L. guyanensis* cause près de 90 % des cas de LC [150], le traitement a consisté en deux injections intramusculaires (à jours 1 et 4) de 4 mg/kg de pentamidine [151]. En Colombie, une étude a été réalisée sur des patients atteints de LC à *L. panamensis*, *L. braziliensis* et *L. mexicana* afin de comparer l'efficacité de la pentamidine (Pentacarinat[®]) par rapport à l'antimoine pentavalent (Glucantime[®]). Il a été déduit qu'un traitement de courte durée et à faible dose de Pentacarinat[®] entraînait un taux de guérison de 96 % qui est considéré équivalent au traitement au Glucantime[®] (91 %). Le taux des effets secondaires est également comparable [152]. Le traitement à la pentamidine à faible dose et à court terme semble être intéressant notamment pour les patients immunodéprimés atteints de LC. De plus, tous les effets indésirables semblent être réversibles [153].

Le taux d'échec du traitement à la pentamidine dépend fortement du stade d'évolution de la maladie. En effet, il est de 5 % si la maladie est à son premier mois d'évolution. Ce risque d'échec est multiplié par 5 pour un traitement plus tardif [151]. Les effets indésirables les plus connus pour un traitement à la pentamidine sont l'hypotension, l'hypoglycémie et la

néphrotoxicité (de l'azotémie asymptomatique à l'insuffisance rénale) [154]. D'autres effets indésirables pourraient être observés tels que l'arythmie, les nausées, les vomissements, les diarrhées, la leucopénie, l'anémie, la thrombocytopénie, toux et bronchospasme et hépatite aiguë. Des altérations neurologiques telles que les névralgies, la confusion et les hallucinations ont été également rapportées [90]. Néanmoins, en dépit de l'efficacité thérapeutique qu'elle a prouvée, cette molécule se trouve totalement abandonnée à cause de l'apparition de résistances [155].

- ***Paromomycine***

La paromomycine est un antibiotique appartenant à la famille des aminoglycosides (Tableau 1.3). Cette molécule a été isolée à partir de la bactérie *Streptomyces rimosus* var. *paromomycinus*. Son action toxique sur les parasites a conduit à son utilisation pour traiter plusieurs maladies comme l'amébose intestinale ainsi que la leishmaniose, notamment la forme viscérale [156]. Dans une étude de phase III en Inde, le traitement à la paromomycine parentérale a été associé à un taux de guérison de 94,6 %, considéré identique à celui de l'amphotéricine B. Néanmoins, les effets indésirables ont été 3 fois plus observés chez le groupe traité à la paromomycine (6 % *versus* 2 % pour le groupe traité à l'amphotéricine B). Ils se manifestent par une augmentation des transaminases hépatiques, une ototoxicité, une douleur au site de l'injection et, plus rarement, par une néphrotoxicité [157].

Le mécanisme d'action de cet antibiotique se baserait sur l'inhibition de la biosynthèse des protéines. Sa cible principale étant les ribosomes, il pourrait également cibler des fonctions clés de la mitochondrie. En effet, la paromomycine permettrait de modifier la fluidité et la perméabilité des membranes mitochondriales du parasites, ce qui conduirait à l'altération de celle-ci [109].

Pour le traitement de la LC, des formes galéniques topiques ont été développées. Les avantages que présentent ces formes sont d'abord d'épargner les effets de toxicité systémique causés par l'administration parentérale de la paromomycine, le coût réduit ainsi que la commodité. De plus, ces formes ont prouvé une efficacité thérapeutique considérable et ont montré que la paromomycine en application topique pouvait être considérée comme un traitement alternatif à LC [99]. Selon l'OMS, pour les formes de LC où le risque d'atteindre des muqueuses est négligeable (notamment les espèces de l'Ancien Monde), ces formes topiques sont recommandées seulement au cas où les lésions sont de petite taille et ne sont pas situées sur une zone inesthétique (visage) ou difficile à traiter (articulation) [88]. La pommade « de première génération » se présente sous forme de 15 % de paromomycine dans de la paraffine blanche avec 12 % de chlorure de méthylbenzéthonium qui sert de promoteur d'absorption ainsi que d'antiseptique. Des travaux au début des années 1980 ont démontré que cette pommade a une

efficacité importante pour le traitement des lésions de LC à *L. major* [158]. En 1992, un essai clinique a prouvé que cette pommade peut assurer un taux de guérison de 77 % contre 27 % pour le placebo et, ce, pour la souche *L. major* [159]. Cette pommade existe sur le marché sous le nom Leishcutan[®] produite par Teva Pharmaceuticals. Malgré son efficacité, cette pommade n'a pas été largement utilisée en raison de son coût élevé (\$348,70 en 2019) [99]. Par ailleurs, son efficacité n'a pas été prouvée pour les lésions à *L. tropica* [160]. De plus, des effets indésirables ont déjà été observés, notamment une irritation cutanée et une pigmentation locale [161,162]. Ces effets ont été associés à l'utilisation du chlorure de méthylbenzéthonium en tant qu'agent tensioactif [163]. Pour pallier ces problèmes, le chlorure de méthylbenzéthonium a été remplacé par l'urée à 10 %. Récemment, un essai clinique, réalisé dans une zone d'endémie à *L. major* en Iran, a démontré que pour cette pommade de deuxième génération le taux de guérison n'a pas été amélioré par rapport à la pommade de première génération. Cependant, en remplaçant le chlorure de méthylbenzéthonium par l'urée, la guérison a été accélérée. Cette pommade est actuellement commercialisée en Iran par le laboratoire Razak Labs à Téhéran [164]. Dans un essai clinique plus récent, les deux pommades à la paromomycine (l'une au chlorure de méthylbenzéthonium et l'autre à l'urée) en application topique à raison de deux fois par jour pendant 30 jours, ont été comparées au traitement par l'antimoine pentavalent en systémique (administré à 20 mg/kg/jour pendant 10 jours) contre la souche *L. panamensis*. Le taux de guérison après 6 semaines du début du traitement a été de 48,3 % (chlorure de méthylbenzéthonium), 40 % (urée) et 80,6 % (Sb^V). Néanmoins, à 12 semaines, il s'est considérablement amélioré passant à 79,3 %, 70 % et 91,7 %, respectivement. A ce stade, la différence du taux de guérison entre les 3 groupes est statistiquement non significative. D'autre part, le taux de rechute pour les trois traitements a été également identique pour les différents groupes. Cependant, des effets indésirables ont été fréquemment observés localement par l'application des deux pommades à raison de 20 % pour celle formulée avec le chlorure de méthylbenzéthonium et à 40 % pour celle formulée avec l'urée [165].

D'autres formulations pour voie topique sont également en cours de développement, dont la plus importante est une crème qui a fait l'objet du brevet (WR 279 396) [166]. Ce dernier porte sur une formulation conçue par l'institut de recherche de l'armée Walter Reed (Washington, Etats-Unis). Cette crème est composée de 15 % de paromomycine et de 0,5 % de gentamicine contenus dans un véhicule hydrophile qui comporte 10 tensioactifs [145]. Une étude clinique de phase III a été réalisée à l'Institut Pasteur de Tunis suite aux résultats prometteurs de l'efficacité de la crème WR 279 396 pour le traitement de la LC à *L. major* démontrée lors d'une étude de phase II menée entre la Tunisie et la France en 2009 [166]. Un groupe de 375 patients de « Sidi Bouzid », une région endémique de la leishmaniose à *L. major*, a été traité par trois types de crème : l'une contenant 15 % de paromomycine avec 0,5 % de gentamicine (WR

279 396), la seconde contenant uniquement 15 % de paromomycine et la troisième ne contenant ni paromomycine ni gentamicine comme contrôle (le placebo). Chaque lésion a été traitée par application d'une crème une fois par jour pendant 20 jours. A la fin de la période de traitement, les taux de guérison atteints étaient de 81 %, 82 % et 58 %, respectivement pour ces 3 groupes. De plus, contrairement au groupe traité avec le placebo, les deux autres groupes n'ont pas présenté de surinfections bactériennes. Ceci a été associé au rôle antibactérien de la paromomycine. En outre, cette formulation hydrophile a permis à la paromomycine seule ainsi qu'à la paromomycine associée à la gentamicine d'avoir une exposition systémique inférieure à 10 % par rapport à celle observée durant un traitement à la paromomycine injectée en intramusculaire. Les effets indésirables sont presque absents vu qu'il n'y a eu aucun effet néphrotoxique ou ototoxique cliniquement significatif [167]. Les effets indésirables se sont limités à des réactions locales éphémères et très légères reportées chez moins de 30 % des patients [168].

Dans une autre étude clinique, Ben Salah *et al.* ont également rapporté un taux de guérison se situant entre 80 % et 90 % au 50^{ème} jour de traitement topique avec la crème WR 279 396 [169]. Cette dernière a de plus permis d'induire une baisse significativement importante de la charge parasitaire dans les lésions pouvant atteindre 77 fois moins de parasites dans le derme profond entre le 1^{er} et le 10^{ème} jour de traitement. Cette baisse de charge parasitaire au niveau du derme est considérée équivalente à celle observée dans la rate de patients atteints de leishmaniose viscérale traitée à l'antimoine par voie parentérale [169]. Ce résultat est considéré comme exceptionnel puisqu'il s'agit de la première étude qui mesure la charge parasitaire localement chez des patients atteints de LC [168].

Ces différentes études sont une preuve qu'une crème à base de paromomycine seule ou additionnée de gentamicine est un traitement alternatif et efficace contre la LC à *L. major* de Tunisie sous sa forme ulcérée. D'autres études cliniques sont indispensables pour vérifier son efficacité sur les autres souches de leishmanies de l'Ancien Monde.

- ***L'imiquimod***

L'imiquimod est un dérivé d'imidazoquinoléine commercialisé sous le nom d'Aldara® par 3M Pharmaceuticals (Tableau 1.3). Il s'agit d'une crème à 5 % d'imiquimod contenant divers excipients comme la paraffine, le glycérol et de la gomme xanthane et possédant une action immunomodulatrice [110]. En application topique, cette crème est utilisée pour traiter les verrues génitales provoquées par le virus du papillome humain. L'imiquimod induit une réponse immunitaire locale au niveau du site d'application par stimulation de la production des cytokines et d'oxyde nitrique dans les macrophages. La crème a prouvé également un effet sur

les infections expérimentales induites par les souches *Leishmania* provoquant la forme cutanée de la maladie [110]. En combinaison avec une chimiothérapie à l'antimoine pentavalent, cette formulation a prouvé son efficacité pour traiter des patients atteints de LC à *L. peruviana* et ne répondant pas à un traitement à l'antimoine pentavalent seul. Le taux de guérison a atteint 90 % après 6 mois de suivi des patients [170]. Toutefois, d'autres études sur les souches de la LC de l'Ancien Monde ont montré l'échec de la même crème à l'imiquimod en tant que traitement topique des lésions [171]. Ceci prouve que l'imiquimod est un traitement espèce-dépendant.

D'autres investigations sont donc nécessaires pour confirmer l'efficacité de la crème surtout en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques pour traiter les lésions de LC.

II.2.4. Les nouveaux axes de recherche

La recherche scientifique s'intéresse à de nouvelles pistes soit pour améliorer l'efficacité thérapeutique des molécules antileishmaniennes déjà existantes *via* de nouvelles formes d'administration, soit pour montrer un potentiel antileishmanien de molécules utilisées à d'autres fins thérapeutiques.

a) Développement de formes topiques

L'amphotéricine B a fait l'objet de plusieurs études pour améliorer son efficacité antileishmanienne *via* une administration topique. Ainsi, Pinheiro *et al.* [172] ont démontré que des souris traitées localement avec une formulation à l'amphotéricine B à 3 % et à l'acide oléique à 5 % dans un système d'émulgel comme promoteur d'absorption cutanée, ont manifesté une réponse thérapeutique positive, avec une diminution de la taille des lésions, une réduction de la charge parasitaire au niveau de la peau lésée, une guérison et une non viscéralisation de la LC à *L. major*. Ainsi, cette formulation topique est un candidat potentiel pour le traitement alternatif de la leishmaniose cutanée car elle offre une toxicité systémique réduite [172].

Par ailleurs, un complexe d'amphotéricine B et de gamma cyclodextrine a été développé [173]. Ce complexe a été testé *in vitro* sur les parasites *Leishmania* et a prouvé une activité 2 fois plus élevée que celle du Fungizone®. Ainsi, le complexe a été inclus dans deux types de gels (gels dérivés de cellulose et gels de Carbopol) et la formulation testée en administration topique sur le modèle expérimental de LC à *L. amazonensis*. La diminution de la taille des lésions a été statistiquement significative à partir de la 7^{ème} semaine de traitement. Ce résultat illustre la faisabilité d'une formulation topique physiquement et chimiquement stable sur 6 mois, sûre et efficace contre la LC ainsi que diverses infections cutanées [173].

Dans le contexte de la recherche de nouvelle molécule antileishmanienne, l'herbicide à base de dinitroaniline, la trifluraline, est un composé qui a démontré une activité antileishmanienne

in vitro. Une formulation topique à 15 % de trifluraline a prouvé des effets inhibiteurs sur le développement des lésions à *L. major* et à *L. mexicana* chez des souris BALB/c [174].

En outre, d'autres formulations topiques ont fait l'objet d'essais cliniques, mais de nombreux résultats semblent équivoques. D'autres études sont en cours de réalisation afin de mettre en évidence de nouveaux traitements topiques contre la LC. On cite, par exemple, les études sur la quinacrine, le miconazole, le clotrimazole, la chlorpromazine, l'amphotéricine ainsi que la crème à l'ail [175].

b) La nanovectorisation

Le succès de la vectorisation de l'amphotéricine B sous forme de liposomes (AmBisome®) a fait de la nanomédecine une nouvelle piste pour la recherche scientifique pour le traitement des leishmanioses. De plus, parmi les nouvelles molécules actives contre le parasite *Leishmania*, plus de 90 % ayant l'efficacité thérapeutique d'un éventuel médicament antileishmanien présentent des propriétés physicochimiques inadéquates, notamment la très faible solubilité dans l'eau [176]. L'encapsulation dans des systèmes de libération nanométriques représente alors une approche alternative et prometteuse qui permet de contourner ce problème de solubilité [100,177].

La paromomycine a été encapsulée sous forme de transférosomes à base de lécithine de soja, de cholates de sodium et d'éthanol et la formulation testée en application topique pendant 4 semaines sur les lésions de LC à *L. major* développées chez des souris BALB/c. Cette crème a été efficace pour limiter la taille des lésions ainsi que pour réduire significativement la charge parasitaire au niveau de la rate des souris infectées [178]. Dans la même optique, le Glucantime® a été encapsulé dans le « cœur » aqueux de nanocapsules polymères ayant une coque en polymère biocompatible et biodégradable à base d'acide polylactique (PLA). Ce système a prouvé son efficacité pour réduire la toxicité cellulaire dans le traitement de la leishmaniose. En effet, il a permis de contourner les effets de toxicité systémique provoquée par la chimiothérapie à l'antimoine. Ce dernier, lorsqu'il est encapsulé dans le système de nanoparticules est transporté et concentré exclusivement dans les cellules infectées (macrophages). Ce système a fait l'objet du brevet WO 2015 177820 [179].

L'hydroxyméthylnitrofurazone (NFOH), une molécule candidate pour une activité antileishmanienne, a été encapsulée dans des nanoparticules de poly(n-butylcyano-acrylate) avec un rendement de ~ 65 %. Ces nanoparticules ont prouvé leur efficacité *in vitro* contre les deux formes du parasite, promastigote et amastigote, avec une concentration d'inhibition à 50 % (IC₅₀), c'est-à-dire la concentration de nanoparticules correspondant à une inhibition de 50 % de parasites, de 0,33 µM et de 4,90 µM, respectivement. La toxicité *in vitro* est 49 fois plus importante pour le NFOH libre que pour le NFOH encapsulé. L'activité de ces nanoparticules

a révélé une très grande efficacité pour une libération qui cible les macrophages. A ces propos, les auteurs ont déposé une demande de brevet BR 10 2014 007923-8 [180].

Dans la littérature, plusieurs travaux ont rapporté le potentiel des nanoparticules inorganiques pour le traitement de la leishmaniose, notamment sur des modèles d'expérimentation animale. En guise d'exemple, une activité intéressante de nanoparticules de sélénium dans l'inhibition de la prolifération des *L. major*, aussi bien sous leur forme amastigote que promastigote, a été rapportée. En outre, à la suite de l'administration de ces nanoparticules de sélénium aux souris BALB/c infectées par *L. major*, les auteurs ont constaté une inhibition de la croissance des lésions [181].

c) *La combinaison thérapeutique de nanovecteurs et de substances naturelles*

Dans une étude récente, l'activité antileishmanienne de nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane en combinaison avec l'huile essentielle de la plante *Nigella sativa* obtenue par plusieurs méthodes d'extraction a été testée *in vitro* contre la souche *L. tropica*. Une efficacité importante a été observée pour cette combinaison de traitement et ce tant pour les formes amastigotes que promastigotes du parasite. La combinaison thérapeutique des nanoparticules avec l'huile essentielle a multiplié l'efficacité thérapeutique de 1,5 à 25 fois par rapport à celle des traitements pris séparément. En outre, la toxicité a été réduite à son niveau minimal [182]. Dans une autre étude réalisée en 2013, les auteurs ont combiné des nanoparticules d'or à un composé bioactif, la quercétine, un flavonoïde extrait de plantes, afin de renforcer l'activité antileishmanienne. Ce système a démontré une activité très intéressante notamment sur des souches chimiorésistantes. L'indice de sélectivité a montré que ce système n'était pas toxique pour le macrophage [183]. Enfin, en 2015, une équipe brésilienne a pu incorporer la chalcone, une molécule naturellement synthétisée par plusieurs plantes, dans un système de nanoémulsion pour une éventuelle application topique pour traiter les lésions de LC. Cette NE a amélioré considérablement l'activité de la chalcone contre les amastigotes intracellulaires dans les cellules THP-1. En outre, cette formulation a démontré à la fois une bonne stabilité et un maintien de l'activité antileishmanienne au cours du temps [184].

II.3. Conclusion

La seconde partie de cette revue bibliographique montre qu'en dépit des avancées de la recherche scientifique pour le développement de traitements contre la LC, ceux-ci restent limités en termes d'efficacité et de sécurité pour les patients. Par ailleurs, le coût reste la barrière principale à l'usage de ces formulations qui restent peu accessibles aux populations les plus démunies et les plus touchées par cette maladie. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules actives à partir des substances naturelles, abondamment présentes dans la nature, représente une approche attrayante.

Section III. Approche alternative pour le traitement de la leishmaniose cutanée : la phytothérapie

III.1. La phytothérapie

Face à l'impasse thérapeutique dans laquelle se trouve la LC et compte tenu des inconvénients que présentent les médicaments existants et même ceux en cours de développement, la conception de nouvelles formulations, moins ou pas toxiques, plus rentables, avec une efficacité thérapeutique élevée et une résistance limitée, mais surtout à un prix abordable accessible aux populations les plus démunies, devient une nécessité.

L'OMS conçoit le médicament idéal comme répondant aux exigences suivantes [185] :

- son efficacité thérapeutique est confirmée à toutes les phases de la maladie,
- son coût n'est pas élevé,
- il n'induit pas de résistance,
- il répond à une seule dose ou à de multiples petites doses,
- il n'induit pas un effet collatéral ou tératogène,
- son administration ne nécessite pas d'hospitalisation.

En outre, l'OMS reconnaît que l'ultime solution pour combattre les maladies négligées, dont les leishmanioses, réside dans les connaissances traditionnelles et dans le développement de nouveaux médicaments dérivés des produits issus de la biodiversité [185]. En effet, on estime que 80 % des habitants de la planète dépendent des médicaments dits « traditionnels » pour se soigner [186]. Selon l'OMS, l'harmonisation des médecines traditionnelles et modernes devrait être un principe fondamental adopté par les pharmacologues pour le développement de nouveaux médicaments [185].

L'utilisation des plantes aromatiques et médicinales est devenue, notamment pour les populations défavorisées, une alternative aux services de santé, plus particulièrement, dans les zones rurales dépourvues de services publics de santé [187]. Cette tendance s'est étendue ces dernières années dans les zones urbaines, où les soins par les plantes médicinales servent d'option ou de complément à des médicaments allopathiques. De plus, avec l'émergence des résistances, notamment l'antibiorésistance, et avec les toxicités dues aux traitements actuels prescrits, l'usage des plantes devient de plus en plus répandu [188].

Tagboto et Towson ont décrit comme un défi la procédure de validation de l'utilisation d'un médicament à base plantes. Ceci inclut la découverte de nouveaux médicaments et aussi la certification de plantes déjà utilisées [189].

III.2. La pratiques de la médecine traditionnelle pour traiter la leishmaniose cutanée

III.2.1. Habitudes et croyances des populations pour traiter les lésions de leishmaniose cutanée

Selon l'étude réalisée par Bennis et ses collègues au Maroc, il existe plus de trente façons de traiter les lésions de LC [190]. Les participants à cette enquête ont cité des produits alimentaires à appliquer directement sur les lésions comme le miel, l'huile, les œufs, le thé, le sel, le vinaigre et le piment. Ils ont également mentionné des produits toxiques comme le white spirit, l'alcool, le savon, le goudron, l'eau de javel et l'essence. Ils peuvent même utiliser des comprimés périmés écrasés qu'ils appliquent directement sur les plaies. Aussi, il a été souvent reporté l'usage de la chaleur tant par les patients qui se brûlent eux-mêmes, que par les tradipraticiens qui appliquent de la poudre de soufre sur les lésions afin de les brûler. Enfin, les patients dans la région d'Erachidia au Maroc lavent souvent les lésions à l'eau provenant des sources naturelles. Ils mettent aussi du sable sur les lésions [190]. En Bolivie, le peuple chimane a tendance à appliquer du feu sur les lésions. Ils ne mettent jamais de l'eau dessus. D'autres, s'interdisent de manger du sel et de l'huile [191]. Les populations atteintes de LC en Amazonie s'imposent également un régime alimentaire. Cette population a une perception différente de la maladie. En effet, ils s'interdisent de manger du sel ainsi que du piment. Vu que la gravité de l'ulcère est associée à sa profondeur, les malades de LC croient qu'ils ne doivent plus manger de viande d'animaux fousseurs car la plaie s'agrandirait immédiatement [192].

III.2.2. Voie d'administration

Les pratiques de la médecine traditionnelle diffèrent significativement d'une population à une autre et dépendent fortement de la biodiversité qui les entoure. Néanmoins, le point commun de ces pratiques pour le traitement des lésions dues à la LC est la voie d'administration des préparations. Dans la majorité des cas, l'administration est réalisée exclusivement par voie externe. Les applications topiques sont de loin les plus courantes pour le traitement de la LC. Il existe d'autres formes externes utilisées moins fréquemment comme les lavages (6 %) et la fumigation (1 %). La combinaison de lavages et d'applications topiques est également envisageable [193]. Dans la phytothérapie amazonienne, le traitement de la LC est fortement privilégié par administration topique [194].

III.2.3. Parties utilisées des plantes

Généralement, dans toutes les populations du monde, il existe des parties de plantes plus utilisées que d'autres. On privilégie communément l'utilisation des parties chlorophylliennes telles que les feuilles et toute la partie aérienne de la plante. L'utilisation de l'écorce est également fréquente dans les préparations pour le traitement de la LC ou d'autres maladies [193]. On retrouve moins souvent l'usage des exsudats des plantes tels que le latex, les résines et les sucres, les organes souterrains et les racines ainsi que les fruits et les graines. Rarement, les bois et les tiges sont employés pour traiter les leishmanioses cutanées.

III.2.4. Préparations réalisées à partir de plantes

Probablement en raison de l'aspect humide de l'ulcère provoqué par la LC, la majorité des préparations, rencontrées dans les études d'ethnopharmacologie, sont sous une forme sèche pour une application locale sur la lésion. Ces préparations sont des poudres préparées soit en séchant, soit en carbonisant les racines, les feuilles ou les écorces [192,195]. Néanmoins, il existe d'autres formes de préparations et de recettes, à savoir [192] :

- le fruit et les feuilles fraîches d'une plante sont écrasés et mélangés en purée puis appliqués sous forme de pâte sur la peau lésée ;
- l'écorce est râpée et appliquée en cataplasme sur la lésion ;
- la pulpe du fruit immature est râpée puis chauffée et pressée. Le jus extrait est mélangé à une peau de banane carbonisée. La pâte obtenue est appliquée sur la peau ;
- les feuilles fraîches sont écrasées et mélangées à du jus de citron. La pâte obtenue est appliquée sur la peau lésée ;
- les gouttes de latex de la tige sont collectées tôt le matin et appliquées sur l'ulcère 3 fois par jour ;
- ou encore, une décoction est préparée puis évaporée jusqu'à obtention d'une gomme concentrée qui est directement appliquée sur la peau.

D'autres pratiques ont été recensées telles que des fruits de deux plantes mixés et appliqués sur la peau [196] ou encore l'application directe sur la plaie de la sève résineuse [197].

III.2.5. Quelques plantes utilisées en usage traditionnel pour le traitement des LC

Dans la littérature, nous retrouvons plusieurs études qui rapportent des recettes de phytothérapie utilisées pour le traitement de la LC dans différentes populations du monde.

Dans une étude menée au Suriname, plusieurs préparations qui servent de traitement pour les lésions de LC ont été répertoriées [198]. Au sein de cette population, certains utilisent les

feuilles de la plante du *Bryophyllum pinnatum* ou le Kalanchoé penné (de la famille des *Crassulaceae*) en les chauffant au-dessus du feu et en les appliquant encore chaudes sur les plaies. D'autres utilisent l'*Ipomoea batatas* ou la patate douce pour traiter les plaies. Le tubercule est réduit en purée puis appliqué sur la plaie pendant 24 heures. Les feuilles de la plante *Cecropia peltata* ou le coulequin sont également utilisées afin de préparer une décoction avec laquelle les patients se lavent les plaies. L'écorce de l'arbre tropical *Hymenaea courbaril* peut aussi être macérée puis bouillie dans l'eau. Cette décoction est directement appliquée sur les lésions. Ou encore, le jus extrait des feuilles de l'arbrisseau *Solanum lycocarpum* est appliqué directement sur les plaies.

Une autre étude rapporte en général les pratiques des populations amazoniennes et décrit des plantes utilisées pour le traitement des lésions de LC dans les zones rurales [193]. Certains utilisent les bulbes d'ail (*Allium sativum*) écrasées qu'ils appliquent directement sur leurs plaies. D'autres utilisent les feuilles d'*Aloe vera* broyées pour couvrir la zone inflammée. Le *Citrus aurantifolia* ou le citron vert est aussi appliqué localement en jus. D'autres plantes sont couramment utilisées telles que *Spondias mombin* ou le prunier monbin (feuilles et écorces), *Nicotiana tabacum* ou le tabac (feuilles), *Jatropha curcas* ou pourghère (latex, feuilles, écorces, fruit et racine), *Musa x paradisiaca* ou banane plantain (feuilles, fruit, pelures), *Carica papaya* ou papayer (latex et fruit) ...

En Bolivie, en absence de centre de santé, la phytothérapie représente la seule option de traitement pour le peuple chimane. L'application des plantes médicinales combinée à une série de pratiques visent à prévenir la croissance de l'ulcère. Parmi les plantes les plus utilisées c'est le japainiqui, le tabac, le poivre qui sont appliqués en cataplasmes sur la plaie [191].

Au Maroc, Bennis *et al.* ont décrit des plantes utilisées dans la région d'Erachidia telles que le henné, l'*Aloe vera*, le tabac, le fenugrec, le basilic, ou encore l'eau de Rose [190]. Cette population utilise également du jus de citron pour éclaircir les cicatrices engendrées par la LC.

III.3. La phytothérapie : un traitement alternatif pour la leishmaniose cutanée

Le règne végétal représente une source inépuisable de molécules bioactives qui se caractérisent par une panoplie d'activités biologiques. Ces molécules sont la conséquence d'une activité métabolique intense au sein même des plantes. En effet, une plante doit faire face à une multitude d'agressions de l'environnement qui l'entoure. Il s'agit par exemple d'attaque de prédateurs, de microorganismes pathogènes, etc. Ainsi, la plante développe un métabolisme particulier qui lui permet de synthétiser des principes actifs les plus divers afin de se défendre :

ce sont les métabolites secondaires. Ceux-ci n'interviennent pas de manière directe dans les fonctions vitales de l'organisme de la plante mais sont indispensables dans l'évolution, la survie des espèces, ainsi que dans les interactions entre les individus, leur implication dans les phénomènes de défense, de symbiose ou de pollinisation par exemple [199]. Etant donné le nombre très élevé d'espèces et des combinaisons d'interactions entre elles, la chimio-diversité issue du règne végétal semble être infinie.

Communément, ces métabolites secondaires sont subdivisés en plusieurs grandes familles dont les plus importantes sont les composés phénoliques (regroupant les polyphénols, les chalcones, les saponosides, les tanins, les anthocyanes...), les composés azotés (les plus importants sont les alcaloïdes) et les composés terpéniques [199,200]. Diverses techniques d'extraction sont utilisées pour isoler ces molécules bioactives. Elles diffèrent aussi bien par les conditions opératoires (température, pression ...) que par les solvants utilisés (aqueux, organiques, fluides supercritiques ...). Ces molécules peuvent être utilisées en mélange (extrait brut) ou purifiées *via* un fractionnement qui est généralement bioguidé afin de cibler un traitement bien déterminé. De nos jours, la recherche scientifique a démontré que ces substances actives représentent clairement une source potentielle de médicaments antiparasitaires [201]. Dans la suite, nous citerons quelques familles chimiques isolées de plantes, qui ont particulièrement prouvé une activité antileishmanienne, ainsi que leurs éventuels mécanismes d'action sur les parasites.

III.3.1. Quelques exemples de familles de molécules bioactives

a) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires caractérisés par une structure formée par deux cycles aromatiques reliés par 3 carbones C6-C3-C6. Cette chaîne est souvent fermée par un hétérocycle oxygéné de forme hexa- ou pentagonale (Fig. 5).

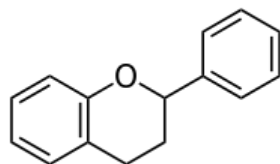


Figure 1.5 : Le squelette de base d'un flavonoïde [202].

Ces molécules sont des pigments hydrosolubles existants dans les végétaux qui ont une origine biosynthétique commune [202]. Il existe un grand nombre de flavonoïdes qui se différencient par le nombre, la position et la nature des fonctions phénols et des fonctions méthoxyles substituées sur le noyau, ainsi que par la position des sucres chez les hétérosides [203]. Les propriétés biologiques des flavonoïdes sont innombrables. Leur activité antiparasitaire a été prouvée pour plusieurs molécules extraites du règne végétal comme la lutéoline isolée du *Vitex*

negundo (le muguet bleu) ou encore la quercétine extraite du *Fagopyrum esculentum* (le sarrasin) [204]. Il a été démontré que la lutéoline inhibe la synthèse de l'ADN de la *Leishmania* en inhibant la linéarisation de l'ADN kinétoplastique par la topoisomérase II. Ceci aboutit à l'arrêt de l'évolution du cycle du parasite. Le mécanisme d'action de la quercétine est similaire [204]. En outre, la quercétine est capable de chélater le fer entraînant une diminution de la disponibilité de la ribonucléotide réductase, une enzyme limitant la vitesse de synthèse de l'ADN, dont la présence dépend fortement de la présence du fer [205].

b) Chalcones

Les chalcones ou 1,3-diaryl-2-propène-1-one sont des composés isolés de plantes mais qui peuvent également être synthétisés. Chimiquement, cette famille est constituée de précurseur des flavonoïdes dans lesquels les deux cycles aromatiques sont reliés par un système carbonyle à trois atomes de carbone α , β insaturé (Fig. 6).

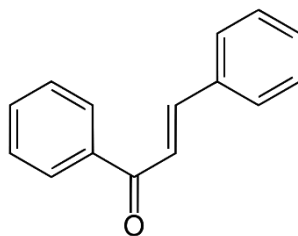


Figure 1.6 : le squelette de base d'un chalcone [206].

Les chalcones sont souvent classées dans la famille des flavonoïdes. Ces composés sont largement retrouvés dans les légumes, les fruits, les épices, le thé et diverses autres espèces de plantes [207]. Dotées de plusieurs activités biologiques intéressantes, les chalcones ont été largement étudiées pour leur activité antileishmanienne [208–210].

La licochalcone A est une chalcone oxygénée qui a été isolée à partir des racines de la plante chinoise de la réglisse. Elle a montré une activité antileishmanienne par modification de l'ultrastructure des mitochondries des parasites [211] ainsi que par l'inhibition des déshydrogénases mitochondriales [212], plus particulièrement l'inhibition de la fumarate réductase dans la chaîne respiratoire [213]. Son activité *in vitro* sur les amastigotes est plus importante que celle sur les promastigotes. Ceci implique que ce composé activerait les macrophages en tant que mécanisme d'action supplémentaire [212]. Kayser et Kiderlen ont étudié 20 chalcones et ont montré que l'activité antiprotozoaire de ces dernières semble dépendre des groupements fonctionnels présents dans la structure de la chalcone. En effet, l'activité est d'autant plus intéressante en présence du substituant de type oxy ainsi que du groupement méthoxy. En revanche, l'activité antileishmanienne est moins importante en présence de substituants hydrophiles [214].

c) Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides complexes classés sous deux types : les saponosides triterpéniques et les saponosides stéroïdiques. Ce sont des molécules tensioactives répandues dans le règne végétal. Au sein des plantes, les saponosides ont un rôle de phyto-protection antimicrobienne. Grâce à leurs propriétés biologiques intéressantes, l'utilisation des saponosides dans l'industrie pharmaceutique est largement répandue [215].

Pour extraire ces molécules, les sources les plus importantes sont l'arbre *Quillaja saponaria* Molina (l'arbre à savon) et *Yucca schidigera* (mojave yucca), et l'arbuste du Sud-Est asiatique *Camellia sinensis*, connue sous le nom de théier [216,217].

L'activité antileishmanienne a été étudiée pour l' α -hédérine et la β -hédérine qui ont été isolées de *Hedera helix* (lierre grimpant) ainsi que la hederacolchiside A1 isolée de *Hedera colchica* (lierre persan) (Fig. 7). Ces saponosides ont démontré une activité antiproliférative importante associée à leur pouvoir à interagir avec les parasites en induisant une diminution de leur potentiel de membrane. Ceci entraîne donc la perte de l'intégrité des membranes parasitaires [218].

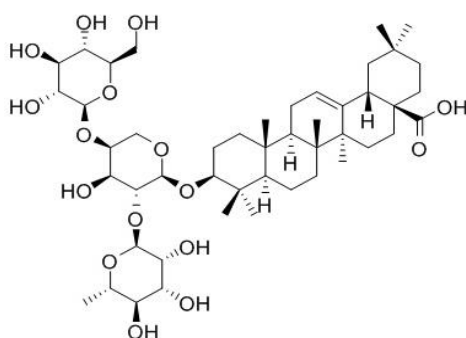


Figure 1.7 : Hederacolchiside A1 : Exemple de saponoside isolée de la plante du lierre persan [219].

d) Quinones

Les quinones sont des composés résultant de l'oxydation de dérivés aromatiques (phénols). Elles sont classées en trois catégories : les benzoquinones, les naphthoquinones et les anthraquinones (Fig. 8). L'activité biologique diffère considérablement d'une catégorie à l'autre. En effet, les benzoquinones extraites de plantes ne présentent aucun effet thérapeutique, alors que les naphthoquinones ont montré des activités antibactérienne et fongicide [202]. Plusieurs études ont décrit le potentiel antileishmanien des naphthoquinones. La plombagine isolée de *Pera benensis* (apainiki) a une bonne efficacité contre les parasites. Son mode d'action repose sur la génération de radicaux libres. Néanmoins, une cytotoxicité chez les cellules hôtes est notée [221,222].

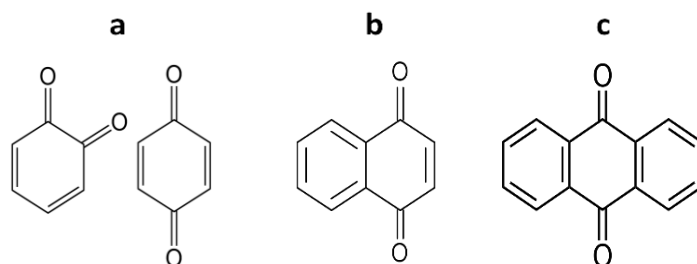


Figure 1.8 : Le squelette de base des **a)** benzoquinones, **b)** naphthoquinones et **c)** anthraquinones [220].

La diospyrine est aussi une naphthoquinone extraite de *D. montana* Roxb. (*Ebenaceae*) qui a également une activité antileishmanienne intéressante due à la génération de radicaux libres qui induisent une apoptose chez les promastigotes [223,224].

e) Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés à bases azotées très souvent hétérocycliques. Ces molécules sont majoritairement issues du règne végétal, mais présentent souvent une toxicité redoutable. En 1806, la morphine est le premier alcaloïde qui a été découvert à partir de l'opium. Depuis, plus de dix mille alcaloïdes ont été extraits et identifiés à partir des végétaux [225,226]. Les alcaloïdes ont été largement utilisés contre la leishmaniose. Une des molécules les plus connues est la berbérine isolée de *Berberis aristata* ayant démontré qu'elle perturbe le cycle respiratoire en ciblant les enzymes mitochondriales des amastigotes (Fig. 9) [227].

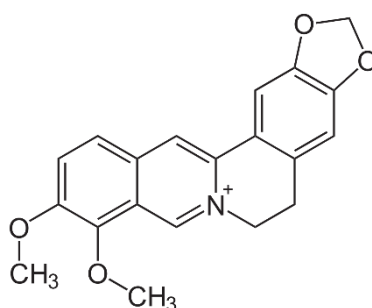


Figure 1.9 : Structure chimique de la berbérine [228].

Il a été montré que le chlorure de berbérine déclenche une mort assimilable à l'apoptose chez les promastigotes qui est médiée par les radicaux libres [229]. En effet, au sein des neutrophiles infectés de *Leishmania*, le chlorure de berbérine génère un stress oxydatif qui entraîne la réduction de la charge parasitaire [230].

La julocrotine, un alcaloïde extrait de *Croton pullei*, a été testée sur les parasites *Leishmania*. Il a été constaté que cette molécule provoque une modification morphologique des promastigotes telles que le gonflement de la mitochondrie, la condensation de la chromatine, l'apparition de

structures membraneuses à côté de l'appareil de Golgi ainsi que la présence de corps vésiculaires dans la poche flagellaire [231].

f) *Tanins*

Les tanins se définissent comme étant des composés phénoliques hydrosolubles d'une masse molaire comprise entre 500 et 3000 g/mol. Ces métabolites secondaires ont la capacité de s'associer à des macromolécules, notamment les protéines, afin de former des complexes stables [232]. En outre, grâce à leurs fonctions phénoliques à fort caractère nucléophile, les tanins sont généralement dotés de propriétés antioxydantes remarquables [202].

L'activité antileishmanienne des tanins a été largement étudiée par Kolodziej et al., notamment pour des pro-anthocyanidines et leurs analogues structuraux (Fig. 10). En effet, ces molécules ont montré une activité immunomodulatrice *via* l'augmentation de la libération d'espèces réactives de l'azote (NO[•]), ainsi que par le renforcement de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules hôtes infectées par *Leishmania*, plus particulièrement le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et l'interféron gamma (IFN- γ) [233,234].

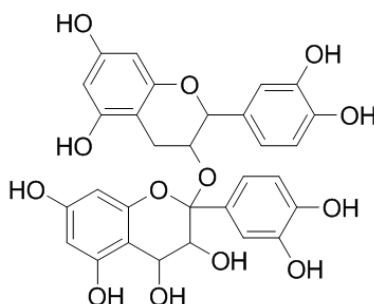


Figure 1.10 : Structure chimique des proanthocyanidines [235].

g) *Terpenoïdes*

Les terpénoïdes constituent la famille chimique la plus vaste fonctionnellement avec un nombre qui dépasse les 55 000 molécules identifiées à ce jour. Les deux termes terpènes et terpénoïdes sont souvent confondus. Le premier désigne un squelette d'hydrocarbures insaturés dérivant de l'isoprène. Tandis que, le deuxième désigne un terpène avec éventuellement un ou plusieurs groupements fonctionnels contenant de l'oxygène [236]. On distingue plusieurs types de terpènes selon le nombre (n) d'unités isopréniques (C₅) ; par exemple les monoterpènes pour n=2, les sesquiterpènes pour n = 3, les diterpènes pour n=4 ... (Fig. 11).

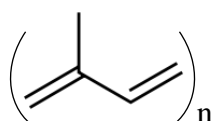


Figure 1.11 : Squelette chimique des terpènes formé par (n) unités d'isoprènes (C₅) [237]

Le linalol, un monoterpène qui a été isolé des feuilles de *Croton cajucara* (*Euphorbiaceae*) a montré une activité importante en augmentant la production de NO[•] au sein des macrophages infectés par *Leishmania*. De plus, cette activité est sélective comme en témoignent les modifications morphologiques observées chez le parasite : un gonflement mitochondrial et une altération de l'organisation des chromatines nucléaires et du kinétoplaste [238].

Dans une autre étude, des lactones sesquiterpéniques (terpénoïdes) ont été étudiées, plus particulièrement l'artémisinine et ses dérivés. Le pont endoperoxyde, caractéristique de la structure de l'artémisinine, s'est avéré indispensable dans l'amélioration de la production des radicaux libres sélectivement chez le parasite [239]. L'artémisinine favorise la production de NO[•] qui se trouve à un niveau semblable à celui présent chez les macrophages non infectés. En outre, l'artémisinine améliore la libération de cytokines Th1 (IFN- γ) suggérant que celle-ci est parasiticide en exerçant une action indirecte immunomodulatrice [240].

Dans une autre étude réalisée par Torres-Santos *et al.*, il a été démontré que l'acide ursolique et l'acide oléanolique, isolés de *Pourouma guianensis*, sont inhibiteurs de la croissance parasitaire et ce *via* la modification de l'activité phagocytaire des macrophages [241].

III.3.2. Plantes étudiées pour le traitement de la leishmaniose cutanée due à *Leishmania major*

Dans la littérature, une multitude de travaux portent sur l'application des plantes médicinales pour le traitement des formes cutanées de leishmaniose. Ces essais sont, dans la majorité des cas, inspirés par des pratiques traditionnelles. En effet, ces travaux sont généralement précédés par des études préliminaires d'ethnopharmacologie.

Dans ce qui suit, nous limiterons notre synthèse bibliographique aux études concernant la leishmaniose cutanée due à une souche de l'Ancien Monde qui est *Leishmania major* et qui fait l'objet des travaux de la présente thèse.

Les extraits de plantes ont été très largement testés sur le parasite *L. major* aussi bien dans le modèle *in vitro* (promastigote ou amastigote) que dans le modèle expérimental de LC en *in vivo*, généralement sur des souris BALB/c (Tableau 1.4).

Dans une étude réalisée par Kigundu *et al.*, des extraits de 6 plantes médicinales ont été testés pour leurs activités antiparasitaires contre les parasites *Plasmodium falciparum* et *Leishmania major* qui sont les causes respectives du paludisme et de la leishmaniose cutanée au Kenya. Les extraits qui ont prouvé les activités les plus intéressantes sur la forme promastigote de *L. major* sont l'extrait méthanolique de *Maytenus putterlickoides*, et les deux extraits aqueux de deux plantes de la famille des *Fabaceae* à savoir *Acacia tortilis* et *Albizia coriaria* [242].

Tableau 1.4 : Efficacité *in vitro* et *in vivo* des extraits de quelques plantes sur *L. major*.

Espèce	Famille	Extrait/ Molécule	Efficacité <i>in vitro</i>	Résultats du test <i>in vivo</i> sur souris BALB/c
<i>Maytenus putterlickoides</i>	<i>Celastraceae</i>	Méthanolique	60% (1mg/mL) [242]	-
<i>Acacia tortilis</i>	<i>Fabaceae</i>	Aqueux	52,9 % (1mg/mL) [242]	-
<i>Albizia coriaria</i>	<i>Fabaceae</i>	Aqueux	66,7 % (1mg/mL) [242]	-
<i>Calendula officinalis</i>	<i>Asteraceae</i>	Alcoolique	IC ₅₀ = 17 mg/mL [247]	-
		Aqueux	IC ₅₀ = 215 mg/mL [247]	
<i>Nerium oleander</i>	<i>Apocynaceae</i>	Méthanolique	IC ₅₀ = 22,2 µg/mL [248]	Diminution significative de la taille de la lésion par application locale de l'extrait [248]
<i>Achillea millefolium</i>	<i>Compositae</i>	Hydroalcoolique	Immobilisation des parasites [248]	-
<i>Allium sativum</i>	<i>Alliaceae</i>	Aqueux	37 mg/mL détruit tous les parasites [243]	L'application d'une pommade à 5 % d'extrait entraîne la diminution du diamètre de la lésion [244]
<i>Aloe latex</i>	<i>Aloaceae</i>	-	52,8 mg/mL[250]	-
<i>Vinca major</i>	<i>Apocynaceae</i>	Chloroforme	-	L'injection intralésionnelle de l'extrait pur prévient le développement de l'ulcère [251]
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>Myrtaceae</i>	Méthanolique	-	L'application locale de 40 µg/ml a un effet cicatrisant [252]
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Myrtaceae</i>	Ethanolique	-	2 applications locales / jour ont entraîné la guérison complète et disparition de petites lésions et ont limité le développement des ulcères [245]
<i>Cathartus roseus</i>	<i>Apocynaceae</i>	Extrait purifié	-	30 µg/ml de l'extrait purifié a amélioré la cicatrisation des lésions [253]
<i>Echinacea Purpurea</i>	<i>Asteraceae</i>	Extrait purifié	-	200 µg/ml de l'extrait purifié a amélioré la cicatrisation des lésions [253]
<i>Lawsonia inermis</i>	<i>Lythraceae</i>	Ethanolique	-	L'application sur les lésions d'une pommade à 80% d'extrait a diminué le diamètre des lésions [246]
<i>Berberis vulgaris</i>	<i>Berberidacea</i>	Alcoolique	-	L'application sur les lésions d'une pommade à 80% d'extrait a diminué le diamètre des lésions [254]
<i>Artemisia sieberi</i>	<i>Asteraceae</i>	Hydroalcoolique	-	L'application sur les lésions d'une pommade à 5% d'extrait a diminué le diamètre des lésions [255]
<i>Artemisia annua</i>	<i>Asteraceae</i>	Artémisinine	25 mg/L Fragmentation d'ADN du parasite [256]	-
<i>Lavandula spica</i>	<i>Lamiaceae</i>	-	-	L'application sur les lésions d'une pommade à 80% d'extrait a diminué le diamètre des lésions [257]

(-) : non déterminé

La famille des *Fabaceae* est effectivement très utilisée en médecine traditionnelle et une étude ethnopharmacologique récente a démontré que cette famille est la plus citée dans les préparations phytothérapeutiques chez les populations d'Amazonie [193].

Dans la littérature, nous retrouvons plusieurs études qui testent l'activité de l'ail (*Allium sativum*) sur *Leishmania* vu que celui-ci est utilisé dans plusieurs préparations traditionnelles pour le traitement des maladies de la peau. Dans une étude en Iran, un extrait aqueux d'ail a été testé sur des amastigotes *L. major* infectant des macrophages de lignée J774. Après 48 heures d'incubation, la concentration d'extrait qui entraîne la diminution la plus importante de la viabilité cellulaire est de 37 mg/mL. En outre, il a été prouvé par RT-PCR, que l'extrait d'ail déclenche la surexpression des gènes de IFN- γ et iNOS au sein du macrophage infecté. Il en découle que l'activité leishmanicide de cet extrait provient de sa capacité à améliorer l'immunité cellulaire chez les cellules hôtes [243]. Ce même extrait a été testé par ailleurs sur le modèle expérimental *in vivo* de LC à *L. major*. Une pommade contenant 5 % d'extrait aqueux d'ail a été préparée et appliquée directement sur les lésions de LC de souris BALB/c infectées. Ce traitement a montré que cette formulation est efficace pour diminuer significativement le diamètre des lésions [244].

D'autres formulations à base d'extraits de plantes ont été préparées et testées sur la LC à *L. major* par application topique sur les lésions. Nous pouvons citer l'exemple de l'extrait éthanolique de l'arbre *Eucalyptus globulus* qui a entraîné la diminution du diamètre des lésions, voire la disparition des plus petites, suite à son application locale deux fois par jour. De plus, le développement des ulcères a été limité. En outre, ce traitement a également eu un effet significatif sur la diminution de la charge parasitaire du groupe traité par rapport au placebo [245]. L'efficacité de l'extrait éthanolique des feuilles de Henné (*Lawsonia inermis*) a été également testée sur les lésions de LC à *L. major* en appliquant localement tous les deux jours une pommade contenant 40, 60 ou 80 % de l'extrait. Le résultat de cette étude a montré que le traitement par la pommade à 80 % d'extrait a induit une réduction significative de la taille des lésions par rapport au groupe témoin traité au placebo. De plus, la perte de poids des souris pendant le traitement est significativement diminué [246].

III.3.3. Conclusion

Cette synthèse bibliographique démontre que les plantes représentent une source de molécules bioactives très intéressante à exploiter pour le traitement de la LC. En effet, grâce à la connaissance des pratiques traditionnelles, il a été possible aux chercheurs de prouver l'efficacité des extraits ou des molécules issus de certaines plantes, aussi bien sur les modèles *in vitro* que sur des modèles *in vivo*. En dépit de la multitude et la complexité des mécanismes réactionnels antiparasitaires, nous avons déduit que le principal mode d'action de ces molécules

est radicalaire et repose sur l'augmentation de la production des espèces NO[•] au sein des macrophages infectés par *Leishmania*.

Dans la suite de ce chapitre, la dernière section de la synthèse bibliographique sera consacrée à la présentation des plantes sélectionnées pour notre étude, leur utilisation traditionnelle ainsi que leur éventuel potentiel antileishmanien.

Section IV. Les plantes sélectionnées pour notre projet et leur potentiel antileishmanien

La Tunisie dispose d'une grande diversité phytogénétique renfermant plus de 149 espèces médicinales et 38 plantes aromatiques [258], ce qui multiplie les chances de trouver des espèces dotées d'activités biologiques intéressantes. Le secteur des plantes aromatiques et médicinales suscite de plus en plus d'intérêt de la part des chercheurs et des professionnels dans la mesure où la valorisation de ces ressources naturelles et l'exploitation de leur potentiel chimique pourrait avoir des retombées socio-économiques appréciables pour la Tunisie d'une part, et permettre le développement de nouveaux médicaments, d'autre part.

Lors du travail de recherche dans le cadre de la présente thèse, nous nous sommes penchés sur l'étude du potentiel antiparasitaire des huiles essentielles et d'extraits de trois plantes d'origine tunisienne à savoir : le pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.), le citronnier (*Citrus limon*) et l'armoise herbe blanche (*Artemisia herba-alba*). Cette partie sera dédiée à la présentation et la description de ces plantes ainsi que leur usage traditionnel. Ensuite, notre choix sera consolidé par une recherche bibliographique sur chacune de ces plantes et leur activité contre la LC.

IV.1. *Artemisia Herba-alba*

Le choix de cette plante a été basé sur ses multiples propriétés pharmacologiques avérées. Son efficacité antimalarique a été citée dans la littérature et elle est due à la présence d'artémisinine [260]. En outre, des pratiques dans la médecine traditionnelle tunisienne rapportent l'usage dans le sud de la Tunisie de cette plante en décoction pour ses propriétés antihelminthiques et vermifuges [261].

IV.1.1. Description botanique

L'*Artemisia herba-alba* ou l'armoise herbe blanche est une plante du genre *Artemisia* appartenant à la famille des *Astéracées* (composées). Elle se présente comme un arbuste nain dont la hauteur ne dépasse pas les 30 à 50 cm (Fig. 12). Elle possède des tiges ligneuses ramifiées et tomenteuses. Ses feuilles sont courtes, pubescentes, sessiles et de couleur argentée. Ses capitules sont groupés en panicules de taille moyenne de 2 mm de forme allongée et étroite pouvant porter de 3 à 6 fleurs jaunâtres. Les bractées externes de l'involucre sont circulaires et pubescentes [261]. L'*A. herba-alba* est retrouvée à l'état sauvage dans les régions arides et

semi-arides. Elle pousse dans le bassin méditerranéen et s'étend jusqu'au nord-ouest de l'Himalaya.



Figure 1.12 : Photographie de la plante *Artemisia Herba-Alba* [262].

Elle se trouve abondamment dans la péninsule ibérique et atteint le centre de l'Espagne ainsi que l'Est, le Sud-Est et le Sud de l'Espagne. Généralement, elle pousse sur des substrats nitrofileux et riches en gypse [263,264].

IV.1.2. Classification systématique de la plante

L'*Artemisia herba-alba* appartient à l'ordre des *Asterales* de la famille des Astéracées et du genre *Artemisia* (Tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Classification systématique de *Artemisia herba-alba* [262].

Règne : Plantae	Ordre : <i>Asterales</i>
Sous-règne : <i>Tracheobionta</i>	Famille : Asteraceae
Division : <i>Magnoliophyta</i>	Genre : <i>Artemisia</i>
Classe : <i>Magnoliopsida</i>	Espèce : <i>A. herba alba</i> (Asso)
Sous-classe : <i>Asteridae</i>	Nom vernaculaire français : Armoise herbe blanche
Nom binomial : <i>Artemisia herba alba</i> (Asso)	Nom vernaculaire tunisien : Chih

IV.1.3. Utilisation traditionnelle

L'armoise herbe blanche sert à nourrir les moutons et le bétail autour du bassin méditerranéen où elle pousse d'une manière abondante [265]. Depuis l'Antiquité, l'*Artemisia herba-alba* a été largement utilisée par de nombreuses populations dans la médecine traditionnelle. Dans le pourtour méditerranéen, elle est utilisée pour traiter l'hypotension artérielle ainsi que pour ses propriétés hypoglycémiantes [266–268]. Les tisanes d'armoise herbe blanche sont servies pour leur pouvoir analgésique, antispasmodique, antibactérien et hémostatique [269].

D'autres études ethno-pharmacologiques rapportent que l'armoise herbe blanche a été largement utilisée pour traiter les désordres gastriques tels que la constipation, les troubles d'estomac, les douleurs abdominales... En outre, elle sert comme remède aux inflammations du tractus gastro-intestinale [270].

IV.1.4. *Artemisia herba-alba* et leishmaniose

Depuis plusieurs années, le genre *Artemisia* a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs en raison de la teneur élevée en artémisinine qui est une lactone sesquiterpène très réputée pour ses propriétés pharmacologiques. En 1972, cette molécule a été isolée pour la première fois à partir des feuilles d'*Artemisia annua*. Une hypothèse de mécanisme d'action de cette molécule contre le parasite du *Plasmodium* a été proposée par une équipe de chercheurs de l'université du Michigan. Celui-ci repose sur le groupe peroxyde de cette molécule qui semble être à l'origine de son efficacité [271]. L'artémisinine est actuellement la base des médicaments antipaludiques les plus récents et en ce moment les plus efficaces [272]. Ceci a incité les chercheurs à tester cette molécule sur d'autres protozoaires comme *Leishmania*.

Le premier travail qui a démontré l'activité antileishmanienne de l'artémisinine contre le parasite *Leishmania* a été réalisé sur la souche *L. major*. En 1993, Yang et Liew ont prouvé que l'artémisinine est efficace *in vitro* sur la forme promastigote avec une IC_{50} de $7,5 \cdot 10^{-7}$ M ainsi que sur la forme amastigote intracellulaire avec une IC_{50} de $3 \cdot 10^{-5}$ M. Par ailleurs, l'étude de toxicité a démontré que la concentration efficace n'a eu aucun effet sur la viabilité cellulaire. L'artémisinine n'est donc pas toxique. Le test *in vitro* a été suivi par une évaluation de l'efficacité de la molécule *in vivo* sur le modèle de LC expérimental chez les souris BALB/c. L'injection intralésionnelle de l'artémisinine est la voie la plus efficace assurant non seulement la cicatrisation des plaies mais aussi la diminution significative de la charge parasitaire [273].

Des extraits d'armoise herbe blanche ont été également évalués pour leur activité antiparasitaire. On peut citer les travaux de Hatimi *et al.* [274] qui ont testé l'extrait aqueux de la plante récoltée du Maroc pour son activité contre les souches de l'Ancien Monde : *L. major* et *L. tropica*. Les deux parasites sous forme promastigote ont témoigné d'une sensibilité semblable à une concentration de 4 µg/ml pour l'extrait aqueux [274]. Néanmoins, vu que la toxicité de l'extrait n'a pas été évaluée, ce résultat doit être pris avec précautions.

D'autre part, plusieurs autres études se sont focalisées sur l'activité thérapeutique de l'huile essentielle d'armoise blanche. L'étude la plus récente, concerne l'huile essentielle d'une armoise blanche récoltée dans le centre de la Tunisie. L'analyse chimique de cette huile a révélé que celle-ci se compose majoritairement d' α -thuyone. L'évaluation de l'activité antiparasitaire de cette huile a prouvé qu'elle possède un potentiel antileishmanien intéressant contre les promastigotes *L. major* avec une IC_{50} de $1,20 \pm 0,04$ µg/mL. La cytotoxicité de cette huile sur

une lignée cellulaire humaine de leucémie myéloïde, la lignée U-937, a révélé une toxicité modérée ($CC_{50\text{macrophages}} = 11,24 \mu\text{g/mL}$) [275]. Une huile essentielle de l'armoise blanche provenant du Maroc a révélé à son tour une activité très intéressante sur la souche *L. major* avec une IC_{50} de $2 \mu\text{g/mL}$ [274].

Une autre étude récente s'est intéressée aux activités antioxydantes ainsi qu'au mécanisme d'action de l'huile essentielle d'armoise blanche tunisienne contre *L. major*. Cette étude a révélé que cette huile possède une activité antioxydante très intéressante. Son activité sur les promastigotes de *L. major* est dose-dépendante et est médiée par l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Suite à ces résultats, les auteurs considèrent l'huile essentielle extraite de l'armoise blanche de Tunisie comme une candidate prometteuse pour le traitement de la LC [276].

IV.2. *Pistacia lentiscus*

Le choix de cette plante est basé sur des travaux précédents du laboratoire tunisien, partenaire de ce projet, et qui ont porté sur le potentiel antileishmanien de l'huile essentielle issue des feuilles du *Pistacia lentiscus* récoltées en Tunisie. Cette huile essentielle, à la suite d'un fractionnement bio-guidé, a démontré qu'une de ses fractions possède une activité *in vitro* contre le parasite *Leishmania donovani* très intéressante avec une IC_{50} de l'ordre de $2 \mu\text{g/mL}$. Ces travaux ont conduit au brevet d'invention N°TN2013/0129.

IV.2.1. Description botanique

Le *Pistacia lentiscus* appartient à la famille des Anacardiaceae. Il s'agit d'un arbrisseau vivace d'une hauteur moyenne de trois mètres, ramifié dégageant une odeur de résine à caractère âcre (Fig. 13). Le *Pistacia lentiscus*, appelé en français pistachier lentisque, se caractérise par une écorce de couleur rougeâtre sur les jeunes branches. Cette couleur a tendance à virer au gris avec le temps. L'incision de l'écorce laisse couler une résine transparente qui dégage une odeur très forte. Une fois distillée, cette résine fournit une essence utilisée en parfumerie [277]. Les feuilles du pistachier sont persistantes et composées. De couleur vert sombre, elles ont une forme elliptique, un aspect luisant en dessus, glabre et coriace [277].

Cet arbrisseau est caractéristique des milieux les plus chauds du climat méditerranéen. On le trouve couramment dans les régions arides d'Asie, dans la région méditerranéenne de l'Europe et d'Afrique et aux Canaries [278]. Il pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les terrains en friche. Sur le pourtour méditerranéen, notamment en Algérie, le pistachier pousse sur tout type de sol du semi-aride au subhumide [279], plus particulièrement entouré du Pin d'Alep, du chêne vert et du chêne liège [280]. Il est également habituellement en association avec l'olivier

sauvage (Oléastre), le myrte et la salsepareille formant ainsi un groupement végétal que les botanistes nomment « Oléolentique » [277].



Figure 1.13 : Photographie de la plante *Pistacia lentiscus* [282].

IV.2.2. Classification systématique de la plante

Le *Pistacia lentiscus* appartient à l'ordre des *Spindales* de la famille des *Anacardiacees* et au genre *Pistacia* (Tableau 1.6).

Tableau 1.6 : Classification systématique du *Pistacia lentiscus*.

Règne : <i>Plantae</i>	Ordre : <i>Sapindales</i>
Sous-règne : <i>Tracheobionta</i>	Famille : Anacardiacea
Division : <i>Magnoliophyta</i>	Genre : <i>Pistacia</i>
Classe : <i>Magnoliopsida</i>	Espèce : <i>Pistacia Lentiscus</i>
Sous-classe : <i>Rosidae</i>	Nom vernaculaire français : Pistachier lentisque
Nom binomial : <i>Pistacia lentiscus</i>	Nom vernaculaire tunisien : Dhar'o

IV.2.3. Utilisation traditionnelle

Depuis l'antiquité, le *Pistacia lentiscus* est réputé pour ses nombreuses propriétés médicinales. Les racines de la plante sont séchées et préparées en décoction afin de traiter les inflammations gastro-intestinales et l'ulcère gastrique [282]. Plusieurs auteurs ont rapporté l'usage fréquent de toute la partie aérienne du pistachier lentisque en médecine traditionnelle. Généralement, elle sert à traiter l'hypertension artérielle étant donné ses propriétés diurétiques [283–286]. Certains utilisent aussi la résine du pistachier qu'ils obtiennent par incision de l'écorce. Cette substance est connue dans la médecine populaire pour ses propriétés antioxydantes, analgésiques, antifongiques et antibactériennes. Elle est également réputée pour son pouvoir antiathérogène, antispasmodique, expectorant, stimulant et diurétique [287–290]. De ce fait, cliniquement, la résine s'est avérée efficace contre plusieurs pathologies comme la diarrhée, les ulcères gastro-duodénaux, les infections bactériennes et l'asthme en tant qu'agent antiseptique du système

respiratoire [291–299]. En outre, la résine du pistachier lentisque est reconnue en tant qu'agent anti-cancéreux, elle est plus particulièrement utilisée contre les tumeurs du sein, du foie, de la rate, de l'utérus et aussi de l'estomac. Ces croyances traditionnelles sont en accord avec les études récentes qui démontrent que cette résine est capable d'induire l'apoptose [300] et possède une action anti-prolifératrice sur les cellules cancéreuses du côlon [301]. Au cours d'une étude ethnobotanique réalisée au Maroc auprès d'un nombre d'herboristes de la région de Meknès, les usages du pistachier lentisque ont été décrits [302]. La majorité des herboristes enquêtés recommandent et vendent les feuilles de la plante à des fins thérapeutiques. Selon cette enquête, elles servent dans la majorité des cas à préparer des tisanes (50 %). En effet, l'administration orale représente la voie la plus simple, permettant une meilleure efficacité. Les feuilles peuvent également servir à extraire l'huile essentielle (33 %). Plus rarement, ces feuilles sont administrées localement sous forme de poudre (7 %). Cette étude a également permis de classer les pathologies traitées grâce aux feuilles du pistachier lentisque au Maroc. Il s'agit en premier lieu du traitement des affections du tube digestif, puis vient en deuxième lieu le traitement des affections dermatologiques. Certains rapportent aussi l'usage des feuilles pour traiter les affections génito-urinaires ainsi que les pathologies bucco-dentaires. D'autres études décrivent les feuilles du pistachier lentisque comme étant anti-inflammatoires, antifongiques, antipyrétiques, hépato-protectrices, astringentes, expectorantes et stimulantes [288,303–306]. Cliniquement, les feuilles sont utilisées pour le traitement de plusieurs maladies telles que l'eczéma, les lithiases rénales, les infections buccales, la jaunisse, les maux d'estomac et les ulcères ainsi que les problèmes respiratoires [303,307,308]. Les fruits du pistachier lentisque sont également très utilisés à des fins thérapeutiques. En effet, certains en extraient une huile végétale qui sert en tant qu'onguent pour soigner les brûlures ou pour soulager les douleurs dorsales [309].

IV.2.4. *Pistacia lentiscus* et leishmaniose

Dans la littérature, rares sont les recherches qui s'intéressent aux propriétés anti-leishmaniennes du pistachier lentisque. Seule une étude très récente a comparé l'effet des huiles issues des fruits et des feuilles du pistachier lentisque du Maroc sur les souches *Leishmania* de l'Ancien Monde. L'activité la plus intéressante a été démontrée pour l'huile essentielle issue des feuilles contre *L. major*. En revanche, l'huile fixe issue des fruits a démontré une meilleure activité sur *L. infantum* [310].

D'autre part, il est à noter que plusieurs travaux ont démontré l'efficacité antiparasitaire des extraits d'autres plantes du genre *Pistacia* sur les différentes souches de *Leishmania*. Par exemple, la résine récupérée à partir du *Pistacia atlantica* a prouvé son efficacité sur le modèle expérimental de LC à *L. major* chez les souris [311]. L'extrait de la branche de *Pistacia vera*

a. quant à lui, montré une activité inhibitrice significative sur *L. donovani in vitro* [312]. L'huile essentielle du *Pistacia vera* a également prouvé son efficacité *in vitro* sur les formes amastigotes intracellulaires de *L. tropica* et *L. major* en comparaison avec le médicament de référence (Glucantime®). Ce travail a été poursuivi par une évaluation *in vivo* de l'effet de cette huile essentielle sur des mâles BALB/c infectés avec *L. major*. Les résultats ont démontré que le traitement (à 30 mg/mL) a permis de donner un taux de guérison important chez les souris (87,5 %) ainsi qu'une réduction significative de la taille moyenne des lésions. De plus, aucune toxicité n'a été observée. D'après les auteurs, l'huile essentielle de *Pistacia vera* pourrait être un médicament candidat pour le traitement des lésions de LC [313]. Une autre étude portant sur la plante *Pistacia khinjuk* a permis d'évaluer l'efficacité de l'extrait alcoolique sur les formes promastigote et intracellulaire de *L. tropica* puis sur le modèle expérimental de LC due à *L. major* chez les souris BALB/c. L'étude *in vitro* a démontré que cet extrait a inhibé significativement la croissance parasitaire sur les deux formes du parasite *L. tropica*. Le test *in vivo* a également démontré une efficacité importante après 30 jours de traitement topique par l'extrait avec un taux de guérison de 75 %. En outre, la taille des lésions a significativement diminué [314].

Dans la littérature, nous retrouvons plusieurs publications qui démontrent des propriétés biologiques intéressantes qui peuvent faire de *Pistacia lentiscus* un traitement potentiel contre la leishmaniose notamment sa forme cutanée. Par exemple, l'effet cicatrisant des extraits de cette plante a été précédemment décrit. En Algérie, une étude a évalué l'efficacité de l'huile végétale vierge du *Pistascia lentiscus* pour la cicatrisation des brûlures de 3^{ème} degré chez les des lapins néo-zélandais. En plus du groupe traité à l'huile de pistachier, différents groupes ont servi de contrôles : un groupe traité à la vaseline, un groupe traité au médicament référence (Madecassol®) et un groupe non traité. Il a été démontré que le Madecassol® ainsi que l'huile de pistachier accélèrent de manière significative le processus de cicatrisation en comparaison avec le traitement à la vaseline et le groupe non traité. Cependant, les auteurs affirment donc que l'huile de pistachier lentisque a une efficacité de cicatrisation supérieure à celle du Madecassol® témoignée par une contraction de la plaie favorisée ainsi qu'une période d'épithétisation plus courte chez les lapins [315].

D'autres propriétés pharmacologiques prouvées pour les extraits de pistachier lentisque peuvent également jouer un rôle dans le traitement des lésions de LC comme les propriétés antibactériennes. En effet, les patients atteints de lésions ulcéreuses de LC sont souvent sujets à une infection secondaire. Selon plusieurs études évaluant le microbiote de ces lésions, la bactérie la plus fréquemment isolée est le *Staphylococcus aureus* [316]. En effet, il a été démontré que l'huile essentielle de la partie aérienne ainsi que la gomme du pistachier lentisque

exercent une activité antibactérienne importante sur plusieurs pathogènes et notamment le *S. aureus* [317].

IV.3. Citrus limon

Notre choix s'est porté sur le citronnier étant donné que cette plante possède des propriétés très intéressantes pour la peau et a été largement utilisée en dermo-cosmétique.

IV.3.1. Description botanique

L'arbre du citronnier appartient à la famille des Rutacées. Il possède une taille moyenne de 2,5 m de haut. Ses branches sont épineuses. Ses feuilles sont odorantes, persistantes et de forme oblongue lancéolée. Ses jeunes pousses et bourgeons sont violacés. Les boutons floraux sont d'abord bordeaux puis se métamorphosent en fleurs de pétales blancs, légèrement rosés, auxiliaires et réunis en petits groupes. Ces fleurs dégagent un parfum très doux et hespéridé. Son fruit de couleur verte, vire au jaune à sa maturité et a une forme oblongue ovoïde pointue de 8 à 12 cm de long (Fig. 14). Sa pulpe est acide, son écorce, appelé aussi zeste, est épaisse exhalant une odeur caractéristique. Les graines, contenues dans le fruit, ont des cotylédons blancs [318,319].



Figure 1.14 : Photographie de l'arbre de *Citrus limon* [322].

Le citronnier serait originaire des régions tropicales du versant sud de l'Himalaya et se disperse dans le pourtour méditerranéen pour atteindre les pays chauds. Cet arbre pousse bien dans les régions tropicales et subtropicales, où la pluviométrie atteint 2000 mm/an, dans un sol frais et bien drainé. Le sol doit également avoir un pH légèrement acide ou neutre [320,321]. Généralement, ses racines sont superficielles. La présence à proximité d'herbes ou d'autres plantes qui peuvent faire concurrence, n'est pas appréciée. En outre, la consommation excessive en eau du citronnier peut accélérer le lessivage du sol, une fertilisation est alors recommandée [320,321].

IV.3.2. Classification systématique de la plante

Citrus limon appartient à l'ordre des *Sapindales* de la famille des *Rutacées* et du genre *Citrus* (Tableau 1.7).

Tableau 1.7 : Classification systématique du *Citrus limon*.

Règne : <i>Plantae</i>	Ordre : <i>Sapindales</i>
Sous-règne : <i>Tracheobionta</i>	Famille : Rutaceae
Division : <i>Magnoliophyta</i>	Genre : <i>Citrus</i>
Classe : <i>Magnoliopsida</i>	Espèce : <i>Citrus Limon</i>
Sous-classe : <i>Rosidae</i>	Nom vernaculaire français : Citronnier
Nom binomial : <i>Citrus Limon</i>	Nom vernaculaire tunisien : Karess

IV.3.3. Utilisation traditionnelle

Depuis plusieurs années, le citronnier est largement utilisé dans différents domaines notamment en cuisine, cosmétique, pharmacie, ... Une étude ethnobotanique autour du genre *Citrus* a été réalisée afin de rechercher les utilisations pharmacologiques historiques des agrumes. Pour ce faire, une revue des travaux agricoles, botaniques et médicaux d'auteurs européens, grecs, romains, musulmans et médiévaux a été réalisée. Certaines pratiques sont communes et ont été rapportées à plusieurs reprises comme celles de placer le fruit du citronnier ou bien ses feuilles dans les vêtements pour repousser les mites ou encore pour empêcher les vêtements d'être mangés par les papillons de nuit [323,324].

Nous retrouvons également le fait de considérer le jus de citron comme un antidote éprouvés contre tous types de poisons [323,324]. Selon Herrera, il est efficace contre les venins de scorpions ou de vipères et peut être appliqué localement sur la plaie [325].

Certains utilisaient différentes parties du citronnier pour rafraîchir l'haleine. Chez les grecs la partie interne du citron est bouillie puis concentrée pour former une sauce ou bien le jus de citron est pressé directement dans la bouche ou inhalé [323]. La décoction des graines peut également être préparée à cet effet [326]. Chez les iraniens de l'Empire Parthes, on utilisait les graines plutôt pour cuisiner la viande [327]. Chez les musulmans, l'haleine est rafraîchie grâce à la pelure du fruit [328]. Pliny a aussi rapporté la prescription des graines chez les romains pour lutter contre la nausée pendant la grossesse [327]. L'auteur Dioscorides a décrit les graines comme remède pour soulager les malaises d'estomac. Une fois bouillies, leur décoction peut également rafraîchir l'haleine [326].

Dans le monde musulman, selon Abu Marwan, les pelures de citron servaient à préparer une marmelade qui était utilisée contre les maux d'estomac. D'autres préparaient cette même

marmelade avec des feuilles de citronnier. Abu Marwan a également décrit les propriétés olfactives particulières de la pelure du citron qu'utilisaient les gens pour « reconforter l'esprit ». Les pépins du fruit étaient appliqués sur un cataplasme pour nettoyer et éclaircir la peau. Ils préparaient aussi un sirop à partir de la peau qui était utilisé en tant que diurétique et un antidote. L'huile essentielle qu'ils extrayaient des fleurs et de la peau était utilisée comme tonique pour l'estomac [328].

Dans des descriptions plus récentes, nous retrouvons des recettes à base de citronnier utilisées par différentes cultures en médecine traditionnelle. Dans un des préceptes de la médecine ayurvédique, le Sushruta Samita, le jus de citron est décrit comme étant un carminatif, détoxiquant, antiparasitaire et digestif. Il pourrait être également utilisé pour traiter la toux, l'asthme, les nausées, la colique, la constipation et pour améliorer la gastrite acide. En outre, dans la médecine traditionnelle indienne, le jus de citron est préparé avec du sel et est administré oralement afin de combattre le ténia [329].

D'autres usages du *Citrus limon* sont décrits dans la médecine européenne traditionnelle. En effet, le jus de citron est prescrit pour traiter le rhumatisme et l'hémorragie après un accouchement. Il est également prescrit par voie topique pour ses propriétés astringentes dans le prurit du scrotum, la pharyngite ou dans une lotion pour traiter les coups de soleil [329].

Au Brésil, l'arbre du citronnier est largement utilisé en médecine populaire. Le jus de citron est réputé pour son effet diurétique, antiscorbutique, antidysentérique et fébrifuge. Il est recommandé pour traiter les varices, la lithiase urinaire, la goutte, l'hyperuricémie, les piqûres d'insectes, la grippe, la congestion bronchique... Par exemple, pour combattre la grippe, la préparation administrée est un mélange d'acide acétylsalicylique avec du jus de citron chaud. En outre, une cure de graines de citron est prescrite contre l'acné et le prurit du furoncle. Le jus de citron est également très utilisé par voie externe notamment contre les plaies, aphtes et eczéma [330]. Ailleurs, au Ghana, nous retrouvons aussi l'utilisation du citronnier contre les maladies de la peau. Les Ghanéens formulent une pâte avec les épines et le jus de citron qui est largement utilisée afin de traiter les dermatoses [318].

IV.3.4. *Citrus limon* et leishmaniose

Dans la littérature, la plante du *Citrus limon* est rarement associée à la maladie de leishmaniose. Au cours de l'étude d'ethnopharmacologie, évaluant l'usage des plantes chez le peuple amazonien pour le traitement de LC, le *Citrus limon* a été mentionné [193]. Toutefois, très peu de recherches ont abordé le potentiel de cette plante dans le traitement des leishmanioses. En effet, nous ne retrouvons, dans la littérature, que l'étude de Kvist *et al.* qui a décrit l'extrait des racines du *C. limon* comme ayant une faible activité sur les promastigotes des *L. major*. Dans

la même étude, l'extrait d'une autre espèce de *Citrus* (*C. paradisi*) est pour sa part inactive sur le même parasite.

Cependant, le limonène, l'une des molécules caractéristiques du *C. limon* (Fig. 15), et ses dérivés ont prouvé une activité antileishmanienne *in vitro* sur les promastigotes de la souche *L. braziliensis* [331]. Le limonène a été également testé sur d'autres souches comme *L. amazonensis* et *L. major*, et ce aussi bien sur la forme promastigote que sur la forme intracellulaire du parasite, et a démontré une activité très intéressante [332]. De plus, sur le modèle expérimental de LC à *L. amazonensis*, le traitement avec du limonène pur a conduit à une diminution significative de la taille des lésions. L'administration par voie topique du limonène a entraîné une baisse significative de la charge parasitaire démontrée par l'examen des coupes histologiques des peaux traitées.

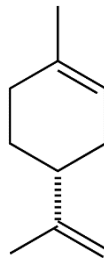


Figure 1.15 : Structure du limonène [333].

Curieusement, l'administration par voie intra-rectale du limonène aux souris infectées a exercé un effet très significatif tant pour réduire la charge parasitaire que pour la guérison des lésions et le contrôle de la dissémination des ulcères. En outre, le limonène présente une faible toxicité chez l'Homme et a démontré son efficacité comme promoteur d'absorption percutanée des médicaments. Les auteurs suggèrent alors de tester le limonène sur d'autres modèles expérimentaux de LC [332].

D'autres études ont évalué les activités pharmacologiques qui pourraient faire du *C. limon* un traitement potentiel contre la LC. L'une des activités les plus intéressantes à considérer est la propriété immunomodulatrice déjà démontrée de l'extrait du jus de citron vert concentré sur les cellules mononucléées humaines activées par la phytohémataglutinine [334]. De plus, les bienfaits des extraits de citronnier sur la peau ne sont plus à prouver. En effet, il s'agit d'une source potentielle de vitamine C. Son huile essentielle est utilisée dans diverses préparations pour réduire les démangeaisons cutanées et pour nourrir la peau. De plus, la pulpe laissée après l'extraction du jus serait utilisée pour le traitement des boutons et des rides et adoucir la peau du visage [335]. Dans ce contexte, Otang et Afolayan ont évalué le potentiel antioxydant des extraits de *C. limon* ainsi que leur efficacité antimicrobienne contre un nombre de bactéries impliquées dans les maladies de la peau. L'extrait d'acétone a donné l'activité la plus

intéressante contre *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis*. Les bactéries les plus sensibles étaient la *Salmonella typhimurium* à Gram négatif, *E. faecalis* et *B. subtilis* à Gram positif. L'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres était importante pour l'extrait d'acétone. Celle-ci est équivalente à l'activité de la vitamine C et la rutine, des antioxydants synthétiques. A la lumière de ces résultats, les auteurs ont affirmé la valeur du *Citrus limon* en tant que source potentielle de développement de médicaments antibactériens contre les maladies de la peau, et valident également les allégations ethno-thérapeutiques de cette plante.

IV.4. Conclusion

Face aux inconvénients que posent les traitements conventionnels, les substances naturelles ont fait leurs preuves pour le traitement de la leishmaniose cutanée. Ceci a été clairement décrit dans les pratiques de la médecine traditionnelle, puis validé par la suite par des travaux de recherche. D'après la littérature, l'armoise blanche, le pistachier lentisque et le citronnier sont trois plantes dont l'activité potentielle est à explorer. Notre choix a été aussi bien inspiré d'anciens travaux que de pratiques traditionnelles en relation avec la leishmaniose cutanée. A partir de ces plantes de la flore méditerranéenne, nous envisageons d'extraire des mélanges de molécules bioactives, sous forme d'huiles essentielles et d'extraits, qui seront évalués pour leur activité antiparasitaire sur le parasite *Leishmania major* dans un premier temps *in vitro*, puis nous sélectionnerons l'extrait le plus prometteur qui sera par la suite encapsulé dans un système de NE afin de protéger les molécules bioactives d'une dégradation éventuelle et de renforcer leurs propriétés thérapeutiques. Enfin, ce système sera étudié pour son efficacité antiparasitaire sur le modèle expérimental de LC à *Leishmania major* chez la souris.

Références bibliographiques

- [1] A.R. Zink , M. Spigelman, B. Schraut , C.L. Greenblatt , A.G. Nerlich, Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1616–1617.
- [2] M. Akhoundi, K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, M. Pierre, D. Pascal, Delaunay Sereno, A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) e0004349.
- [3] Organisation Mondiale de la Santé, Plan mondial de lutte contre les maladies tropicales négligées, (2008).
- [4] WHO | Leishmaniasis, WHO. (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (accessed September 21, 2017).
- [5] J. Alvar, I.D. Vélez, B. Caryn, H. Mercé, D. Philippe, C. Jorge, J. Jean, de Boer Margrieta, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One.* 7 (2012).
- [6] P.J. Hotez, D.H. Molyneux, A. Fenwick, E. Ottesen, S. Ehrlich Sachs, J.D. Sachs, Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria, *PLoS Med.* 3 (2006) e102. doi:10.1371/journal.pmed.0030102.
- [7] P.J. Hotez, J.H.F. Remme, P. Buss, G. Alleyne, C. Morel, J.G. Breman, Combating Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project, *Clin. Infect. Dis.* 38 (2004) 871–878.
- [8] S.B. Santos, D.O. Coutinho, C. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, H.C. Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Castro, Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review., *Parasitol. Res.* 103 (2008) 1–10.
- [9] M. Rhajaoui, Les leishmanioses humaines au Maroc: une diversité nosogéographique., *Pathol. Biol.* 59 (2011) 226–229.
- [10] P.F. Dedet JP, Carme B., Desbois N., Bourdoiseau G., Lachaud L., Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d’outremer, *Presse Med.* 42 (2013) 1469–81.
- [11] J. Dedet, Les leishmanioses., Ed. Ellipses Paris. (1999) 227–236.
- [12] A. Hombach, J. Clos, No stress--Hsp90 and signal transduction in Leishmania., *Parasitology.* 141 (2014) 1156–66.
- [13] N. Biezunski, Thèse pour diplôme d’état en médecine co-infection leishmaniose viscérale-infection VIH : A propos de cinq cas suivis dans le Service des Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Toulouse, 2014.
- [14] European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP), Les phlébotomes, <https://www.esccap.fr/arthropodes/phlebotomes-leishmaniose.html>. (accessed December 21, 2018).
- [15] Lavoisier, Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire, 2008.
- [16] M.C. Pinto, D.H. Campbell-Lendrum , A.L. Lozovei , U. Teodoro, Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field., *Med. Vet. Entomol.* 15 (2001) 132–139.
- [17] P. Mansueto, A. Seidita, G. Vitale, A. Cascio, Leishmaniasis in travelers: A literature review, *Travel Med. Infect. Dis.* 12 (2014) 563–581.
- [18] M.F. Pineda JA, Martín-Sánchez J, Macías J, Leishmania spp infection in injecting drug users, *Lancet.* (2002).
- [19] W.D. Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., & Souza, Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading., *Curr. Pharm. Des.* 8 (2002) 297–318.
- [20] A.S. Pasquale Mansueto, A.C. Giustina Vitale, Leishmaniasis in travelers: A literature review, *Travel Medicine and Infectious Disease* 12(6) (2014) 563-581
- [21] S. Kamhawi, The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in

- the establishment of Leishmania infections, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1765–1773.
- [22] A.D. Guillermo Arango Duque, Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means, *Curr. Opin. Microbiol.* 26 (2015) 32–40.
- [23] M. Garlapati, S., Dahan, E., & Shapira, Effect of acidic pH on heat shock gene expression in Leishmania, *Mol. Biochem. Parasitol.* 100 (1999) 95–101.
- [24] G.R. Costa, J.M. Stewart, Asymptomatic human carriers of Leishmania chagasi., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (2002) 334–337.
- [25] A.L. Bañuls, P. Bastien, Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection, *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (2001) 1451–1461.
- [26] S. Burza, S.L. Croft, M. Boelaert, Leishmaniasis, *Lancet.* 392 (2018) 951–970.
- [27] R.D. Pearson, A.D.Q. Sousa, STATE OF THE ART CLINICAL ARTICLE: Clinical Spectrum of Leishmaniasis, Oxford Journals, Oxford Univ. Press, 1996: pp. 1–11.
- [28] P.P. Aubry, Leishmanioses, *Med. Trop.* (2014) 1–8.
- [29] H. Louzir, K. Aoun, G.F. Späth, D. Laouini, E. Prina, K. Victoir, A. Bouratbine, Les leishmanioses vues au travers du réseau international des Instituts Pasteur, *Medecine/Sciences.* 29 (2013) 1151–1160.
- [30] Association française des enseignants en parasitologie et mycologie, Université virtuelle francophone, Leishmanioses, (2014).
- [31] P. Minodier, P. Parola, Cutaneous leishmaniasis treatment, *Travel Med. Infect. Dis.* 5 (2007) 150–158.
- [32] M.Z. Handler, P.A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, R.A. Schwartz, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives, *J. Am. Acad. Dermatol.* 73 (2015) 897–908.
- [33] C. David, L. Dimier-David, F. Vargas, M. Torrez, J.P. Dedet, Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87 (1993) 7–9.
- [34] P. Desjeux, B. Piot, K. O'Neill, J. Meert, Co-Infection a Leishmania/VIH dans le sud de l'heurope, *Médecine Trop.* 61 (2001) 187–193.
- [35] Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet J-P, The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years., *Clin Microbiol Rev.* 21 (2008) 334-359.
- [36] WHO, Leishmaniasis and HIV coinfection, http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html. (accessed June 21, 2018)
- [37] C.N. Ezra, N. Ochoa, Human Immunodeficiency Virus and Leishmaniasis, *J. Glob. Infect. Dis.* 21 (2010) 248–257.
- [38] WHO | Leishmaniasis, WHO. (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>
- [39] A.B. Karim Aoun, Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite.* 12 (2014) 215–223.
- [40] K. Aoun, A. Bouratbine, Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite.* 21 (2014) 14.
- [41] A.P. Alejandro Llanos-Cuentas, M. Braulio, C. Valencia, *Neuroparasitology and Tropical Neurology: Chapter 13. Neurological - Google Livres, Elsevier B.V, 2013.*
- [42] F. Bailey, K. Mondragon-Shem, P. Hotez, J.A. Ruiz-Postigo, W. Al-Salem, Á. Acosta-Serrano, D.H. Molyneux, A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0005739.
- [43] T. Vos, R. M. Barber, B. Bell, A. Bertozzi-Villa, S. Biryukov et. al., Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of, *Lancet.* 386 (2015) 743–800.

- [44] M. Karami, M. Douidi, M. Setorki, Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan , Iran, (2013) 30–37.
- [45] F. Mark S Bailey, MRCP, Diana N.J. Lockwood, Bsc, MD, Cutaneous leishmaniasis, *Clin. Dermatol.* 25 (2007) 203–211.
- [46] A. Oryan, M. Akbari, Worldwide risk factors in leishmaniasis, *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9 (2016) 925–932.
- [47] WHO, Leishmaniasis, Factsheets. (2018). <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. (accessed May 15, 2018)
- [48] Z. Majid, Leishmaniose cutanée, place de la cryothérapie dans le traitement de la population marocaine, 2018.
- [49] WHO, Status of endemicity of Cutaneous Leishmaniasis worldwide, (2016). https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1. (accessed September 25, 2017)
- [50] F. Guddo, E. Gallo, E. Cillari, A.M. La Rocca, P. Moceo, K. Leslie, T. Colby, Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in laryngeal tissue from an immunocompetent patient, *Hum. Pathol.* 36 (2005) 1140–1142.
- [51] U.S. Siah, T. Lavender, F. Charlton, S. Wahie, An unusual erysipelas-like presentation, *Dermatol. Online J.* 20 (2014) 21255.
- [52] C.B. Meireles, L.C. Maia, G.C. Soares, I.P.P. Teodoro, M. do S.V. Gadelha, C.G.L. da Silva, M.A.P. de Lima, Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review, *Acta Trop.* 172 (2017) 240–254.
- [53] WHO, Leishmaniasis and HIV coinfection (2015): http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/ (accessed September 18, 2017)
- [54] H. Talat, S. Attarwala, M. Saleem, Cutaneous leishmaniasis with HIV, *J. Coll. Physicians Surg. Pakistan.* 24 (2014) S93–S95.
- [55] S.H. Ayatollahi, A.F. Bafghi, Chronic zoster-form: a rare variant of cutaneous leishmaniasis, *Rev. Med. Microbiol.* 26 (2015) 114–115.
- [56] A.A. Alhumidi, Skin pseudolymphoma caused by cutaneous leishmaniasis, *Saudi Med. J.* 34 (2013) 537–538.
- [57] F. del Giudice, P. Marty, J.P. Lacour, C. Perrin, F. Pratlong, H. Haas, P. Dellamonica, Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: case reports and literature review, *Arch. Dermatol.* 134 (1998) 193–198.
- [58] P.F. L. Lopes, P. Vasconcelos, J. Borges-Costa, L. Soares-Almeida, L. Campino, An atypical case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Portugal, *Dermatol. Online J.* 19 (2013) 20407.
- [59] J.A. Close, M. González, L. Pinart, L. Reveiz, Interventions for old world cutaneous leishmaniasis, *Cochrane Database Syst. Rev.* C. (2008) D005067.
- [60] A. Pulimood, P. Rupali, S.S. Ajjampur, M. Thomas, S. Mehrotra, Atypical mucocutaneous involvement with *Leishmania donovani*, *Natl. Med. J. India.* 25 (2012) 148–150.
- [61] N.C. Hepburn, Cutaneous leishmaniasis: an overview, *J. Postgrad. Med.* 49 (2003) 50–54.
- [62] C. Neitzke-Abreu, M.S. Venazzi, R.B. de Lima Scodro, P.D. Zanzarini, A.C. da Silva Fernandes, S.M. Aristides, T.G. Silveira, Cutaneous leishmaniasis with atypical clinical manifestations: case report, *IDCases.* 1 (2014).
- [63] M.Z. handler, P.A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *J Am Acad Dermatol.* (2015) 897–908.
- [64] V. Piscopo, Leishmaniasis, *Postgrad. Med. J.* 83 (2007) 649–657.
- [65] C.G. Stark, Leishmaniasis, *Medscape* (2018): <https://emedicine.medscape.com/article/220298-overview>
- [66] D. Pace, Leishmaniasis, *J. Infect.* 69 (2014) S10–S18.

- [67] E.C. Otacilio C. Moreira, Zaida E. Yadon, The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives, *Acta Trop.* 184 (2018) 29–37.
- [68] G.L. Maroli M, Feliciangeli M, Bichaud L, Charrel R, Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern., *Med. Vet. Entomol.* 27 (2013) 123–147.
- [69] WR . Faber Oskam, L. van Gool , NC. Kroon, KJ. Knegt-Junk, H. Hofwegen, Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis., *J Am Acad Dermatol.* 49 (2003) 70-4.
- [70] B. Barraviera, The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD) from 1995 to 2007., 2007.
- [71] P. Salotra, Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 849–854.
- [72] R. Reithinger, J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, S. Brooker, Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 581–596.
- [73] M.H. Allahverdiyev AM, S .Uzun, M. Bagirova, M. Durdu, A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis., *Am J Trop Med Hyg.* 70 (2004) 297–7.
- [74] D.S. Mohammad Akhoundi, Tim Downing, Jan Votypka, Katrin Kuhls, Julius Lukes, Arnaud Cannet, Christophe Ravel, Pierre Marty, Pascal Delaunay, Mohamed Kasbari, Bruno Granouillac, Luigi Gradoni, *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis, *Mol. Aspects Med.* 57 (2017) 1–29.
- [75] S.G. Alam MZ, AK. Shamsuzzaman, K. Kuhls, PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh., *Trop Med Int Heal.* 14 (2009) 499–503.
- [76] G. Wortmann, L. Hochberg, HH. Houg, C. Sweeney, M. Zapor, N. Aronson, Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay., *Am J Trop Med Hyg.* 73 (2005) 999–1004.
- [77] L.D. Wall EC, Watson J, Armstrong M, Chiodini PL, Epidemiology of imported cutaneous leishmaniasis at the Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom: use of polymerase chain reaction to identify the species., *Am J Trop Med Hyg.* 86 (2012) 115–8.
- [78] S.S. Singh B, *Leishmaniasis : vaccine candidates and perspectives.*, *Vaccine.* 30 (2012) 3834–3842.
- [79] A.N. Das, Vaccine development against *Leishmania donovani.*, *Front Immunol.* 3 (2012) 99-99.
- [80] VS. Raman, MS. Duthie, CB. Fox, Adjuvants for *Leishmania* vaccines : from models to clinical application., *Front Immunol.* 3 (2012) 144.
- [81] R.S. Duthie MS, VS. Raman, FM. Piazza, The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines, *Vaccine.* 30 (2012) 134–141.
- [82] M. Moafi, R. Sherkat, R. Taleban, H. Rezvan, *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of litterature., *Int J Prev Med.* 95 (2019) 1-6.
- [83] A. Maroof, N. Brown, B. Smith, Therapeutic vaccination with recombinant adenovirus reduces splenic parasite burden in experimental visceral leishmaniasis., *J Infect Dis.* 205 (2012) 853–863.
- [84] S. Marzouki, M. Ben Ahmed, T. Boussoffara, Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis., *Am J Trop Med Hyg.* 84 (2011) 653–661.
- [85] S. Marzouki, M. Abdeladhim, CB. Abdessalem, Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans., *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (2012) e1911.
- [86] M. Abdeladhim, RC. Jochim, M. Ben Ahmed, Updating the salivary gland transcriptome of *Phlebotomus papatasi* (Tunisian strain) : the search for sand fly-secreted immunogenic proteins for humans., *PLoS One.* 7 (2012) e47347.

- [87] P. Aubry, *Maladies tropicales négligées*, Bordeaux, 2018. www.medicinetropicale.com
- [88] Centers for Disease control and Prevention, *Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)*, 2018.
- [89] WHO, *Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region*, WHO Librar, 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/120002> (accessed October 30, 2017)
- [90] J. Berman, Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment, *Curr Infect Dis Rep.* 7 (2005) 33–8.
- [91] E. Palumbo, Current treatment for cutaneous leishmaniasis: A review, *Am. J. Ther.* 16 (2009) 178–182. [do](https://doi.org/10.1097/JOT.0b013e3181911111)
- [92] P.J. Navin TR, Arana BA, Arana FE, De Merida AM, Castillo AL, Placebo-controlled clinical trial of meglumine antimonite (glucantime) vs. localized controlled heat in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Guatemala., *Am J Trop Med Hyg.* 42 (1990) 43–50.
- [93] W.D. Willard RJ, Jeffcoat AM, Benson PM, Cutaneous leishmaniasis in soldiers from Fort Campbell, Kentucky returning from Operation Iraqi Freedom highlights diagnostic and therapeutic options., *J Am Acad Dermatol.* 52 (2005) 977–87.
- [94] M.S. Gurei, N. Tatli, H. Ozbilge, Efficacy of cryotherapy and intralesional pentostam in treatment of cutaneous leishmaniasis., *J Egypt Soc Parasitol.* 30 (2000) 169–176.
- [95] B. Mischler, *Prise en charge de la leishmaniose cutanée : intérêt de nouvelles formulations de paromomycine topique*, 2017.
- [96] K.E. Sharquie, A.A. Noaimi, A.G. Al-Ghazzi, Treatment of cutaneous leishmaniasis by topical 25% podophyllin solution (single, blinded, therapeutic, controlled study), *J. Dermatology Dermatologic Surg.* 19 (2015) 108–113.
- [97] J. Roychoudhury, N. Ali, Sodium stibogluconate: Therapeutic use in the Management of Leishmaniasis, *Indian J. Biochem. Biophys.* 45 (2008) 16–22.
- [98] K.M. Sharquie, A.K. Hussian, Intralesional therapy of cutaneous leishmaniasis with hypertonic sodium chloride solution, *Pan-Arab Leag. Dermatol.* 5 (1994) 85–91.
- [99] J. Alvar, S. Croft, P. Olliaro, Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis, *Adv. Parasitol.* 61 (2006) 223–274.
- [100] M. Sharma, R. Sharma, D.K. Jain, Nanotechnology Based Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Water Soluble Antihypertensive Drugs, *Scientifica (Cairo)*. 2016 (2016).
- [101] N.A. Amato, F.F. Tuon, H.A. Bacha, V.A. Neto, Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment., *Acta Trop.* 105 (2008) 1–9.
- [102] A.O. Sereno, P. Holzmuller, I. Mangot, G. Cuny, J.L. Lemesre, Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 2064–2069.
- [102] H.L.N. N. Lee, S. Bertholet, A. Debrabant, J. Muller, R. Duncan, Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*., *Cell Death Differ.* 9 (2002) 53–64.
- [103] S. Sundar, D.K. More, M.K. Singh, V.P. Singh, S. Sharma, A. Makharia, P.C.K. Kumar, H.W. Murray, Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic, *Clin. Infect. Dis.* 31 (2000) 1104–1107.
- [104] H. Ramos, M. Saint-Pierre-Chazalet, M.; J. Bolard, Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes., *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 1079–1084.
- [105] N. Azas, C. Di Giorgio, F. Delmas, M. Gasquet, No evidence of oxidant events in amphotericin B cytotoxicity versus *L. infantum* promastigotes., *Parasite.* 8 (2001) 335–341.
- [106] C. Paris, P.M. Loiseau, C. Bories, J. Barrat, Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes., *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 852–859.

- [108] C. Mehta, Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11798–11813.
- [109] A. A. Jhingran, B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett, R. Madhubala, Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 164 (2009) 111–117.
- [110] G. Buates, S. and Matlashewski, Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action., *J. Infect. Dis.* 179 (1999) 1485–1494.
- [111] J.S. Alkhawajah AM, Larbi E, Al-Gindan Y, Abahussein A, Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intralesional administration, *Ann Trop Med Parasitol.* 91 (1997) 899–905.
- [112] M. Uzun S, Uslular C, Yucel A, Acar MA, Ozpoyraz M, HR., Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3074 cases in the Cukurova region of Turkey., *Br J Dermatol.* 140 (1999) 347–50.
- [113] J.J. Torrado, R. Espada, M.P. Ballesteros, Amphotericin B Formulations and Drug Targeting, *J. Pharm. Sci.* 97 (2007) 2405–2425.
- [114] G. Wortmann, M. Zapor, R. Ressler, S. Fraser, J. Hartzell, J. Pierson, A. Weintrob, A. Magill, Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83 (2010) 1028–1033.
- [115] C.P. Thakur, G.P. Sinha, A.K. Pandey, D. Barat, P.K. Sinha, Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar, *Natl. Med. J. India.* 6 (1993) 57–60.
- [116] J.C. G. Amidon, H. Lennernäs, V. Shah, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability, *Pharm. Res.* 12 (1995) 413–420.
- [117] D.B. Louria, Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man, *Antibiot. Med Clin Ther.* 5 (1958) 295–301.
- [118] J.S. Lanza, F.R. Fernandes, J.D. Corrêa-Júnior, J.M.C. Vilela, R. Magalhães-Paniago, L.A.M. Ferreira, M.S. Andrade, C. Demicheli, M.N. Melo, F. Frézard, Polarity-sensitive nanocarrier for oral delivery of Sb^V and treatment of cutaneous leishmaniasis, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 2305–2318.
- [119] E. Schnitzer, M.M. Kozlov, The effect of cholesterol on the solubilization of phosphatidylcholine bilayers by the non-ionic surfactant Triton X-100, *Chem. Phys. Lipids.* 135 (2005) 69–82.
- [120] S.O. Papahadjopoulos, S. Nir, Permeability properties of phospholipid membranes: Effect of cholesterol and temperature, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 266 (1997) 561–583.
- [121] C.D. Gregoriadis, Stability of liposomes in vivo and in vitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 89 (1979) 1287–1293.
- [122] J. Bolard, P. Legrand, F. Heitz, One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium, *Biochemistry.* 30 (1991) 5707–5715.
- [123] J.B. Legrand, E.A. Romero, B.E. Cohen, Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes, *Antimicrob Agents Chemother.* 36 (1992) 2518–2522.
- [124] P. Legrand, M. Cheron, L. Leroy, Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells, *J Drug Target.* 4 (1997) 311–319.
- [125] B. D. Mondal, J. Alvar, M.G. Hasnain, M.S. Hossain, D. Ghosh, M.M. Huda, S.G. Nabi, S. Sundar, G. Matlashewski, Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study, *Lancet Glob. Heal.* 2 (2014) e51–e57.
- [126] W. Panosian, M. Barza, F. Szoka, Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome-intercalated amphotericin B, *Antimicrob. Agents Chemother.* 25 (1984) 655–656.
- [127] P. Bhattacharya, N. Ali, Treatment of visceral leishmaniasis: anomalous pricing and distribution of AmBisome and emergence of an indigenous liposomal amphotericin B, *Fungisone, J. Parasit.*

- Dis. 40 (2016) 1094–1095.
- [128] G.J. Wijnant, K. Van Bocxlaer, V. Yardley, A. Harris, M. Alavijeh, R. Silva-Pedrosa, S. Antunes, I. Mauricio, S. Murdan, S.L. Croft, Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8 (2018) 223–228.
- [129] P. Shivam, S. Kumari, F. Jamal, V. Kumar, M. Kumar, S. Bimal, S. Narayan, V.N.R. Das, K. Pandey, A.K. Gupta, P. Das, S.K. Singh, Leishmania donovani resistant to Ambisome or Miltefosine exacerbates CD58 expression on NK cells and promotes trans-membrane migration in association with CD2, *Cytokine.* 96 (2017) 54–58.
- [130] B.Y. Frankenburg S, Glick D, Klaus S, Efficacious topical treatment for murine cutaneous leishmaniasis with ethanolic formulations of amphotericin B., *Antimicrob Agents Chemother.* 42 (1998) 3092–3096.
- [131] F.S. Vardy D, Barenholz Y, Naftoliev N, Klaus S, Gilead L, Efficacious topical treatment for human cutaneous leishmaniasis with ethanolic lipid amphotericin B., *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95 (2001) 184–186.
- [132] Brevet international WO2012042072A1: J. J. Torrado Duran, H. K. Ruiz Saldana, R. Serrano Lopez, G. Molero Martin-Portugues, C. Nombela Cano, F. Bolas Fernandez, M. A Dea Ayuela, P. E Bilbao Ramos, Topical amphotericin b formulations and production method thereof, 2012.
- [133] S. Varikuti, S. Oghumu, N. Saljoughian, M.S. Pioso, B.E. Sedmak, A. Khamesipour, A.R. Satoskar, Topical treatment with nanoliposomal Amphotericin B reduces early lesion growth but fails to induce cure in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania mexicana, *Acta Trop.* 173 (2017) 102–108.
- [134] S.E. Eskandari, A. Firooz, M. Nassiri-Kashani, M.R. Jaafari, A. Javadi, A. Miramin-Mohammadi, H. Valian-Keshavarz, A. Khamesipour, Safety Evaluation of Nano-Liposomal Formulation of Amphotericin B (Sina Ampholeish) in Animal Model as a Candidate for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis., *J. Arthropod. Borne. Dis.* 12 (2018) 269–275.
- [135] S. Sundar, T.K. Jha, C.P. Thakur, Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis., *N Engl J Med.* 347 (2002) 1739–1746.
- [136] J. Soto, J. Toledo, P. Gutierrez, Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. : The first clinical trial evaluating miltefosine in cutaneous leishmaniasis and comparing different schedules., *Clin Infect Dis.* 33 (2001) e57–e61.
- [137] J. Soto, J. Rea, M. Balderrama, Short report: efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis., *Am J Trop Med Hyg.* 78 (2008) 210–211.
- [138] P.R.L. Machado, G. Penna, Miltefosine and cutaneous leishmaniasis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25 (2012) 141–144.
- [139] J. Soto, B.A. Arana, J. Toledo, Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis., *Clin Infect Dis.* 38 (2004) 1266–1272.
- [140] M. Mohebbali, A. Fotouhi, B. Hooshmandb, Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran., *Acta Trop.* 103 (2007) 33–40.
- [141] P.P. van Thiel, T. Leenstra, P.A. Kager, Miltefosine treatment of Leishmania major infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan, *Clin Infect Dis.* 50 (2010) 80–83.
- [142] P. Machado, J. Ampuero, L.H. Guimaraes, Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial, *PLoS Negl Trop Dis.* 4 (2010) e912.
- [143] I. Velez, L. Lopez, X. Sanchez, Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis., *Am J Trop Med Hyg.* 83 (2010) 351–356.
- [144] Vidal : La miltéfosine, <https://www.vidal.fr/substances/15743/miltefosine/>. (accessed March 22, 2018)
- [145] G. Tracy, L.C. Simon, Topical treatment of cutaneous leishmaniasis, *Curr. Opin. Investig. Drugs.*

- 3 (2002) 1472–4472.
- [146] A.T. Schmidt-Ott R, Klenner T, Overath P, Topical treatment with hexadecylphosphocholine (MilteX) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis., *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93 (1999) 85–90.
- [147] T.P.C. Dorlo, M. Balasegaram, J.H. Beijnen, P.J. de Vries, Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 2576–2597.
- [148] A. Chrusciak-Talhari, R. Dietze, C.C. Talhari, Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia* guyanensis in Manaus, Brazil, *Am J Trop Med Hyg.* 84 (2011) 255–260.
- [149] P. Minodier, R. Piarroux, J.M. Garnier, D. Unal, Perrimond H, Pediatric visceral leishmaniasis in southern France, *Pediatr Infect Dis J.* 17 (1998) 701–4.
- [150] M. Nacher, B. Carne, M.D. Sainte, Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana., *Ann Trop Med Parasitol.* 95 (2001) 331–336.
- [151] E. Lightburn, J.J. Morand, J.B. Meynard, P. Kraemer, B. Chaudier, F. Pages, Thérapeutique des leishmanioses tégumentaires du Nouveau Monde. Expérience à propos de 326 cas traités par isethionate de pentamidine à fortes doses., *Med Trop.* 63 (2003) 35–44.
- [152] J. Soto, P. Buffet, M. Grogl, Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine., *Am J Trop Med Hyg.* 50 (1994) 107–111.
- [153] V. Amato, J. Amato, A. Nicodemo, Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate, *Ann Dermatol Venereol.* 125 (1998) 492–495.
- [154] B.J. Soto-Mancipe J, Grogl M, Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia., *Clin Infect Dis.* 16 (1993) 417–425.
- [155] S. Singh, R. Sivakumar, Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis, *J. Infect. Chemother.* 10 (2004) 307–315.
- [156] J.D. Berman, Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years., *Clin Infect Dis.* 24 (1997) 684–703.
- [157] S. Sundar, T. K. Jha, C. P. Thakur, P. K. Sinha, Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India *Journal of Medicine, N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 2571–2581.
- [158] J. El-On, G.P. Jacob, E. Witztum., C.L. Greenblatt, Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals, *Antimicrob. Agents Chemother.* 26 (1984) 745–751.
- [159] L. El-On, J. Halevy, S. Grunwald, M.H. Weinrauch, Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study., *J. Am. Acad. Dermatol.* 27 (1992) 227–231.
- [160] B.I. Ozgoztasi O, A randomized clinical trial of topical paromomycin versus oral ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Turkey., *Int J Dermatol.* 36 (1997) 61–3.
- [161] R.A. Neal, A.G. Murphy, P. Oliario, Aminosalicylic acid ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis, *R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88 (1994) 223–225.
- [162] V.K. Mahajan, N.L. Sharma, Therapeutic options for cutaneous leishmaniasis, *J. Dermatolog. Treat.* 18 (2007) 97–104.
- [163] PubChem, Methylbenzethonium chloride | C28H44ClNO2 - PubChem, US Natl. Libr. Med. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylbenzethonium_chloride (accessed April 3, 2018)
- [164] A. Iraj, F. and Sadeghinia, Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran., *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99 (2005) 3–9.
- [165] R. Armijos, M.M. Weigel, M. Calvopina, M. Mancheno, Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous

- leishmaniasis., *Acta Trop.* 91 (2004) 153–60.
- [166] A. Ben Salah, P.A. Buffet, G. Morizot, N. Ben Messoud, A. Zâatour, N. Ben Alaya, N.B. Haj hamida, Z. El Ahmadi, M.T. Downs, P.L. Smith, K. Dellagi, WR 279 396 a third generation aminoglycosid oitment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous Leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e432–e432.
- [167] A. Ben Salah, N. Ben Messaoud, E. Guedri, Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis, *N Engl J Med.* 368 (2013) 524–32.
- [168] A. Ben Salah, A. Zaâtour A, N. Ben Messaoud, A. Kidar, P.L. Smith, K.M. Kopydlowski, Parasite Load Decrease during Application of a Safe and Easily Applied Antileishmanial Aminoglycoside Cream., *PLoS Negl Trop Dis.* 8 (2014) e2749.
- [169] B.A. Chulay JD, Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis., *Am J Trop Med Hyg.* 32 (1983) 475– 479.
- [170] G. Arevalo, I., B. Ward, R. Miller, T. C. Meng, E. Najar, E. Alvarez, and A.L.-C. Matlashewski, Successful treatment of drugresistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator, *Clin. Infect. Dis.* 33 (2001) 1847–1851.
- [171] J. Seeberger, J., Daoud, S. and Pammer, Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod., *Int. J. Dermatol.* 42 (2003) 576–579.
- [172] I.M. Pinheiro, I.P. Carvalho, C. Ernanda, S. De Carvalho, L.M. Brito, A. Braga, A. Mendes, C. Júnior, F. Aécio, A. De Carvalho, A. Luis, M. Carvalho, Evaluation of the *in vivo* leishmanicidal activity of amphotericin B emulgel: an alternative for the treatment of
- [173] H.K. Ruiz, D.R. Serrano, M.A. Dea-Ayuela, P.E. Bilbao-Ramos, F. Bolás-Fernández, J.J. Torrado, G. Molero, New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp, *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 148–157.
- [174] F.D. Chan MM, Grogl M, Chen CC, Bienen EJ, Herbicides to curb human parasitic infections: *in vitro* and *in vivo* effects of trifluralin on the trypanosomatid protozoans., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (1993) 5657–61.
- [175] H. Iqbal, M. Ishfaq, A. Wahab, M.N. Abbas, I. Ahmad, A. Rehman, M. Zakir, Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review, *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6 (2016) 1–5.
- [176] S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B.* 5 (2015) 442–453.
- [177] R. Saffie-Siebert, J. Ogden, Nanotechnology approaches to solving the problems of poorly water-soluble drugs, *Drug Discov. World.* (2005).
- [178] N. Bavarsad, B.S. Fazly Bazzaz, A. Khamesipour, M.R. Jaafari, Colloidal, *in vitro* and *in vivo* anti-leishmanial properties of transfersomes containing paromomycin sulfate in susceptible BALB/c mice, *Acta Trop.* 124 (2012) 33–41.
- [179] Brevet international WO/2015/177820 : E. Britti, D. Cosco, D. Fresta, M. Paolino, D. Trapasso, Nanoparticulate systems for vehiculating drugs for the treatment of leishmania infection-related pathologies. PCT/IT2015/000134, 2015.
- [180] M.C. Monteiro, L.M., Löbenberg, R., Ferreira, E.I., Cotrim, P.C., Kanashiro, E., Rocha, M., Chung, N. Bou-Chacra, Targeting *Leishmania amazonensis* amastigotes through macrophage internalisation of a hydroxymethylnitrofurazone nanostructured polymeric system. , *Int. J. Antimicrob. Agents.* 50 (2017) 88–92.
- [181] A.R. Beheshti, N., Soflaei, S., Shakibaie, M., Yazdi, M.H., Ghaffarifarf, F., Dalimi, A., Shahverdi, Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: *In vitro* and *in vivo* studies., *J. Trace Elem. Med. Biol.* 27 (2013) 203–207.
- [182] A.M. Abamor, E.S. Allahverdiyev, A nanotechnology based new approach for chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: TIO₂@AG nanoparticles – *Nigella sativa* oil combinations., *Exp. Parasitol.* 166 (2016) 150–163.
- [183] A. Das, S. Roy, P. Mondal, S. Bera, T., Mukherjee, One pot synthesis of gold nanoparticles and

- application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis., *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 107 (2013) 27–34.
- [184] A.P. Silva, B.R. Nunes, M.C. De Oliveira, L.S. Koester, P. Mayorga, V.L. Bassani, H.F. Teixeira, Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein., *Pharmazie*. 64 (2009) 32–5.
- [185] WHO, World Health and Organization, Leish. (2000) (WHO/LEISH/2000.42) (accessed July 5, 2018)
- [186] G.M. Newman, D.J., Cragg, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *Journal Nat Prod* 70 (2007) 461-77.
- [187] F.M. Formagio AS, Kassuya CA, Neto FF, Volobuff CR, Iriguchi EK, Vieira Mdo C, The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill., *BMC Complement Altern Med*. 11 (2013) 13:14.
- [188] M.A. Lima, fitoterapia na saúde pública: visão do odontólogo. *Saúde em Revista.*, 8 (2006) 37–44.
- [189] T.S. Tagboto S, Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products., *Adv. Parasitol.* 50 (2001) 199-295.
- [190] I. Bennis, L. Belaid, V. De Brouwere, H. Filali, H. Sahibi, M. Boelaert, “The mosquitoes that destroy your face. Social impact of Cutaneous Leishmaniasis in South-eastern Morocco , A qualitative study, (2017) 1–13
- [191] D. Eid, M.S. Sebastian, A. Hurtig, I. Goicolea, Leishmaniasis patients ’ pilgrimage to access health care in rural Bolivia : a qualitative study using human rights to health approach, 4 (2019) 1–9
- [192] G. Odonne, G. Bourdy, D. Castillo, Y. Estevez, E. Deharo, R. Rojas, D. Stien, M. Sauvain, Tatta’ Huayani : Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru . Part II, 126 (2009) 149–158.
- [193] G. Odonne, E. Houël, G. Bourdy, D. Stien, Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies, *J. Ethnopharmacol.* 199 (2017) 211–230.
- [194] P. Blum, J., Lockwood, D.N.J., Visser, L., Harms, G., Bailey, M.S., Caumes, E., Buffet, Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Reevaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis., *Int. Heal.* 4 (2012) 153–163.
- [195] G. Odonne, E. Houël, G. Bourdy, D. Stien, Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies, *J. Ethnopharmacol.* 199 (2017) 211–230.
- [196] R.X. Weigel, M.M., Armijos, Traditional and conventional treatment of cutaneous leishmaniasis in Ecuador., *Pan Am. J. Public Heal.* 10 (2001) 395–404.
- [197] L.P. Kvist, S.B. Christensen, H.B. Rasmussen, K. Mejia, A. Gonzalez, Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis, 106 (2006) 390–402.
- [198] D.R. Mans, T. Beerens, I. Magali, R.C. Soekhoe, G.J. Schoone, K. Oedairadjsingh, J.A. Hasrat, E. Van Den Bogaart, H. Schallig, In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy, *J. Ethnopharmacol.* 180 (2016) 70–77.
- [199] P.M. Dewick, *Medicinal natural products - a biosynthetic approach.*, Wiley (Ed). Chippingham, Gt. Britain. (2009) 539 p.
- [200] N.G. Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, Natural products (secondary metabolites). In : *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Jones, R.L., Buchanan, B.B., Guissem, W. (Eds), *Am. Soc. Plant Physiol.* 1408 p (2000) 1250–1318.
- [201] M. Kansole, Mémoire de Diplôme d’Etudes Approfondies : Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de *leucas Martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia Opposita* Vahl et *Orthosiphon Pallidus* Royle ex Benth., 2009.

- [202] J. Bruneton, Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4eme édition., Revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009.
- [203] R. Anton, Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science thérapeutique., 2003.
- [204] S. Mittra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, H.K. Bandyopadhyay, S.Majumder, Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis., Mol. Med. 6 (2000) 527–541.
- [205] T. Sen, G., Mukhopadhyay, S., Ray, M., Biswas, Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity, J. Antimicrob. Chemother. 61 (2008) 1066–1075.
- [206] O.V. Yarishkin, H.W. Ryu, J.Y. Park, M. Yang, S.G. Hong, K.H. Par, Sulfonate chalcone as new class voltage-dependent K⁺ channel blocker, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 18 (1) (2008) 137–140.
- [207] C.F. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. , Life Sci. 65 (1999) 337–353.
- [208] P. Boeck, C.A.B. Falcão, P.C. Leal, R.A. Yunes, V.C. Filho, E.C. Torres-Santos, Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity, Bioorg Med. Chem. 14 (2006) 1538–1545.
- [209] M. Chen, S.B. Christensen, T.G. Theander, E. Lemmich, L. Nadelmann, K. Fich, T.G. Theander, Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*, Antimicrob. Agents Chemother. 37 (1993) 2550–2556.
- [210] A.K. M. Chen, S.B. Christensen, T.G. Theander, Antileishmanial activity of Licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*, Antimicrob. Agents Chemother. 38 (1994) 1339–1344.
- [211] A. Zhai, L., Blom, J., Chen, M., Christensen, S.B., Kharazmi, The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria., Antimicrob. Agents Chemother. 39 (1995) 2742–2748.
- [212] A. Zhai, L., Chen, M., Blom, J., Theander, T.G., Christensen, S.B., Kharazmi, The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action., J. Antimicrob. Chemother. 43 (1999) 793–803.
- [213] A. Chen, M., Zhai, L., Christensen, S.B., Theander, T.G., Kharazmi, Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. ., Antimicrob Agents Chemother. 45 (2001) 2023–2029.
- [214] A.F. Kayser, O., Kiderlen, *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones., Phytother. Res. 15 (2001) 148–152.
- [215] A. Hostettmann, K. Marston, Saponins, (Chemistry pharmacology of natural products), Cambridge Cambridge Univ. Press. (1995).
- [216] H. Kobayashi, K. Teruya, T. Suenaga, K. Matsui, Y. Masuda, H. Kigoshi, Isotheasaponins B1–B3 from *Camellia sinensis* var. *sinensis* tea leaves., Phytochemistry. 67 (2006) 1385–9.
- [217] K. Wojciechowski, Surface activity of saponin from *Quillaja* bark at the air/water and oil/water interfaces., Colloids Surfaces B Biointerfaces. 108 (2013) 95–102.
- [218] G. Ridoux, O. Di Giorgio, C. Delmas, F. Elias, R. Mshvildadze, V; Dekanosidze, P. Kemertelidze, E. Balansard, G. Timon-David, *In vitro* antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A(1), in association with pentamidine and amphotericin B, Phytother. Res. 15 (2001) 298–301.
- [219] Hederacolchiside A1 CAS:106577-39-3, Manufacturer ChemFaces : <http://www.chemfaces.com/natural/Hederacolchiside-A1-CFN94808.html> (accessed September 30, 2018)
- [220] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2ème édition, (the "Gold Book") (1997).
- [221] A. Fournet, A. Angelo, A. Muñoz, V. Roblot, F. Hocquemiller, R. Cavé, Biological and

- chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis., *J. Ethnopharmacol.* 37 (1992) 159–164.
- [222] A. Fournet, A., Barrios, A.A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Cavé, Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*., *Trop. Med. Parasitol.* 43 (1992) 219–222.
- [223] B. Hazra, B. Sarkar, R. Bhattacharyya, S. Ghosh, P.K. Chel, G. Dinda, Synthesis of plumbagin derivatives and their inhibitory activities against Ehrlich ascites carcinoma in vivo and *Leishmania donovani* promastigotes in vitro, *Phytother. Res.* 16 (2002) 133–137.
- [224] B. Mukherjee, P. Majee, S.B. Ghosh, S. Hazra, Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanalamine derivative., *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34 (2009) 596–601.
- [225] H.B. Harborne, *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants.*, 1995.
- [226] M. Hesse, *Alkaloids – Nature’s Curse or Blessing ?*, VHCA, Zürich. (2002).
- [227] D.K. Ghosh, A.K. Bhattacharyya, F.K. Ghosh, *Leishmania donovani*: amastigote inhibition and mode of action of berberine., *Exp. Parasitol.* 60 (1985) 404–413.
- [228] M.C Mohan, A.P Abhimannue, P.K Bée, Identification and characterization of Berberine in *Tinospora cordifolia* by Liquid chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry (LC MS/MS Q-Tof) and Evaluation of its anti-inflammatory potential, *Pharmacognosy Journal*, 9(3) (2017) 350-355.
- [229] M. Saha, P. Sen, R. Hariharan, C. Kumar, D. Das, P. Chatterjee, Berberine Chloride causes a caspase-independent, apoptotic-like death in *Leishmania donovani* promastigotes, *Free Radic. Res.* 43 (2009) 1101–1110.
- [230] C. Saha, P. Sarkar, A. Bhattacharjee, S. Hariharan, C. Laskay, T. Majumdar, Berberine Chloride modulates the MAP kinase pathway in host cells to mediate its anti-leishmanial activity. *Int. Conf. Adv. Free Radicals Res. Nat. Prod. Antioxidants Radioprot. Heal. Ninth Annu. Meet. Soc. Free Radic. Res.* , (2010) : p. 158.
- [231] S. Guimarães, L.R. Rodrigues, A.P., Marinho, P.S., Muller, A.H., Guilhon, G.M. Do Nascimento, J.L. Silva, Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*., *Parasitol. Res.* 107 (2010) 1075–1081.
- [232] C. Jean-Blain, Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins, *Rev. Méd. Vét.* 149 (1998) 911–920.
- [233] L.Y. Kolodziej, H. Kayser, O., Kiderlen, A.F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Foo, Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha-release in the murine macrophage-like cell line Raw264.7, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 1016–1021.
- [234] L.Y. Kolodziej, H. Kayser, O. Kiderlen, A.F. Ito, H. Hatano, T. Yoshida, T. Foo, Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha release in macrophages in vitro., *Planta Med.* 67 (2001) 825–832.
- [235] M.L. Mateos-Martín, E. Fuguet, C. Quero, J. Pérez-Jiménez, J. Lluís, T. Fuguet, Q. Pérez-Jiménez, New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (3) (2012) 1327–1336.
- [236] D.W. Christianson, Unearthing the roots of the terpenome., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 141–150.
- [237] Isoprène: Fiche de sécurité du programme international sur la sécurité des substances chimiques, (2009)
- [238] A.R. do Socorro, S. Rosa Mdo, S. Mendonça-Filho, R.R. Bizzo, H.R. Soares, R.M. Souto-Padrón, T. Alviano, C.S. Lopes, Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*., *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1895–1901.
- [239] R.K. Krishna, S. Uhlemann, A.C. Haynes, Artemisinin: mechanism of action and potential for 9

- [240] M. Sen, R. Ganguly, S. Saha, P. Chatterjee, Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis, *Int. J. Antimicrob. Agents*. 36 (2010) 43–49.
- [241] M.A. Torres-Santos, E.C. Lopes, D. Oliveira, R.R. Carauta, J.P. Falcão, C.A. Kaplan, B. Rossi-Bergmann, Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*., *Phytomedicine*. 11 (2004) 114–120.
- [242] E.V. Kigundu, G.M. Rukunga, J.M. Keriko, Anti-parasitic activity and cytotoxicity of selected medicinal plants from Kenya., *J Ethnopharmacol*. 25 (2009) 504–9.
- [243] F.F. Gharavi, M. Nobakht, S. Khademvatan, R.M. Bakhshayesh, The effect of aqueous garlic extract on interleukin-12 and 10 levels in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) infected macrophages., *Iran J Public Heal*. 40 (2011) 105–11.
- [244] M.A. Nilforoushzadeh, D.Y. Ghazanfari, The effect of garlic cream containing 5 % in the treatment of cutaneous leishmaniasis: a randomized double-blind, *J Ski. Dis. Study*. 3 (2000) 3–6.
- [245] M.L. Babaee Khou, M. Moheballi, M.R. Niakan Lahiji, A.Tavana, The therapeutic effect of Eucalyptus, Myrtus, Ferula, Aretmisia, Allium and Urtica extracts against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in small white mice (outbred), *Hakim*. 10 (2007) 21–7.
- [246] A. Fatahi Bafghi., H. Fallahzadeh, M.H. Mosadegh, Effectiveness of *Lawsonia inermis* Extract on Cutaneous Leishmaniasis Lesion in BALB/c Mice., *Kerman Uni Med Sci J*. 15 (2008) 329–35.
- [247] N. Masbi, F. Ghaffarifar, A.M. Bahrami, S. Bastaminejad, Evaluation of leishmanicidal effect of watery & ethanolic flowers *Calendula officinalis* extract on promastigotes of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro., *J Ilam Univ Med Sci*. 18 (2010) 28–33.
- [248] M. Yakhchali, Effects of *Nerium oleander* leaf, *Ricinus communis* oil, *Capsicum* spp. seeds, and almond compound on cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* species under laboratory condition and its effect on cutaneous lesion progression in mice., *Sci J Kurdistan Univ Med Sci*. 18 (2013) 13–9.
- [249] N. Yektaian, M. Rafieian, B. Khalili-Dehkordi, S.H Hejazi, L. Bidabadi, Effect of combination of *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* & *Juglans regia* leaves extracts, *Journal of Med Plants* 11 (2012) 197-204
- [250] S.J. M. Delavari, A. Dalimi Asl, F. Ghaffarifar, Effect of aloemodin on growth and induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes in vitro, *Feyz J Kashan Univ Med Sci*. 17 (2013) 422–8.
- [251] A.A.M. Assmar, M. Farahmand, Z. Aghighi, N. Ghaemi, In vitro and in vivo evaluation of therapeutic effects of *Vinca major* alkaloids on *Leishmania major*. *J Sch Public Heal. Inst Public Heal. Res*. 1 (2003) 1–8.
- [252] N. Torabi, M. Moheballi, S.M. Rezaei, G.H.H. Edrisian, S. Charehdar, Gold nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* Iranian strain: an experimental study on animal model with methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. *Pharm. Heal. Sci. J*. 1 (2010) 13–6.
- [253] M.S. Sadati, B. Sarkari, Q. Asgari, E.T. Hatami, The effect of *Echinacea purpurea* on cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania major*., *Armaghane Danesh Bimon. J*. 16 (2011) 61:31–40.
- [254] The effect of *Artemisia (Artemisia sieberi)* essential oils on the wound of *Leishmania major* in BALB/C mice., *Feiz J*. 11 (2007) 52–6.
- [255] The effect of alcoholic extract of barberry wounds caused by *Leishmania major* in BALB/c mice., *Fac. Public Heal. Inst. Heal. Res. J*. 5 (2007) 35–42.
- [256] P. Ebrahimi-Sadr, F. Ghaffarifar, Z.M. Hassan-Saraf, Effect of artemether on the recovery of lesions caused by *Leishmania major*., *Feyz J Kashan Univ Med Sci*. 16 (2013) 529–35.
- [257] M.P. Fattahi Bafghi, S.H. Hejazian., Immunosuppressive effects survey of *Lavandula spica L.* extract on Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice., *Iran. J. Med. Aromat. Plants*. 25 (2010)

- 540–6.
- [258] R. Chemli, Plantes aromatiques et médicinales de la flore de Tunisie, CIHEM : collections numériques, Options Méditerranéennes, 1997: pp. 119–125.
- [259] S.L. Polrat Wilairatana, Clinical use of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria, *Artemisia*, 2002: pp. 232–247.
- [260] M.A. Nabli, Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes, Tome I, Edition MAB (Faculté Des Sci. Tunis), (1989) 186-188
- [261] P. Quezel , S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, in: Edition Du Cent. Natl. La Rech. Sci. Paris, Tome I, 1962: p. 565 p.
- [262] N. Hamza, B. Berke, A. Umar, C. Cheze, H. Gin, N. Moore, A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*. 238 (2019) 111841
- [263] S. Salido, L. R. Valenzuela, J. Altarejos, M. Nogueras, A. Sanchez, Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain., *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004) 265–277.
- [264] C. E. Dunn, R. R. Brooks, J. Edmondson, Biogeochemical studies of metal-tolerant plants from southern Morocco., *J. Geochemical Explor.* 56 (1996) 13–22.
- [265] A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco., *J. Ethnopharmacol.* 58 (1997) 45–54.
- [266] N-A. Zeggwagh, O. Farid, J. B. Michel, Cardiovascular effect of *Artemisia herba-alba* aqueous extract in spontaneously hypertensive rats., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 30 (2008) 375–81.
- [267] A. Tahraoui, J. El-Hilaly, Z. H. Israili, Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province), *J. Ethnopharmacol.* 110 (2007) 105–17.
- [268] M. Laid, Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herba-alba*., *Phytochem. Lett.* 1 (2008) 85–88.
- [269] Z. Ghrabi. R.L. Sand, *Artemisia herba alba* Asso, A Guid. to Med. Plants North Africa., (2008) 49-49.
- [270] F. Fenardji, M. Klur, White artemisia, (*Artemisia herba-alba*), *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 27 (1974) 203–6.
- [271] A. Messaï, M.C. Abdeldjelil, S. Beghoul, A.R. Bensegueni, Effet antiprotozoaire de l'artémisinine : Histoire des découvertes et applications en médecine vétérinaire, in: Le 2ème Séminaire Int. Sur Les Plantes Médicinales SIPM'2, 2011: p. 2011.
- [272] OMS, Récapitulatif de la politique de l'OMS - mai 2010 : Plan mondial de lutte contre le paludisme, Genève, OMS, coll. « Rapport techniques », 2010.
- [273] F.Y. Yang, D.M. Liew, Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis., *Parasitology*. 106 (1993) 7–11.
- [274] A. Hatimi, M. Boudouma, M. Bichichi, Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso., *Thérapeutique*, *Bull. La Société Pathol. Exot.* 94 (2001) 29–31.
- [275] A. Mathlouthi, M. Belkessam, M. Sdiri, M.F. Diouani, A. Souli, S. El-Bok, M. Ben-Attia, Chemical Composition and Anti-Leishmania Major Activity of Essential Oils from *Artemisia* spp. Grown in Central Tunisia, *J. Essent. Oil-Bearing Plants*. 21 (2018) 1186–1198.
- [276] Z. Aloui, C. Messaoud, M. Haoues, N. Neffati, I.B. Jamoussi, K. Essafi-benkhadir, M. Boussaid, I. Guizani, H. Karoui, *herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2016 (2016) 1–15.
- [277] F.Z. Belfadel, Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat), 2009.
- [278] J. Bellakhdar, *Le Maghreb à travers ses plantes: plantes, productions végétales et traditions au Maghreb*. Eds. Le fennec., 2003.

- [279] N. Smail-Saadoun, Types stomatiques du genre Pistacia: Pistacia atlantica Desf.ssp., in: Atl. Pist. Lentiscus L., 2002: p. p369.
- [280] S. Belhadj, Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie, 2000.
- [281] https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Pistacia_lentiscus_002.jpg, Photo du pistachier lentisque, (accessed May 15, 2018)
- [282] S. Ouelmouhoub, Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: cas des subéraies du Parc National d'El Kala (Algérie)., 2005.
- [283] P. Tshisikhawe, Medicinal Plants Medicinal Plants, Sci. Technol. (2002) 36–38.
- [284] M. Sanz, M.J., Terencio, M.C., Paya, Isolation and hypotensive activity of a polymeric procyanidin fraction from Pistacia lentiscus L., Pharmazie. 47 (1992) 466–471.
- [285] M.J. Wyllie, S.G., Brophy, J.J., Sarafis, U., Hobbs, Volatile components of the fruit of Pistacia lentiscus., J. Food. Sci. 55 (1990) 1325–1326.
- [286] C.S. Scherrer, A.M. Motti, R., Weckerie, Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (compania, southern Italy)., J. Ethnopharmacol. 97 (2005) 129–143.
- [287] A.M.Y. Abdel-Rahman, A.H.Y. Soad, Mastic as antioxidant., J. Am. Oil Chem. Soc. 52 (1975) 423.
- [288] S. Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var.chia, Planta Medology. 65 (1999) 749–751.
- [289] N.K. Dedoussis, G.V. Kaliora, A.C. Chiou, A. Mylona, A. Papadopoulos, N.G. Andrikopoulos, Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression., Atherosclerosis. 174 (2004) 293–303.
- [290] A.J. Prichard, The use of essential oils to treat snoring., Phyther. Res. 18 (2004) 696–699.
- [291] T. Baytop, Therapy with medicinal plants in turkey (past and present)., IstanbulPublications Istanbul Univ. 3255 (1984) pp 305.
- [292] T. Baytop, Therapy with medicinal plants in turkey- Past and Present, Nobel Publ. Istanbul. (1999).
- [293] M.J. Huwez, F.U., Al-Habbal, Mastic in the treatment of benin gastric ulcers., Gastroenterol. Jpn. 21 (1986) 273–274.
- [294] F.U. Al-Habbal, M. J., Al-Habbal, Z., Huwez, A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 11 (1984) 541–544.
- [295] M. Al-said, M.S., Ageel, A. M., Parmar, N. S., Tarik, Evaluation of mastic a crude drug obtained from Pistacia lentiscus for gastric and duodenal anti-ulcer activity., J. Ethnopharmacol. 15 (1986) 271–278.
- [296] T.Y. Yasilada, E. Honda, G. Sezik, E. Tabata, M. Fujita, T. Tanaka, Traditional medicine inTurkey V: Folk medicine in the inner Taurus Mountains., J. Ethnopharmacol. 46 (1995) 133–152.
- [297] P.E. Tuzlaci, E., Aymaz, Turkish folk medicinal plants, Part IV: (Gonen (Bahkesir)., Fitoterapia. 72 (2001) 323–343.
- [298] S.C. De pooter, H.L. Schamp, N.M. Aboutabl, E.A. Eltohamy, S.F. Doss, Essential oils from the leaves of three Pistacia species grown in Egypt., Flavour Fragr. J. 6 (1991) 229–232.
- [299] L. Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., Perversi, Bactericidal activity of Pistacia lentiscus mastic gum against Helicobacter pylori., J. Chemother. 13 (2001) 611–614.
- [300] P. Balan, K.V., Demetzos, C., Prince, J., Dimas, K., Cladaras, M., Han, Z., Wyche, J.H., Pantazis, Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product. Chios mastic gum., In Vivo (Brooklyn). 19 (2005) 93–102.
- [301] P. Balan, K.V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, G.H., Sitaras, N.M., Pantazis, Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer celles

- treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. Chia., *Phytomedicine*. 14 (2007) 263–172.
- [302] M. Bammou, A. Daoudi, I. Slimani, M. Najem, E. Houssine, J. Ibjibijen, Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus* L. »: Étude ethnobotanique , Screening phytochimique et pouvoir antibactérien, (2015) 7966–7975.
- [303] M. Villar, A. Sanz, M.J., Payo, Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L., *Int J Crude Drug Res*. 25 (1987) 1–3.
- [304] A. Paraschos, S. Magiatis, P. Mitaku, S., Petraki, K., Kaliaropoulos, A., Maragoudakis, P., Mentis, Sgouras, D., Skaltsounis, A.L., In vitro and in vivo activity of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. , *Antimicrob Agents Chemother*. 51 (2007) 551–559.
- [305] H. Janakat, S., Al-Merie, Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*., *J. Ethnopharmacol*. 83 (2002) 135–138.
- [306] M.E. Kordali. S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in turkey., *Fitoterapia*. 74 (2003) 164–167.
- [307] M. Ali-Shtayeh, M.S. Yaghmour, R.M.R. Faidi, Y.R. Salem, K.A. Al-Nuri, Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area., *J. Ethnopharmacol*. 60 (1998) 265–271.
- [308] J. Ali-Shtayeh, M.S., Yaniv, Z., Mahajna, Ethnobotanical survey in the palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants., *J. Ethnopharmacol*. 73 (2000) 221–232.
- [309] J. Bellakhdar, La Pharmacopee Marocaine Traditionnelle : Medecine Arabe Et Savoirs Populaires. Editions Le Fennec, (Ed.) (Eds.), Ibis Press, Casablanca, Morocco, 1997.
- [310] A. Bouyahya, I.C. Chadon Assemian, H. Mouzount, I. Bourais, A. Et-Touys, H. Fellah, A. Benjouad, N. Dakka, Y. Bakri, Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs?, *Ind. Crops Prod*. 128 (2019) 62–69.
- [311] M. Taran, M. Moheballi, In vivo efficacy of gum obtained *Pistacia atlantica* in experimental treatment of cutaneous leishmaniasis, Iran. *J. Public Health*. 39 (2010) 36–41.
- [312] I. Orhan, M. Aslan, B. Sener, M. Kaiser, *In vitro* antiprotozoal activity of the lipophilic extracts of different parts of Turkish *Pistacia vera* L, *Phytomedicine*. 13 (2006) 735–739.
- [313] H. Mahmoudvand, E. Saedi Dezaki, B. Ezatpour, I. Sharifi, F. Kheirandish, M. Rashidipour, *In Vitro* and *In Vivo* Antileishmanial Activities of *Pistacia vera* Essential Oil., *Planta Med*. 82 (2016) 279–284. doi:<https://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1558209>.
- [314] B. Ezatpour, E. S. Dezaki, H. Mahmoudvand, M. Azadpour, *In Vitro* and *In Vivo* Antileishmanial Effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*, *Evidence-Based Complement. Altern. Med*. 2015 (2015) 1–6.
- [315] Z. Djerrou, Z. Maameri, Y. Hamdi-Pacha, M. Serakta, F. Riachi, H. Djaalab, A. Boukeloua, Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound’s healing in rabbits., *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM*. 7 (2010) 258–63.
- [316] L. de Fátima Antonio, M. Rosandiski Lyra, M. Naoto Saheki, A. de Oliveira Schubach, L. de Freitas Campos Miranda, M. de Fátima Madeira, M. Cristina da Silva Lourenço, A. Fagundes, É. Aparecida dos Santos Ribeiro, L. Barreto, M. Inês Fernandes Pimentel, Effect of secondary infection on epithelialisation and total healing of cutaneous leishmaniasis lesions, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 112 (2017) 640–646.
- [317] F. Aouinti, B. Imelouane, M. Tahri, J.P. Wathelet, H. Amhamdi, A. Elbachiri, New study of the essential oil, mineral composition and antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco, *Res. Chem. Intermed*. 40 (2014) 2873–2886.
- [318] P. Goetz, Citrus limon (L.) Burm. f. (Rutacées) citronnier, *Phytothérapie*. 12 (2014) 116–121.
- [319] F. Millet, Huiles essentielles et essence de citronnier (Citrus limon (L.) Burm. f.), *Phytothérapie*. 12 (2014) 89–97.

- [320] R. Goodrich, Citrus fruits : Lemons., *Encycl. Food Sci. Nutr.* (2003) 1354–1359.
- [321] Tela botania, eFlora, *Citrus limon* (L.) Burm f. (2019)
- [322] Photographie du citronnier, site Pixabay : <https://pixabay.com/fr/photos/citronnier-arbre-citron-nature-225907> (accessed May 17, 2018)
- [323] Theophrastus, A. Hort (Ed.), *Enquiry into Plants 1*, Harvard Univ. Press. William Heinemann Ltd., Cambridge, Massachusetts, London. (1968).
- [324] A. Athenaeus, *The Deipnosophists: With an English Translation by Charles Burton Gulick: The Loeb Classical Library.*, (1928).
- [325] G.A. de Herrera, In: Martínez Carreras, J.U. (Ed.), *Obra de agricultura.*, Atlas, Madrid. 1513 (1970).
- [326] P. Dioscorides, *Acerca de la materia medicinal y de los venenos mortiferos.* J. Latio, Antwerp., Edition Ed. de Salamanca, (1983) p 1555.
- [327] E. Pliny, H. Rackham, *Natural History in ten volumes 4 Libri XII–XVI.*, William Heinemann Ltd., Harvard University Press, London, Cambridge, Massachusetts, 1968.
- [328] G.S. Abu Marwan, *Kitab al-agdiya.* Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Cooperación con el Mundo Árabe, Madrid., 1992.
- [329] C.P. Khare, *Indian medicinal plants., An Illus. Dictionary,* Springer. (2007).
- [330] A.M. Lorenzi H, *Plantas Medicinaias no Brasil,* Instituto Plantarum de Estudos de Flora, LTDA, 2002.
- [331] U. Graebin, C.S., Madeira, M., de, F., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Miguel, D.C., V.L. S.R.B., Benitez, D., Eifler-Lima, *Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against Leishmania and Trypanosoma.*, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1524–1528.
- [332] D.C. Arruda, D.C. Miguel, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, A.M. Katzin, S.R.B. Uliana, *Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo,* *Biomed. Pharmacother.* 63 (2009) 643–649.
- [333] C. Ravichandran, P.C. Badgular, P. Gunday, A. Updhyay, *Review of toxicological assessment of d-limonene: a food and cosmetics additive,* *Food and Chemical Toxicology.* 120 (2018) 668-680
- [334] A. Gharagozloo, M., Ghaderi, *Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells.,* *J. Ethnopharmacol.* 77 (2001) 85–90.
- [335] W.M. Otang, A.J. Afolayan, *Antimicrobial and antioxidant efficacy of Citrus limon L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South*

Chapitre 2 : Evaluation *in vitro* de l'activité antileishmanienne des huiles essentielles et des extraits de différentes plantes

Ce chapitre est consacré à la première étape de notre travail qui correspond à la récolte et à l'extraction des molécules bioactives à partir du matériel végétal sélectionné, à savoir *Artemisia herba-alba*, *Pistacia lentiscus* et *Citrus limon*. Afin d'extraire le plus grand panel de molécules bioactives, pour chaque espèce, nous avons varié les paramètres suivants : la région de récolte, la technique d'extraction et la nature du solvant d'extraction. Ceci nous a permis d'extraire, pour chaque espèce, différentes huiles essentielles et extraits organiques. Afin d'élucider la composition, en plus de la caractérisation par GC-MS des huiles essentielles, divers dosages de familles chimiques ont été effectués. L'activité antileishmanienne a été ensuite évaluée *in vitro* sur deux formes du parasite, *Leishmania major*, causant la leishmaniose cutanée. Leur cytotoxicité a été aussi testée sur les cellules hôtes. Par ailleurs, l'activité antioxydante de tous les extraits et huiles essentielles a été ensuite étudiée selon deux méthodes.

Dans la première section de ce chapitre seront abordées l'extraction, la caractérisation physico-chimique des différentes huiles essentielles, ainsi que leur activité antiparasitaire contre *L. major*. Cette partie est rédigée en anglais sous forme d'un article scientifique (Publication 1). La seconde section, rédigée en français, portera sur la caractérisation et l'activité antileishmanienne *in vitro* des extraits organiques obtenus à partir des mêmes plantes sélectionnées.

A l'issue de ce chapitre, une dernière section sera dédiée à la sélection de l'extrait le plus actif et le moins toxique afin de l'encapsuler par la suite dans une NE qui est le système de libération de substances actives sélectionné dans le cadre de notre étude.

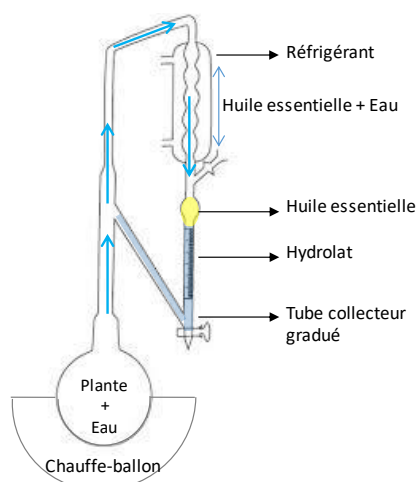
Section I. Evaluation *in vitro* de l'activité antileishmanienne des huiles essentielles des différentes plantes

I.1. Récolte et préparation du matériel végétal

La récolte du matériel végétal s'est déroulée en Tunisie, entre Septembre 2016 et Février 2017, dans deux sites différents pour chacune des plantes choisies. Les caractéristiques géographiques et édaphiques des régions sont détaillées dans le « supplementary materials » de la Publication 1.

I.2. Technique d'extraction : l'hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle (HE) a été réalisée par hydrodistillation. Il s'agit de la technique la plus simple et la plus ancienne pour une étude concernant les composés volatils d'une plante*. Son principe repose sur l'action de l'élévation de température sur la libération des molécules aromatiques par éclatement des cellules végétales. Des vapeurs d'eau mélangées aux molécules volatiles sont alors entraînées dans un réfrigérant, ce qui entraîne leur condensation et la formation de deux phases séparées par différence de densité : une phase organique, de densité généralement inférieure à celle de l'eau, qui est l'HE (contenant la majorité des molécules aromatiques), ainsi qu'une deuxième phase aqueuse en dessous, appelée hydrolat ou eau florale renfermant très peu de molécules aromatiques. Ces deux phases sont recueillies en bas du réfrigérant dans un tube collecteur (Fig. 16).



↑ : sens d'entraînement des molécules aromatiques

Figure 2.1 : Dispositif de type Clevenger pour hydrodistillation

* : A. El Haib, Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat, France (2011)

I.3. Publication 1: *In vitro* antileishmanial efficacy of essential oils from selected Tunisian plants

L'étude de l'activité antileishmanienne *in vitro* ainsi que la cytotoxicité des huiles essentielles extraites des plantes récoltées est présentée sous la forme d'une publication rédigée en anglais destinée à être soumise à une revue internationale. L'objectif de cette étude est de valoriser les huiles essentielles (EssOils) issues de plantes aromatiques et médicinales de Tunisie en tant que nouvelles substances antileishmaniennes. En effet, la recherche de molécules bioactives issues de la flore représentent une alternative aux traitements conventionnels à base d'agents chimiothérapeutiques afin de contourner les problèmes de toxicité et de résistance. Pour cela, trois plantes ont été sélectionnées pour leur potentiel antileishmanien décrit notamment dans les pratiques de la médecine traditionnelle : *Artemisia herba-alba* (*Artemisia*), *Citrus Limon* (*Citrus*) and *Pistacia lentiscus* (*Pistacia*). Chaque espèce a été récoltée de deux régions différentes (area 1 et area 2) de la Tunisie puis les huiles essentielles (EssOils) respectives ont été extraites. La caractérisation de ces EssOils a été réalisée par GC-MS, puis l'activité antiparasitaire *in vitro* a été testée sur deux formes du parasite *Leishmania major* : amastigote axénique et amastigote intramacrophagique. Leur toxicité *in vitro* a été également évaluée sur les cellules hôtes. Les résultats ont prouvé une activité intéressante de *Citrus* EssOil de area 1 et de *Artemisia* EssOil de area 1 sur la forme amastigote intramacrophagique avec des IC₅₀ de 4,2 ±1,3 µg/mL et 2,8 ±0,4 µg/mL, respectivement. Ces EssOils possèdent une activité comparable à celle du contrôle positif, la miltéfosine. Une activité modérée a été mesurée pour *Pistacia* EssOil de area 1 et *Citrus* EssOil de area 2. Par ailleurs, une faible cytotoxicité a été prouvé uniquement par *Citrus* EssOil de area 1 et *Artemisia* EssOil de area 1 avec un indice de sélectivité élevé (SI). La meilleure sélectivité a été démontrée par *Artemisia* de area 1 avec un SI de 16. Il est à noter que cette étude a prouvé pour la première fois l'activité antileishmanienne des EssOils extraites des feuilles du *Citrus limon*. Ces activités antileishmaniennes intéressantes pourraient être dues aux propriétés lipophiles des terpènes qui contribuent à la perturbation des voies métaboliques du parasite intracellulaire.

PUBLICATION 1

In vitro antileishmanial efficacy of essential oils from selected Tunisian plants

Zeineb Maaroufi^{a,b}, Sandrine Cojean^c, Philippe M. Loiseau^c, Marwa Yahyaoui^b, Florence Agnely^a, Manef Abderraba^b, Ghazlene Mekhloufi^{a*}

^aUniversité Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

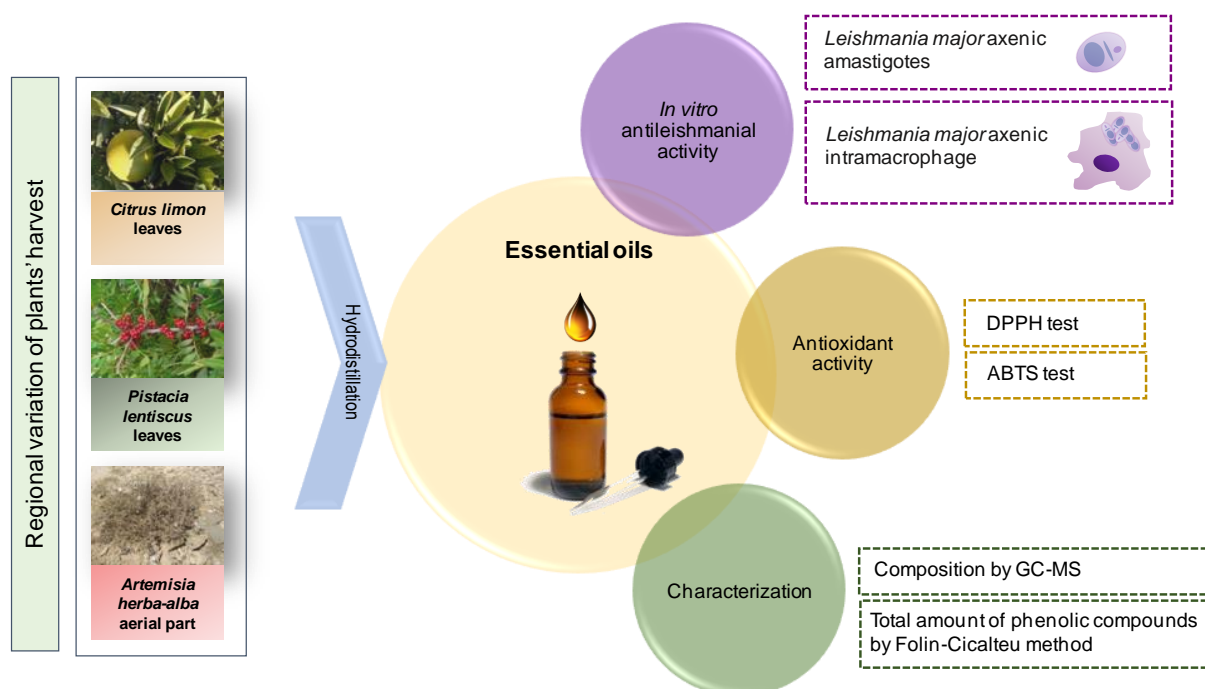
^bLaboratoire Matériaux Molécules et applications, Institut préparatoire des études scientifiques et techniques (IPEST), Univ. De Carthage, La Marsa, Tunisie

^c Université Paris-Saclay, CNRS, BioCIS, 92290, Châtenay-Malabry, France.

* corresponding author

E-mail: ghazlene.mekhloufi@universite-paris-saclay.fr

Graphical abstract



Abbreviations

EssOil: Essential oil; CL: Cutaneous leishmaniasis; HePC: Miltefosine; SI: Selectivity index.

Abstract

Leishmaniasis is a tropical parasitic disease that affects up to 12 million people worldwide. Current chemotherapies have limitations such as toxicity, high cost, and parasite resistance. This work aims to select an essential oil (EssOil) isolated from the Tunisian flora as a new antileishmanial candidate. Three plants were chosen for their antileishmanial potential

previously reported on traditional medicine: *Artemisia herba-alba* (*Artemisia*), *Citrus Limon* (*Citrus*) and *Pistacia lentiscus* (*Pistacia*). Each of these plants was harvested from two different sites (area 1 and area 2).

Extracted EssOils were characterized using GC-MS. Their antiparasitic activity against axenic and intracellular *Leishmania major* amastigotes and their cytotoxicity were assessed. *Citrus* EssOil from area 1 and *Artemisia* EssOil from area 1 displayed interesting activity against *L. major* intramacrophage amastigotes with IC₅₀ values at $4.2 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ and $2.8 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$, respectively. Interestingly, these activities were close to those of miltefosine. Moderate activities against intracellular amastigote were observed for *Pistacia* EssOil from area 1 and *Citrus* EssOil from area 2. However, low cytotoxicity with high selectivity index was proved only for *Citrus* EssOil from area 1 and *Artemisia* EssOil from area 1. The best selective antiparasitic effect was obtained for *Artemisia* from area 1 with selectivity index value of 16. This study also demonstrated for the first time the antileishmanial activity of EssOil extracted from *Citrus limon* leaves. These interesting activities could be related to the lipophilic properties of terpenes that were shown in literature to contribute to the disruption of parasite intracellular metabolic pathways.

Keywords

Essential oil; Antileishmanial activity; Cytotoxicity; *Artemisia herba-alba*; *Citrus limon*; *Pistacia lentiscus*

1. Introduction

Leishmaniasis is a tropical and sub-tropical disease caused by the protozoan *Leishmania* parasites and transmitted by the bite of infected female phlebotomine sandflies. This complex disease with various manifestations can be classified in three clinical forms: visceral (also known as kala-azar), cutaneous, and mucocutaneous forms [1].

Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form, is endemic in 85 countries and about 0.6 to 1 million new cases occur worldwide annually [2], whereas only 19 % to 37 % cases are reported by health authorities [1]. Depending on the *Leishmania* species, the disease may cause skin lesions at the site of infective sand fly inoculation or even multiple ulcerative lesions [2]. Among *Leishmania* species, *L. major* and *L. tropica* represent species that cause most CL cases in the Old World [3]. Lesions caused by *L. major* appear as severely inflamed, tend to be exudative, large, and may be complicated by superficial and secondary bacterial infections. Spontaneous healing is then observed within 2 to 8 months but with indelible scars on the exposed parts of the body, such as face and limbs. Lesions may be multiple, mainly in non-immune patients, causing serious disability and leaving permanent scars that lead to serious social prejudice [1,4].

Currently, in the absence of a vaccine, pentavalent antimonial drugs, given parenterally or intralesionally are the first line treatment of CL and require long course administration. Several limitations related to their toxicity have been reported such as pancreatitis, cardiotoxicity, hepatotoxicity, anemia, blood disorder, etc. Moreover, this treatment regimens have limitations like high cost, drug resistance, and risk of relapse [5]. In case of treatment failure, alternative drugs can be used such as amphotericin B, paromomycin, pentamidine, or miltefosine. Despite their good clinical results, adverse side effects, such as nausea, vomiting, anemia, fever, and possibly drug resistance, are limiting factors in their use [6]. Therefore, to overcome these drawbacks, different formulations of amphotericin B have been developed like liposomal forms (AmBisome[®]), lipidic complex forms, and colloidal dispersion forms. However, the high cost of these innovative formulations is the main limiting factor of the use and is a barrier to effective disease control, especially in underdeveloped countries [7].

Consequently, the development of new drugs, less or nontoxic, more efficient, and cheaper, which would be accessible especially for low-income people, is becoming a priority [8]. Within this framework, the WHO recommends the use of traditional medicine where appropriate health services are inaccessible [9]. Therefore, one way to identify alternative natural and safe source of antileishmanial molecules, is to perform a biological screening from plants already used in traditional medicine for several health indications. Medicinal plants are source of a wide range of bioactivity due to the presence of secondary metabolites, acting through diverse modes of action. Plants and extracts have been used for many centuries as natural remedies especially for parasitic diseases because of the long association between the coexistence of parasites, human, and herbal remedies [10]. Within the group of natural products, essential oils (EssOils) are oily odorant products extracted, by several extraction methods, from different parts of the plant raw material. Owing to their complex composition in terpenes, EssOils are known to have a broad spectrum of interesting biological activities including antileishmanial properties [11]. Moreover, their physicochemical properties, such as low density (around 0.94 g/m³) and lipophilicity, that allows a rapid diffusion through the cell membrane, can enhance the targeting of EssOils active components to intracellular parasites [10].

The present work deals with the investigation of antileishmanial potentialities of EssOils extracted from medicinal and aromatic plants from Tunisian flora. Inspired by data on folk medicine and literature, three plants were chosen: *Artemisia herba-alba* (*Artemisia*), *Pistacia lentiscus* (*Pistacia*), and *Citrus limon* (*Citrus*).

Artemisia herba-alba is a medicinal and strongly aromatic shrub, commonly known as "the white wormwood" and in arabic as "Chih". This spontaneous *Artemisia* species grows in arid areas of the Mediterranean basin extending to northwestern Himalayas. In traditional medicine, this plant has been used by many cultures to treat diabetes, arterial hypertension, and stomach disorders especially for its antihelminthic properties. Herbal tea has been used as analgesic,

hemostatic, antibacterial, and antispasmodic agents [12-14]. This plant belongs to the family of *Asteraceae* which has the best described antileishmanial effect. The sesquiterpenes lactone extracted from the aqueous extracts of *Artemisia* species including artemisinin and artemether were proved to be highly effective drugs against many *Leishmania* species [9]. The effectiveness of this plant in traditional medicine in wound healing and cutaneous infections has also been demonstrated [15]. Moreover, many studies have focused on the antileishmanial capacity of *Artemisia* essential oil especially in the Mediterranean region [16,17].

In another hand, *Pistacia lentiscus* is a plant belonging to the family of Anacardiaceae. Locally known under the name "Dharw", it is a perennial shrub commonly used as a traditional cure for hypertension, gastrointestinal disorders (stomach aches, diarrhea, dysentery), diseases of the urinary tract, the respiratory tract (cough, chronic bronchitis, phthisis, asthma), and for dental disorders [18]. Studies related to the antileishmanial potential of *Pistacia lentiscus* are very scarce. Recently, Bouyahya et al. showed the high potential of EssOil extracted from leaves against *L. major* parasites [19]. This study also described an interesting activity of the oil extracted from *Pistacia lentiscus* fruit against *L. infantum*. In the present work, our choice was inspired by previous studies elaborated by Bachrouch et al. that showed an interesting activity of EssOil extracted from *Pistacia lentiscus* leaves against *L. donovani* parasite [20]. This finding led to a national patent (N°TN2013/0129). Additionally, leaves of *Pistacia l.* have been mentioned in folk medicine reports to have a wound healing activity [21,22].

Finally, EssOil of *Citrus limon* was also selected because of its antiparasitic potential. This plant belongs to the *Rustaceae* family that is characterized by its high therapeutic potential. In folk medicine, leaves have been largely used to treat obesity, diabetes, as blood lipid lowering, for cardiovascular diseases, brain disorders, and certain types of cancer [23,24]. *Citrus* EssOil has been reported for its antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory capacities to treat skin diseases [25]. Traditionally, this EssOil was frequently used to reduce skin itching and to nourish skin. Moreover, the pulp left after extraction of lemon juice was reported to treat pimples and wrinkles or to soften facial skin [26,27]. To the best of our knowledge, *Citrus limon* antileishmanial activity is investigated for the first time. However, limonene, one of the major bioactive molecules in *Citrus L.* plant, has been described to exhibit an interesting antileishmanial activity *in vitro* against *L. major* and *L. amazonensis* parasites *in vitro*. When applied topically, limonene, was effective against experimental CL due to *L. amazonensis* [28]. In the present work, after extraction and characterization of EssOils from the selected plants, the antileishmanial activity was assessed *in vitro* against two forms of *Leishmania major* parasite, *i.e.* the axenic amastigote and the intramacrophage forms. Additionally, the cytotoxic potential of EssOils was evaluated on macrophage cells. This study allowed to assess new potential antiparasitic molecules. To our knowledge, this is the first investigation of *Citrus*

limon and *Pistacia lentiscus* EssOils from different sampling sites for their antileishmanial potential *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and reagents used for this study were of analytical grade (98.0 – 99.9 %). Reagents were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France). Miltefosine (HePC) was kindly supplied by Zentaris (Frankfurt, Germany). Ultra-purified water from a Millipore Synergy 185 apparatus coupled to a RiOs5™ with resistivity of 18.2 MΩ.cm was used for the preparation of all solutions. Distilled water was used for the EssOils extraction by hydrodistillation.

2.2. Selection and collection of plant materials

Artemisia herba-alba, *Pistacia lentiscus*, and *Citrus limon* were collected in two different plant areas for each (see Tunisian map in Appendix A: supplementary material, Figure A.1). The harvesting period extended from September 2015 to February 2016. The various data (plant species, harvested part, sampling site, harvesting period, and voucher specimen) are gathered in Appendix A (Tables A.1 and A.2). The freshly cut plants were sorted out and dried at ambient temperature in a drying room with active ventilation. Then, they were packed in paper bags and stored at ambient temperature for 3 – 4 weeks before use. Plant samples were transferred to the Laboratory of Biotechnology Applied to Agriculture (INRAT, Tunisia), where voucher specimens were delivered for further references.

2.3. Essential oils extraction by hydrodistillation

Hydrodistillation is the most recommended technique for extracting volatile compounds from a plant [29]. For the extraction, 300 g of dried and crushed plant were brought into contact with 3 L of distilled water and brought to a boil during 2 to 3 h, according to the extraction process kinetic, using a modified Clevenger-type apparatus. For each plant material, the EssOil obtained was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in amber vials at 4 °C until further analysis. The extraction yields (EY) were calculated according to Equation 1:

$$EY (\%) = \frac{\text{weight of essential oil obtained}}{\text{weight of dried plant material}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

2.4. Antioxidant activity

The ability to generate free radicals could play a very important role in antileishmanial activity since free radicals are involved in the process of defense against parasites [30-32]. *Leishmania* is one of the rare protozoa capable of surviving in hostile environment created by the host [32] because it has an antioxidant defense system, which determines its pathogenicity, and serves as

protection against macrophage attack [31]. Then, a good antioxidant could be able to strengthen the radical response of macrophages by Reactive Oxygen Species (ROS) generation, and thus fight the proliferation of parasites [30].

Antioxidant activity of EssOils was thus assessed using two different tests: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (ABTS) assays. Both tests provide radical scavenging ability of the studied sample. However, the two reagents (DPPH and ABTS) react with different kinetics and thus provide different information. In fact, the antioxidant activity of a product is always assessed using several methods because of the complexity of its mechanisms of action [33].

2.4.1. DPPH assay

In this assay, the antioxidant activity was measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability, using the stable radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) according to the method described by Ghazouani et al. [34]. Briefly, 100 µL of each sample (essential oil or standard) was introduced into a glass tube containing 900 µL of freshly prepared methanolic DPPH solution (0.2 mM). Samples were tested at different concentrations in order to establish a calibration curve. Concentration range depends on the EssOil antioxidant capacity. For all EssOils, preliminary tests were firstly performed at 100 mg/L. The mixture was shaken using a vortex during nearly 30 s, until obtaining a solution with a homogenous color. After an incubation time of 25 min in dark at ambient temperature, the absorbance at 524 nm was measured using a UV/visible spectrophotometer (Helios, Unicam, Cambridge, UK).

2.4.2. ABTS assay

The radical scavenging capacity of antioxidant for the ABTS reagent (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) was determined following the procedure described by [35]. The ABTS^{•+} radical was generated by adding a 7 mM of ABTS solution at pH = 7.4 (5 mM NaH₂PO₄; 5 mM Na₂HPO₄, and 154 mM NaCl) to a potassium persulfate solution K₂S₂O₈ solution (2.45 mM), the pro-oxidant prepared in ultra-purified water. The mixture was incubated overnight at 4 °C, then diluted until reaching an absorbance at 734 nm ranging from 0.70 to 0.90. 900 µL of ABTS solution was added to 100 µL of 100 mg/L of EssOil. Solutions were mixed using a vortex and incubated for 6 min in the dark at ambient temperature. Measurements of absorbance were performed at 734 nm.

For DPPH and ABTS tests, the percentage of inhibition (PI) of a giving sample was calculated according to Equation 2:

$$PI (\%) = \frac{(Abs_{Control} - Abs_{Sample})}{Abs_{Control}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

where $Abs_{Control}$ is the absorbance of a blank experiment carried out applying the same procedure to a solution without the EssOil. Abs_{Sample} is the absorbance of the sample. Results were expressed in terms of IC_{50-AA} (mg/L) defined as the concentration of the EssOil able to scavenge

50 % of DPPH[•] or ABTS^{•+} radicals which is calculated from PI curve as a function of concentration. Ascorbic acid was used as a standard. Measurements for each sample were realized in triplicate.

2.5. Characterization of essential oils

2.5.1. Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry

The EssOil (10 µL) was dissolved in 1 mL of ethyl acetate (HPLC grade). The sample was injected into the GC (7890A) -MS (5975C inert MSD with Triple-Axis Detector) Agilent unit under the following conditions: capillary column HP-5MS ((5% phenyl) – methylpolysiloxane (60 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) interfaced with an Agilent mass selective detector 5975 C inert MSD. The carrier gas was N₂ at 1 mL/min. The injector temperature was maintained at 200 °C. Then, oven temperature program varied from 40 °C to 280 °C at 10 °C/min, with temperature stages at 120 °C, 280 °C, and 300 °C. The spectra were recorded in electronic impact mode (EI) with an ionization energy of 70 eV, injection volume of samples was 1 µL. Molecules identification was realized thanks to a mass spectra comparison with the standard spectra existing in National Institute of Standards and Technology 08 (NIST 08). Note that composition under 0.2 wt% were not considered during the molecules identification.

2.5.2. Total amount of phenolic compounds

The total amount of phenolic compounds was determined with colorimetry using Folin-Ciocalteu method described by Yahyaoui et al. [36]. This reagent consists on a mixture of phosphotungstic acid (H₃PW₁₂O₄₀) and phosphomolybdic acid (H₃PMo₁₂O₄₀) that is reduced in presence of phenols. This reaction leads to the formation of a mixture of oxides of tungsten and molybdenum colored in blue, that strongly absorbs at 765 nm.

Ethanol solutions of EssOils were prepared at concentrations ranging from 0 to 26 mg/L. Then, 100 µL of EssOil solutions were transferred into tube then mixed thoroughly with 500 µL of Folin reagent (Sigma Aldrich, France) previously diluted in ultra-purified water at 1:10 ratio. The mixture was shaken for 30 s using a vortex then incubated for 6 min in the dark. 400 µL of sodium carbonate (7.5 w/v %) was then added and mixed thoroughly for 30 s. The mixture was incubated in the dark for 15 min. The absorbance was then measured using UV/visible spectrophotometer (Helios, Unicam, Cambridge, U.K.) at 765 nm against a blank of distilled water [36].

For each sample, a control experiment was carried out applying the same procedure to a solution without the EssOil. In this assay, gallic acid, which is a phenolic acid characterized by a carboxylic function and phenolic hydroxyls, was used as a standard. A calibration curve is then obtained for gallic acid aqueous solutions at concentrations ranging from 0 to 30 mg/L. Results were expressed in terms of milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry mass sample (mg GAE/g). All measurements were realized in triplicate.

2.6. Antileishmanial activity

2.6.1. Parasite cultures

Leishmania major (MHOM/PT/92/CRE26) promastigote forms were maintained in culture M-199 medium (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 40 mM HEPES, 100 μ M adenosine, 0.5 mg/L hemin, 10 % fetal bovine serum, and 50 μ g/mL gentamycin at 26 °C in a dark environment, under an atmosphere of 5 % CO₂. Differentiation of promastigotes into axenic amastigotes was achieved by dilution, one day before the treatment, of 1×10^6 promastigotes in stationary phase of growth in 5 mL of axenic amastigote medium at pH 5.5 (15 mM KCl, 8 mM glucose, 5 mM glutamine, $1 \times$ M199, 2.5 BBL™ trypticase™ peptone, 4 mM hemin, 10 % fetal bovine serum, 2 mM CaCl₂, and 2 mM MgCl₂). Axenic amastigotes were grown under 37 °C and 5 % CO₂.

2.6.2. In vitro antileishmanial activity on axenic amastigote forms

L. major axenic amastigote forms were suspended to yield 1×10^6 cells/mL and the assays were performed in 96-well microtiter plates under a volume of 100 μ L per well. EssOils, priorly diluted in ethanol, were added at concentrations ranging from 100 to 10^{-4} μ g/mL obtained by serial dilution. Miltefosine (HePC) was used as a reference compound with final concentrations ranging from 100 μ M to 97.6 nM obtained by serial dilution. Triplicates were performed for each concentration. Cultures were incubated at 37 °C in the dark under 5 % CO₂ atmosphere. Then, plates were subjected to 3 freeze/thaw cycles. Amastigotes viability was assessed using the SYBR® green I incorporation method. This method consists in evaluating the parasite growth using SYBR® Green I which is a dye with marked fluorescence enhancement upon contact with parasite DNA. The parasite lysis suspension was diluted at 1:1 in lysis buffer (10 mM NaCl, 1 mM Tris HCl pH 8, 2.5 mM EDTA pH 8, 0.05 % SDS, 0.01 mg/mL proteinase K, and 10 X SYBR Green I) in qPCR plates. Fluorescence was measured with Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, France) according to the following program to increase the SYBR Green incorporation: 90 °C for 1 min, decrease in temperature from 90 °C to 10 °C during 5 min with fluorescence reading. This experiment was processed in triplicate. Antileishmanial activity against amastigote axenic form was expressed as 50 % inhibitory concentration of growth (IC₅₀) calculated using ICEstimator® [37].

2.6.3. In vitro antileishmanial activity on intramacrophage amastigote forms and cytotoxicity evaluation

The mouse monocyte/macrophage cell line Raw264.7 was maintained in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Applied Biosystems) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum. Raw264.7 cells were seeded into a 96-well microtiter plate at a density of 20 000 cells/well in 100 μ L of DMEM. After incubation in a 5 % CO₂ incubator at 37 °C for 2 hrs, the culture medium was replaced by 100 μ L of fresh DMEM, supplemented with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂, containing a suspension of 3.2×10^6 promastigotes in stationary phase

of growth, corresponding to 16 parasite-to-cell ratio. After 12 h incubation, the macrophage infection was checked using an inverted microscope (DMIL Led, Leica Microsystems®). Culture medium was replaced by fresh DMEM, then, EssOils dilution in DMEM was processed in the same way as for the axenic test (see section 2.6.2). Miltefosine, the positive control, was also diluted to reach concentrations ranging from 100 µM to 97.6 nM. Samples were then transferred in plates containing infected macrophages. Both infected and non-infected macrophages without any drug were used as negative controls. Plates were left 72 h at 37 °C in 5 % CO₂. On the other hand, EssOils cytotoxicity was evaluated in parallel using the same procedure in the absence of parasites during an incubation time of 48 hrs. After incubation, the cells were visualized using an inverted microscope to check their morphology or the presence of non-internalized free parasites. The medium was subsequently removed and replaced with the lysis buffer. Plates were subjected to 3 freeze/thaw cycles and parasites growth or cells viability were determined using SYBR® Green I incorporation following the previous protocol (see section 2.6.2) in comparison with the macrophage alone or with infected macrophages but without treatment.

Experiments were carried out three times at least. Antileishmanial activity and cytotoxicity were expressed as 50 % inhibitory concentration (IC₅₀ and CC₅₀, respectively) and calculated using ICEstimator® as previously. Moreover, selectivity index (SI) was calculated according to Equation 3 in order to assess the selectivity action of a treatment towards parasites.

$$SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}} \quad \text{Eq. 3}$$

2.7. Statistical analysis

Antioxidant activity, antileishmanial activity, cytotoxicity, and the total phenolic compounds amount were expressed as mean ± standard deviation (SD). All measurements were analyzed using one-way-Anova (analysis of variance). Duncan test was then applied to the means to identify significant differences at a percent level of 0.05. These statistical analyzes were performed with the IBM SPSS Statistics 21.0 software®.

3. Results and discussion

3.1. Extraction yields

Extraction yields of all EssOils are shown in Table 1.

The highest yield was obtained for *Artemisia* species with a mean value of 1.2 wt %. This extraction yield is significantly lower than the ones generally reported in literature ranging from 3 to 10 % [14]. This difference could be due to the selected part of the plant from which EssOils were extracted. Indeed, EssOil is mainly present in the plant leaves [38,39]. However, in our work, EssOil was extracted from the whole aerial part of *Artemisia*. Similar results (~ 1%) were

obtained for extraction yield observed for EssOil from Algerian *Artemisia* aerial part (leaves and stem) that was around 1 % [40].

Table 1: EssOils extraction yields.

Plant	Harvest area	Extraction yield (wt%)
<i>Artemisia herba-alba</i>	Area 1	1.15 ± 0.04 ^a
	Area 2	1.31 ± 0.27 ^a
<i>Citrus limon</i>	Area 1	0.48 ± 0.09 ^a
	Area 2	0.25 ± 0.06 ^b
<i>Pistacia lentiscus</i>	Area 1	0.06 ± 0.01 ^c
	Area 2	0.06 ± 0.05 ^c

One-way-Anova with Duncan post-test. Means values followed by different letters (a to c) within column for a given plant are significantly different ($p < 0.05$).

Pistacia l. exhibited the lowest extraction yield. It is worth noting that for *Pistacia* EssOils extracted from leaves, the yield was not largely reported in literature. Study of Zaouali et al. showed that yield extraction in oil from Tunisian *Pistacia* leaves was around 0.15 %, which is 10-fold higher than our results [41]. This may be due to difference between harvest period. Indeed, seasonal variation is usually associated with the variation of yield in oil because of the variation of a set of bioclimatic and environmental factors such as air temperature, wind exposure, air humidity, water precipitation, sunlight, and UV radiation intensity, etc. From one year to another, environmental changes submit plants to modifications in morphology, physiology, and productivity that aims to prevent damage and adapt to stress conditions [21].

Despite the differences in geographic, climatic, and ecological parameters, our results showed that yields did not vary significantly ($p > 0.05$) from a harvesting region to another, except for *Citrus l.* plant for which yield was about 2-fold higher in the area 1 in comparison with area 2. To our knowledge, extraction yield of *Citrus l.* EssOil from leaves has never been reported in previous works. Extraction yield strongly depends on selected part of the plant. It showed significantly lower yields for *Citrus l.* flower (0.05 – 0.5 %), whereas, *Citrus l.* peels showed 10-fold greater yields around 2.5 % [42]. Nevertheless, this work dealt with leaves EssOil for a matter of originality.

3.2. Chemical composition

The knowledge of the chemical composition of plant extracts is sought, not only for discovering new therapeutic substances but also for understanding the value of folkloric remedies. Prior to biological activities assessment, EssOils were subjected to GC-MS analysis in order to determine their compositions.

Chemical compositions of *Artemisia* EssOils from area 1 and area 2 showed respectively eighteen and seven identified components that represent around 98 % of the total EssOils composition (Table 2). The EssOil from area 1 was characterized by high camphor content (32.26 %), followed by 1.6-dimethylhepta-1.3.5-triene (16 %), and α -thujone (13.97 %). For area 2, the EssOil major compound was α -thuyone (67.56 %). Both EssOils were characterized by abundance of oxygenated monoterpenes that represented between 71 and 92 % of their compositions.

Table 2: Composition of *Artemisia herba-alba* EssOils extracted from areas 1 and 2 analyzed by GC- MS.

Compounds	Rt (min)	Relative composition (%)	
		Area 1	Area 2
α -pinene	5.07	1.92	-
camphene	5.30	3.62	-
β -phellandrene	5.62	0.59	4.43
o-cymene	6.35	0.88	-
eucalyptol	6.47	8.59	4.43
α -thuyone	7.80	13.97	67.56
<i>trans</i> -p-menth-2-en-1-ol	7.87	0.76	-
1.6-dimethylhepta-1.3.5-triene	7.95	16.00	1.62
isopinocarveol	8.23	1.78	2.43
(-)-camphor	8.35	32.26	3.86
isocyclocitral	8.59	1.61	-
α -pinocarvone	8.69	2.69	-
borneol	8.74	4.24	-
(-)-terpinen-4-ol	8.96	1.24	-
cis-verbenone	9.73	0.57	-
verbanyl acetate	11.03	2.06	-
bornyl acetate	11.88	0.93	-
β -thujene	12.03	-	13.86
3.5-heptadienal	14.92	4.55	-
Total (%)		98.28	98.19
<i>Non oxygenated monoterpenes (%)</i>		7.01	4.43
<i>Oxygenated monoterpenes (%)</i>		70.71	92.14
<i>Others</i>		20.55	1.62

Rt: retention time; (-): < 0.2%. In bold: major compound (chemotype)

In terms of chemotypes, two types of *Artemisia* EssOils were previously described: the one whose composition was dominated by only one compound and the one characterized with the coexistence of two or three major compounds [13].

Generally, *Artemisia* EssOils harvested in Tunisia were found to be abundant in one of the following compounds: α -thujone, β -thuyone, 1,8-cineole, camphor, chrysanthenone or *Trans*-sabinyl acetate or by occurrence, at appreciable content, in two or more of these compounds [13]. Consequently, it is important to notice that the chemotype of *Artemisia* EssOil from area 1 is described for the first time in our study. In fact, 1,6-dimethylhepta-1,3,5-triene has never been described as a major compound in an *Artemisia* EssOil but only as a trace (~ 0.05 %) [43,44]

Chemical composition of EssOils extracted from *Citrus l.* leaves is given in Table 3. Seventeen components were identified representing 98.7 % of the total composition of EssOils from area 1 and from area 2. EssOil prepared from *Citrus* of area 1 was characterized by a high content of neryl-acetate (29.50 %), followed by nerol (13.83 %), D-limonene (12.93 %), geranial (7.82 %), geranyl acetate (6.60 %), and neral (5.82 %). In contrast, EssOil extracted from *Citrus l.* of area 2 presented D-limonene chemotype with a content of 29.98 %. Moreover, other compounds were present in high percentage as neryl acetate (16.69 %) followed by β -pinene (12.83 %), nerol (6.55 %), and geranyl acetate (6.51 %). Composition difference between these EssOils could be more clearly illustrated by the classification of terpenes family. Indeed, for *Citrus* EssOil from area 1, composition was mainly dominated by oxygenated monoterpenes (~ 76 %). However, *Citrus* EssOil from area 1 composition demonstrated that it contains similar amount of non-oxygenated (47.47 %) and oxygenated monoterpenes (48.24 %). For both *Citrus* EssOils, sesquiterpenes (oxygenated or not) were present at low content (< 4 %).

In the literature, only a small number of studies dealt with the composition of *Citrus Limon* EssOil extracted from leaves. Results of *Citrus* EssOil composition from area 2 are in accordance with the composition reported by Lota et al., characterized by limonene as major component, followed by β -pinene and other components such as geranial or neral at appreciable levels [45]. However, according to Vekiari et al., citral compounds (geranial and neral) are the predominant constituents of this EssOil followed by limonene, neryl acetate, geranyl acetate, and β and α -pinene [46]. Besides, Njoroge et al. reported that Japanese *Citrus* EssOil extracted from leaves was mainly constituted of geranial followed by limonene and neral [47]. Generally, neral, geranial, geranyl acetate, and neryl acetate are characteristic of *Citrus* EssOil extracted from leaves and are in significantly lower quantities in EssOil extracted from the fruit peels [45,46]. These components contribute significantly to the flavor and aroma of lemon. Their concentration is by far the most important index to determine the commercial value of lemon oil [45,46].

Table 3: Composition of *Citrus limon* EssOils extracted from areas 1 and 2 determined by GC-MS.

Compounds	Rt (min)	Relative composition (%)	
		Area 1	Area 2
α -pinene	5.07	-	0.84
β -thujene	5.61	-	2.64
β -pinene	5.69	3.17	12.83
β -myrcene	5.81	-	1.19
D-limonene	6.41	12.93	29.98
linalool	7.42	2.07	2.57
citronellal	8.36	3.44	3.75
(-)-terpinen-4-ol	8.96	1.72	1.11
α -terpineol	9.23	1.76	1.07
nerol	10.05	13.83	6.55
neral	10.41	5.82	3.41
geraniol	10.73	3.48	2.49
geranial	11.26	7.82	4.10
neryl acetate	14.07	29.50	16.69
geranyl acetate	14.54	6.60	6.51
caryophyllene	15.52	2.74	2.14
α -bergamotene	15.78	0.47	-
β -bisabolene	17.13	0.78	-
(-)-spathulenol	18.34	0.66	0.88
methyl arachidonate	18.45	1.95	-
Total (%)		98.75	98.74
<i>Non oxygenated monoterpenes (%)</i>		16.10	47.47
<i>Oxygenated monoterpenes (%)</i>		76.05	48.24
<i>Non oxygenated sesquiterpenes (%)</i>		3.99	2.14
<i>Oxygenated sesquiterpenes (%)</i>		0.66	0.88
<i>Oxygenated diterpenes (%)</i>		1.95	-

Rt: retention time; (-): < 0.2%. In bold: major compound (chemotype)

High content in these components in *Citrus* EssOil from area 1 indicates that this EssOil is of high quality and is linked to its powerful and characteristic lemon aroma.

Finally, the compositions of EssOils extracted from *Pistacia lentiscus* leaves from area 1 and 2 are presented in Table 4. Thirty-one and twenty-two components were identified representing 97.73 % to 97.10 % of EssOils composition of area 1 and area 2, respectively. *Pistacia* EssOil from area 1 was characterized by a high content of α -pinene (16.86 %), followed by β -myrcene (11.27 %), D-limonene (4.93 %), o-cymene (4.54 %), terpinen-4-ol (4.42 %), β -pinene (3.23 %), and α -phellandrene (2.36 %). However, EssOil from area 2 exhibited a chemotype of β -myrcene (~ 30 %). Other components were also present in appreciable quantities such as α -pinene (13.55 %), β -pinene (6.17 %), and D-limonene (5.37 %). However, these two EssOils had more similar composition in terms of terpene classes. Indeed, for both *Pistacia* leaves EssOils, non-oxygenated monoterpenes were the most abundant with a content between 48 and 62 %, followed by the non-oxygenated sesquiterpenes that did not exceed 25.5 %. Nevertheless, *Pistacia* EssOil from area 1 was slightly more abundant in oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes.

In the literature, there are insufficient data on EssOils composition of *Pistacia* genus. Only few species have so far been studied. EssOil extracted from leaves has been described in several studies to be rich in α -pinene, among other common constituents including β -myrcene, β -pinene, carvacrol, limonene, β -caryophyllene, verbenone, α -terpineol, and linalool [18]. Regarding *Pistacia l.* from Tunisian flora, several previous studies described the EssOil composition extracted from leaves harvested from the same collection sites as ours. Regarding *Pistacia* from area 1, authors reported an EssOil composition considerably different from our results, rich in terpinen-4-ol, β -caryophyllene, and α -terpineol [48].

Table 4: Composition of *Pistacia lentiscus* EssOils extracted from areas 1 and 2 determined by GC-MS.

Compounds	Rt (min)	Relative composition (%)	
		Area 1	Area 2
sabinene	4.95	-	1.54
α -phellandrene	4.96	3.17	-
α -pinene	5.07	16.86	13.55
camphene	5.29	2.03	2.34
β -phellandrene	5.62	2.36	-
β -pinene	5.69	3.23	6.17
β -myrcene	5.81	11.27	29.99
O-cymene	6.35	4.54	3.08
D-limonene	6.42	4.93	5.37
isopentyl alcohol	6.74	1.11	0.93

β -nonanone	7.30	0.78	-
nitrofurazone	7.32	-	0.65
2-ethylbutyl alcohol	7.41	0.63	-
isopentyl isovalerate	7.49	1.64	1.45
terpinen-4-ol	8.96	4.42	1.26
α -terpineol	9.22	1.58	1.07
α -thujenal	9.42	-	-
bornyl acetate	11.87	2.00	2.10
2-undecanone	11.99	1.55	-
copaene	14.51	1.37	-
β -elmene	14.86	-	1.21
caryophyllene	15.52	3.29	5.60
α -caryophyllene	16.21	1.46	1.63
spatulenol	16.35	0.93	-
γ -cadinene	16.61	3.26	2.57
germacrene D	16.73	-	5.70
β -cubebene	16.72	1.14	-
α -elemene	16.96	1.02	-
α -amorphene	17.29	3.97	1.77
cadina-1(2),4-diene	17.43	2.96	-
α -calacorene	17.77	0.66	-
(-)-spathulenol	18.34	0.63	1.59
caryophyllene oxide	18.44	5.14	-
γ -cadinene	19.24	-	5.32
τ -muurolol	19.24	4.33	-
α -cadinol	19.42	4.42	2.20
α -bisabolol	19.76	1.05	-
Total (%)		97.73	97.10
<i>Non oxygenated monoterpenes (%)</i>		<i>48.39</i>	<i>62.03</i>
<i>Oxygenated monoterpenes (%)</i>		<i>8.01</i>	<i>4.44</i>
<i>Non oxygenated sesquiterpenes (%)</i>		<i>19.75</i>	<i>25.41</i>
<i>Oxygenated sesquiterpenes (%)</i>		<i>15.87</i>	<i>2.20</i>

Rt: retention time; (-): < 0.2%. In bold: major compound (chemotype)

Aissi et al. found that α -pinene was the most abundant compound of *Pistacia* EssOil from area 2 followed by limonene, terpinen-4-ol, β -caryophyllene, germacrene, and γ -cardinene [21]. These results are not in accordance with ours. This difference could be due to many reasons such as differences in procedures applied: drying conditions of the plant material, extraction duration, EssOil storage conditions, etc. Furthermore, significant differences in composition could be noticed for EssOils harvested from different sampling areas. It seemed that environmental conditions such as geography, altitude, temperature, day length, and nutrients may play a key role in the synthesis of bioactive molecules. The chemotype is also influenced by the plant genetic characteristics. These parameters have an impact on the biosynthesis pathways and then on the main characteristic molecules and their percentage [21,49,50]. It is worth noticing that the odor of the two samples of EssOils from area 1 and area 2 was different which reflected a difference in composition of volatile molecules.

3.3. Phenolic compounds and antioxidant activity of essential oils

Total phenolic compounds determined for all extracted EssOils are listed in Table 5. Results showed that phenolic compounds did not exceed 5 equivalents of Gallic Acid per gram of dried extract for all EssOils.

Table 5: Total phenolic compounds (TFC) of different EssOils.

	<i>Artemisia herba-alba</i>		<i>Citrus limon</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>	
	Area 1	Area 2	Area 1	Area 2	Area 1	Area 2
TFC (EGA/g)	0.41 ± 0.15	0.21 ± 0.01	3.90 ± 0.42	0.21 ± 0.2	0.48 ± 0.14	2.99 ± 0.28

TFC: total phenolic compounds, expressed in (EGA/g) equivalent of Gallic Acid per gram of dried extract.

Regarding the antioxidant activity, the inhibition concentration at 50 %, IC_{50-AA}, (expressed in mg/L) for all EssOils samples and assessed by DPPH and ABTS tests are shown in Table 6. The reference antioxidant was ascorbic acid (Vitamin C).

Table 6: Antioxidant activity of different EssOils determined by DPPH and ABTS tests.

IC _{50-AA} (mg/L)	Reference Vitamin C	<i>Artemisia herba-alba</i>		<i>Citrus limon</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>	
		Area 1	Area 2	Area 1	Area 2	Area 1	Area 2
DPPH	3.1 ± 0.2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
ABTS	2.1 ± 0.2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

IC_{50-AA}: inhibition concentration at 50 %

Compared to ascorbic acid, no significant activity was found for all EssOils of the three plant

species. This may be due to the dominance of non-phenolic compounds in these EssOils (Tables 2, 3, and 4). This was confirmed by Folin-Ciocalteu test that showed that all EssOils did not contain significant amount of polyphenols (Table 5).

In previous studies, EssOils extracted from *Artemisia herba-alba* collected at the flowering stage in southern Tunisia exhibited weak antioxidant activity related to a dominance of non-phenolic compounds in the tested samples [13]. However, Kadri et al. showed that essential oil of *Artemisia herba-alba* collected from a local area in Southwest Tunisia exhibited a good antioxidant activity attributed to the presence of oxygenated monoterpenes in high amount [51]. This is not in agreement with our results since the abundance in oxygenated monoterpenes (up to 70 %) (Table 2) did not confer any antioxidant capacity to our *Artemisia* EssOils. The comparison of EssOils compositions demonstrated a difference in major compounds. Indeed, additionally to α -thujone (24.88 %) and camphor (10.81 %), authors reported the presence of 1,8-cineole (8.91%) [51]. The high antioxidant power of this compound has been already proved since it is responsible of several EssOils antioxidant capacity such as *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* and *Maleuleca alternifolia* [52; 53]. Besides, difference in concentration, solubility, accessibility of the active groups to the oxidant, and stability of the molecule could also influence the antioxidant properties of the natural plant extract [54]. The difference of antioxidant activity, attributed to a variability in the chemical composition of these EssOils, may be directly related to the geographical location and ecological conditions of these plants [55].

It was well described that phenolic compounds and terpenes with conjugated double bonds are responsible of substantial antioxidant activity [56]. As shown in the previous section, chemical compositions of extracted EssOils (Tables 3, 4, and 5) are abundant in non-oxygenated monoterpenes such as α -pinene, β -myrcene or limonene. These monoterpenes hydrocarbons have no antioxidant effect [57]. On the other hand, we found that oxygenated monoterpenes were present in appreciable amount in *Artemisia* EssOils such as camphor and α -thujone. These cyclic ketones are not supposed to exhibit any radical scavenging capacity because of the absence of a phenolic ring containing an electron repelling group [57]. As demonstrated by Farag et al., this structural feature is highly required for radical scavenging effect of monoterpenes [57]. To our knowledge, no previous study was interested by the antioxidant capacity of α -thujone. However, camphor did not present any antioxidant potential [58].

Although, in literature, data indicates that the presence of hydroxyl group could play a role in radical scavenging activity of an EssOil [57], geranyl acetate, present in *Citrus* EssOil, did not exhibit any antioxidant activity [59]. Other compounds in *Citrus* EssOil could present an important antioxidant activity thanks to the phenolic structure such as for nerol and geraniol. These phenolic compounds have redox properties and could play an important role in neutralizing free radicals [56]. However, it seems that they were not present in sufficient amount

in our samples to exert a significant antioxidant activity.

3.4. Antileishmanial activity in axenic amastigotes and intramacrophage amastigotes, and cytotoxicity

All EssOils were tested for their antileishmanial activity against *L. major* parasite (axenic amastigotes form and intramacrophage amastigotes). A sample was considered highly effective against the parasite when IC₅₀ value was lower than 10 µg/mL, and moderately effective when IC₅₀ was between 10 and 20 µg/mL. A sample with IC₅₀ value higher than 20 µg/mL was not considered as promising. The cytotoxicity of all EssOils was also evaluated by calculating the selectivity index (SI). An EssOil was considered as selective to parasite and safe to macrophage when its SI value was higher than 10 [60].

Results presented in Table 7 showed that IC₅₀ obtained for both axenic and intramacrophage amastigote forms were significantly different ($p < 0.05$) depending on the harvesting region. This could be attributed to the difference of EssOils composition induced by the different environmental and climatic conditions that the plant underwent (previously described in section 3.2).

The best growth inhibitory effect on axenic amastigotes form of the parasite was observed for *Artemisia* EssOil from area 1, *Citrus* EssOil from area 1, and *Pistacia* EssOil from area 1. The antileishmanial activities of these EssOils were comparable ($p > 0.05$) to the activity of miltefosine, the reference drug.

Table 7: Antileishmanial activity and cytotoxicity of studied EssOils and miltefosine (HePC) as a reference compound.

Plant/harvest area		IC ₅₀ Axenic amastigotes (µg/mL)	IC ₅₀ Intramacrophage amastigotes (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	Selectivity index (SI)
<i>Artemisia</i>	Area 1	6.2 ± 0.6 ^{a,A}	2.8 ± 0.4 ^{a,B}	44.6 ± 1.3 ^{a,C}	16
<i>herba-alba</i>	Area 2	> 100 ^{d,A}	45.2 ± 3.5 ^{d,B}	64.1 ± 1.5 ^{b,C}	1.4
<i>Citrus</i>	Area 1	12.1 ± 1.8 ^{a,A}	4.2 ± 1.3 ^{ab,A}	49.6 ± 7.2 ^{a,B}	11.7
<i>limon</i>	Area 2	24.0 ± 3.6 ^{b,A}	13.8 ± 0.7 ^{b,B}	48.2 ± 4.2 ^{a,C}	3.5
<i>Pistacia</i>	Area 1	0.5 ± 0.2 ^{a,A}	12.5 ± 1.4 ^{b,B}	68.5 ± 4.2 ^{b,C}	3
<i>lentiscus</i>	Area 2	56.1 ± 20.5 ^{c,A}	35.6 ± 0.7 ^{c,A}	> 100 ^{c,B}	> 1
<i>HePC*</i>		2.7 ± 0.4 ^{a,A}	2.0 ± 0.6 ^{a,A}	62.1 ± 4.4 ^{b,B}	31.4

a–c: Means within a column with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

A–C: Means within a line with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

HePC: Hexadecylphosphocholine (miltefosine), the positive control.

* IC₅₀ and CC₅₀ of HePC are expressed in µM.

However, *Artemisia* EssOil from area 2, *Citrus* EssOil from area 2, and *Pistacia* EssOil from area 2 did not show any interesting inhibitory activity against axenic amastigote form of *L. major* as their IC₅₀ values were higher than 20 µg/mL. Concerning the activity against intramacrophage amastigote form, *Artemisia* EssOil from area 1 and *Citrus* EssOil from area 1 exhibited the best inhibitory effect with IC₅₀ < 10 µg/mL.

Their activities were close to IC₅₀ obtained with miltefosine ($p > 0.05$). However, EssOils of *Citrus* area 2 and of *Pistacia* area 1 presented a moderate activity with IC₅₀ values ranging between 11 and 15 µg/mL. Moreover, as for the axenic amastigotes form, no significant activity ($p > 0.05$) was noticed for EssOils of *Artemisia* from area 2 and *Pistacia* from area 2 against the intracellular amastigotes form.

According to these results, antileishmanial activity varied significantly from the axenic to intramacrophage amastigotes forms. Indeed, for *Artemisia* EssOil from area 1, we noticed that IC₅₀ significantly decreased ($p < 0.05$) from 6.2 ± 0.6 to 2.8 ± 0.4 µg/mL, respectively from axenic to intramacrophage amastigotes form. Similarly, *Citrus* EssOil from area 2 was more active against the intracellular form since the IC₅₀ value was 2-fold lower than that for the axenic form. Consequently, the antileishmanial potential may be dependent on the proper cell functions of macrophages. In this context, De Muylder et al. tested the antileishmanial activity of naloxonazine [61]. This compound exhibited no activity against axenic amastigote form but showed a good effect against intracellular amastigotes. Naloxonazine is a selective μ_1 -opioid receptor antagonist. Opioid receptors are expressed on immune system cells and are involved in modulation system of the host resistance to infectious diseases. Therefore, naloxonazine has an indirect action on pathogens *via* macrophage activation. Currently, this kind of compounds is of a particular interest for targeting host factors that are essential for parasite development. This emerging strategy is assumed to be less prone to induce drug resistant pathogens. It also offers the possibility to repurpose drugs by exploiting compounds currently used for diseases unrelated to microbial infections [61].

On the other hand, IC₅₀ values could also increase from the free-living amastigote to intracellular amastigote. This case was observed for *Pistacia* EssOil from area 1 that exhibited a high inhibitory effect on the axenic form and a moderate inhibitory effect against intramacrophage form. This could be explained by the localization of the parasite inside the parasitophorous vacuole that constitutes a serious hurdle for small molecules, like terpenes in our case. Indeed, active molecules need to cross three biological barriers and resist to both neutral and acidic pH [62]. It is important to point out that in literature, requirements of specific compounds to display activities against intracellular forms are higher [63]. Nevertheless, compounds that exert an effect only against the free amastigote form may be of interest since further chemical optimization may allow these small molecules to reach the vacuole and exhibit

their antiparasitic effect. Other alternative delivery strategy, like encapsulation and targeting, could also be promising for such compounds [63].

It is relevant to consider treatment toxicity on macrophage cells. SI values showed that EssOils of *Artemisia* area 1 and of *Citrus* from area 1 exhibited a selective antiparasitic effect with SI values higher than 10, the first being more selective (SI = 16). Thus, these EssOils are considered to be safe for macrophages. However, despite the good antiparasitic effect of *Citrus* EssOil from area 2 and *Pistacia* EssOil from area 1, high cytotoxicity was observed with low selectivity values of 3.5 and 3, respectively. This study demonstrated the potential of EssOils of *Artemisia* from area 1 and *Citrus* from area 1 as promising sources for active molecules against *Leishmania major* parasite.

To have a general overlook at antileishmanial activity and cytotoxicity of the studied EssOils and to analyze the observed effects, we gathered in Table 8 literature data of EssOils extracted from these plants and their major compounds. According to this literature, EssOils extracted from *Artemisia herba-alba* were widely studied previously for their antileishmanial potential. Activity against different *leishmania* species was significantly high with IC₅₀ values ranging from 1 to 4 µg/mL [64,65]. Results of *Artemisia* EssOils activity from Tunisia against *L. major* promastigotes [64] were in the same range than what we found for *Artemisia* EssOil from area 1 against *L. major* axenic and intracellular amastigotes. This comparison is legitimate because amastigote form of the parasite has the same sensitivity than promastigotes [61]. Therefore, we noticed no toxicity against the host cell. Camphor, one of the major compounds of this EssOil, did not show any inhibitory effect against *L. donovani* promastigotes (IC₅₀ > 40µM) [65]. To our knowledge, no previous study dealing with the antiparasitic potential of other *Artemisia* EssOils major compounds was established. Then, further investigations are needed to identify compounds responsible of the observed activity.

Citrus Limon EssOil was analyzed in our study for the first time for its antileishmanial potential. As seen above, the EssOil from *Citrus limon* leaves exhibited good growth inhibitory effect against especially intracellular *L. major* regardless the harvesting region. Unfortunately, the activity of EssOil of area 2 was cytotoxic and not selective to parasites as SI value was by far less than 10. In literature, it has been shown that *Citrus limon* EssOil were cytotoxic on LIM1863 colon carcinoma cell line with low CC₅₀ values ranging from 5.75 to 7.92 µg/mL [66]. Besides, *Citrus* EssOil from area 1 was characterized by a remarkable intracellular activity and a good selectivity action on *L. major*. The difference between *Citrus* EssOils from both areas is obviously due to the difference in composition of these EssOils obtained from different sites. Comparing to area 2, *Citrus* EssOil from area 1 was characterized by higher content on neryl-acetate (29.50 %), nerol (13.83 %), and citral compounds (total of 14.42 %). Among these compounds, only citral compounds, including geranial and neral, were widely studied for their antileishmanial activity. However, tests were basically performed on the promastigote

stage of different *Leishmania* species. Citral did not reveal a significant growth inhibitory effect against *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* promastigotes, and *L. amazonensis* amastigotes [67,68]. However, it exhibited good inhibitory effect on *L. amazonensis* and *L. donovani* promastigotes [65,68]. Ultrastructure characterization performed with Transmission Electron Microscopy revealed that protozoa (of *L. amazonensis*) treated with citral compounds showed drastic alteration in their morphology, such as the presence of exocytic projections in the flagellar pocket, and swollen mitochondria, with plasma membrane blebs seeming to detach from the parasite surface [68]. These findings could indicate a specific activity of citral compounds related to the *Leishmania* live-stage and species. Hence, citral might contribute to the good inhibitory effect of *Citrus* EssOil from area 1 in our study. Note that citral compounds were present in *Citrus* EssOil from area 2 as well but not in appreciable amount. On the other hand, citral did not exhibit a cytotoxic effect on the parasite host cell (Raw264.7) [67], but revealed a toxic action on J774 G8 and kidney epithelial cells [65,68] So, the cytotoxic effect of the extracted EssOil should further be investigated in different cell lines to confirm its safety.

Moreover, Arruda et al. showed that limonene exhibited significant activity against *L. major* amastigote intramacrophage form and *L. amazonensis*-infected macrophages (with 78 % reduction in infection rates) [28]. Antileishmanial efficacy was also assessed in cutaneous leishmaniasis experimental model in BALB/c infected mice. Treated topically or intrarectally with limonene, mice exhibited significant reduction in lesion area and significant decrease in parasite load. Moreover, limonene was able to enhance the percutaneous permeation of drugs [28]. These findings could explain the moderate activity against intracellular *L. major* observed for *Citrus* EssOil from area 2 whose major compound was limonene.

Regarding *Pistacia lentiscus* EssOils, a previous study confirmed the interesting activity of this EssOil from Tunisian flora with IC₅₀ ranged between 4 and 7.5 µg/mL [20]. More recently, a study proved that EssOil extracted from *Pistacia* leaves with myrcene and α-pinene as major compounds displayed an important activity against *Leishmania* species, especially *L. major* [19]. α-pinene, the major compound of the active *Pistacia* EssOil (16.86 %), also exhibited a moderate antileishmanial activity against two species of promastigote, *L. infantum* and *L. major*, with IC₅₀ values of 17.60 ± 0.88 µM [64] and 19.80 ± 0.23 µM [69], respectively. However, activity was not noticed for other compounds present in appreciable amount in *Pistacia* EssOil from area 1, such as β-myrcene, o-cymene, terpinen-4-ol and phellandrene [64,67,69-71]. Interesting activity observed for *Pistacia* EssOil of area 1 could then be attributed to a synergistic effect between different terpenes. In addition, these compounds presented a considerable toxicity for several cell lines such as Vero and Raw80 [64,70]. This could explain the cytotoxicity observed for *Pistacia* EssOils in our study.

The mechanism by which EssOils exert inhibition on parasite growth is still obscure because of specific cellular targets have not been identified yet. However, previous studies have suggested that the antileishmanial activity is related to cell membrane disruption by virtue of essential oils composition in terpenes that contribute to their lipophilic characteristics. Indeed, these terpenes properties allow their diffusion through the parasite cell membrane, which might affect intracellular metabolic pathways and organelles [72,73]. Moreover, other studies indicated that EssOils activity could also be linked to the capacity of EssOil to interact with mitochondrial membranes by generating free radicals that oxidize parasite macromolecules leading ultimately to its death by apoptosis or necrosis [73,74]. It is important to point out that the latter hypothesis would not correspond to the mechanism of action of EssOils studied here. Indeed, we proved in this work, through antioxidant activity assessment and polyphenols quantification, that none of the three EssOils showed an ability to generate free radicals entities. Thus, the interesting antileishmanial activity of the studied EssOils could probably be attributed to the lipophilic properties of terpenes.

Table 8: Profile of *in vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of EssOils and their major compounds from *Artemisia herba-alba*, *Citrus limon*, and *Pistacia lentiscus* in literature.

Plant	Whole plant EssOil / Major compounds	Antileishmanial activity		Cytotoxicity		Ref.	
		<i>L. species/form</i>	IC ₅₀ (µg/mL or µM) *	Cell line/animal	CC ₅₀ /LD ₅₀		
<i>Artemisia herba-alba</i>	Whole EssOil	<i>L. major/prom</i>	2	nd	nd	[16]	
		<i>L. tropica/prom</i>	4				
		<i>L. infantum/prom</i>	68	Balb/c peritoneal macrophages	160 µg/mL	[75]	
		<i>L. major/prom</i>	2.78 ± 0.19	Raw264.7	8.80 ± 0.50 µg/mL	[64]	
		<i>L. infantum/prom</i>	1.22 ± 0.20				
	Camphor	<i>L. donovani/prom</i>	> 40	Kidney epithelial cell	No toxicity	[65]	
α - thujone	nd	nd	Mice	45 mg/kg	[76]		
Whole EssOil	nd	nd	LIM1863	5.75 - 7.92 µg/mL	[66]		
<i>Citrus limon</i>	Limonene	<i>L. major/ama</i>	354 ± 33	LLCMK2			
		<i>L. amazonensis/ama</i>	< 300		> 1012 µM		
		<i>L. chagasi/prom</i>	185 ± 19	HEK-293		[28]	
	β-pinene	<i>L. braziliensis/prom</i>	201 ± 17				
		<i>L. major/prom</i>	200.1	HL-60	29.6 µg/mL	[69]	
	Citral: Neral/Geraniol	<i>L. donovani/prom</i>	19	Kidney epithelial cells	22.4 µg/mL	[65]	
		<i>L. infantum/prom</i>	42	Raw264.7	No toxicity	[67]	
		<i>L. amazonensis/prom</i>	8.0 ± 0.1	J774G8	50.0 ± 0.1 µg/mL	[68]	
		<i>L. amazonensis/ama</i>	25.0 ± 0.3				
		<i>L. major/prom</i>	36	Raw264.7	No toxicity	[67]	
Geranyl acetate	<i>L. tropica/prom</i>	34					
<i>Pistacia Lentiscus</i>	Whole EssOil	nd	nd	Rat	6330 mg/kg	[77]	
		<i>L. donovani/prom</i>	4 -7.5	nd	nd	[20]	
		<i>L. major/prom</i>	17.52 ± 1.26	nd	nd	[19]	
	α -pinene	nd	nd	SH-SY5Y SK-N-BE (2) C	13.6 ± 0.5 µg/mL 26.3 ± 1.2 µg/mL	[78]	
		<i>L. major/prom</i>	19.80 ± 0.23	HL-60	2.5 µg/mL	[69]	
		<i>L. infantum/prom</i>	17.60 ± 0.88	Raw80	230.3±1.3 µg/mL	[64]	
		β-myrcene	<i>L. infantum/prom</i>	164	Raw264.7	No toxicity	[67]
			<i>L. major/prom</i>	219.17 ± 0.50	Raw80	nd	[64]
		Cymene	<i>L. infantum/prom</i>	156.17 ± 0.45	nd	115.4 µg/mL	
			<i>L. chagasi/prom</i>	149.1 ± 1.0	Vero	157.3 µg/mL	[70]
			<i>L. chagasi/ama</i>	> 30	THP-1	nd	
Terpinen-4-ol	<i>L. major/prom</i>	335.9	Hs 578T HL-60	No toxicity 20.5 µg/mL	[71] [69]		
Phellandrene	<i>L. major/prom</i>	32.8	HL-60	29.6 µg/mL	[69]		

* : IC₅₀ expressed in µg/mL for essential oils and in µM for major compounds; **Prom**: promastigote; **ama**: amastigote; **nd**: not determined

4. Conclusion

This study showed the high potential of the EssOil extracted from leaves of *Citrus limon* from area 1 of Tunisia and the EssOil extracted from the aerial part *Artemisia herba-alba* plant harvested from area 1 of Tunisia to inhibit the *Leishmania major* (axenic and intracellular amastigotes) growth, without having a cytotoxic effect on host cell. Selective activity was more important for the *Artemisia* EssOil. However, this study demonstrated for the first time the antileishmanial activity of EssOil extracted from *Citrus* leaves. These interesting activities could be linked to the activity of major compounds previously reported such as citral compounds for *Citrus* EssOil, or to synergistic effect between different EssOil compounds. The promising results of this study offer prospects for further investigations such as the antileishmanial evaluation of major compounds of active EssOils, and their mixture. A bioguided fractionation of EssOils could allow identifying molecules that are responsible of observed effects. Moreover, an assessment of EssOils activity against other *Leishmania* species and the test of cytotoxicity on another cell line could be considered. In addition, *in vivo* evaluations of EssOils and their major isolated components could be performed on the *L. major*/BALB/c mice model. This research could contribute to the discovery of effective drugs against leishmaniasis.

Declaration of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank University Paris-Sud (France), University of Carthage (Tunisia) and the laboratory of Materials Molecules and Applications (IPEST, Tunisia) for the funding granted to carry out this research work

Appendix A: Supplementary materials

References

- [1] Traoré, B., Oliveira, F., Faye, O., Dicko, A., Coulibaly, C.A., Sissoko, I.M., Sibiry, S., Sogoba, N., Sangare, M.B., Coulibaly, Y.I., Traore, P., Traore, S.F., Anderson, J.M., Keita, S., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Doumbia, S., 2016. Prevalence of cutaneous Leishmaniasis in districts of high and low endemicity in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–12.
- [2] WHO Leishmaniasis, 2017, Leishmaniasis key facts, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (accessed 18 April 2019).
- [3] Karami, M., Doudi, M., Setorki, M., 2013. Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *J Vector Borne Dis.*, 50(1), 30–37.
- [4] Aoun, K., Bouratbine, A., 2014. Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite* 21, 14.

- [5] Chakravarty, J., Sundar, S., 2010. Drug resistance in Leishmaniasis, *J Glob Infect Dis.*, 2, 167–176.
- [6] Akbari, M., Oryan, A., Hatam, G., 2017. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Trop.* 172, 86–90.
- [7] Pham, T.T., Loiseau, P.M., Barratt, G., 2013. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *Int. J. Pharm.* 454, 539–552.
- [8] Oryan, A., 2015. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iran. J. Vet. Res.* 16, 1–19.
- [9] Rocha, L.G., Almeida, J.R., Macêdo, R.O., Barbosa-Filho, J.M., 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12, 514–535.
- [10] Anthony, J.P., Fyfe, L., Smith, H., 2005. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.* 21, 462–468.
- [11] El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N., Elaissari, A., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243.
- [12] Bachrouch, O., Ferjani, N., Haouel, S., Jemâa, J.M. Ben, 2015. Major compounds and insecticidal activities of two Tunisian *Artemisia* essential oils toward two major coleopteran pests. *Ind. Crops Prod.* 65, 127–133.
- [13] Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrouf, A., Najjaa, H., Neffati, M., 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chim.* 13, 380–386.
- [14] Vernin, G., Merad, O., Vernin, G.M.F., Zamkotsian, R.M., Párkányi, C., 1995. GC-MS analysis of *Artemisia herba alba* Asso essential oils from Algeria. *Dev. Food Sci.* 37, 147–205.
- [15] Bahmani, M., Saki, K., Ezatpour, B., Shahsavari, S., Eftekhari, Z., Jelodari, M., Rafieian-Kopaei, M., Sepahvand, R., 2015. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on Leishmaniasis. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5, 695–701.
- [16] Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, M., Chaib, N., Idrissi, N.G., 2001. Evaluation *in vitro* de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Thérapeutique, Bull. la Société Pathol. Exot.* 94, 29–31.
- [17] Mathlouthi, A., Belkessam, M., Sdiri, M., Diouani, M.F., Souli, A., El-Bok, S., Ben-Attia, M., 2018. Chemical composition and anti-leishmania major activity of essential oils from *Artemisia* spp. grown in central Tunisia. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* 21, 1186–1198.
- [18] Rauf, A., Patel, S., Uddin, G., Siddiqui, B.S., Ahmad, B., Muhammad, N., Mabkhot, Y.N., Hadda, T.B., 2017. Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. *Biomed. Pharmacother.* 86, 393–404.
- [19] Bouyahya, A., Chadon Assemian, I.C., Mouzount, H., Bourais, I., Et-Touys, A., Fellah, H., Benjouad, A., Dakka, N., Bakri, Y., 2019. Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs? *Ind. Crops Prod.* 128, 62–69.
- [20] Bachrouch, O., Abderraba, M., Moussa, F., Loiseau, P., 2013. Fractions bioguidées extraites à partir de l'huile essentielle foliaire du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) potentiellement actives contre les parasites de la leishmaniose (*Leishmania donovani*). *Tunisian Patent TN* 2013/0129.
- [21] Aissi, O., Boussaid, M., Messaoud, C., 2016. Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Ind. Crops Prod.* 91, 56–65.
- [22] Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R., 2013. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Scientific World Journal.* 2013, 219815.
- [23] Bouzenna, H., Dhibi, S., Samout, N., Rjeibi, I., Talarmin, H., Elfeki, A., Hfaiedh, N., 2016. The protective effect of *Citrus limon* essential oil on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by aspirin in rats. *Biomed. Pharmacother.* 83, 1327–1334.

- [24] Bruno, L., Spadafora, N.D., Iaria, D., Chiappetta, A., Bitonti, M.B., 2014. Developmental stimuli and stress factors affect expression of CIGLP1, an emerging allergen-related gene in *Citrus limon*. *Plant Physiol. Biochem.* 79, 31–40.
- [25] Sidana, J., Saini, V., Dahiya, S., Nain, P., Bala, S., 2013. A review on citrus - “the boon of nature.” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 18, 20–27.
- [26] Bertuzzi, G., Tirillini, B., Angelini, P., Venanzoni, R., 2013. Antioxidative action of *Citrus limonum* essential oil on skin. *European J. Med. Plants* 3, 1–9.
- [27] Otang, W.M., Afolayan, A.J., 2016. Antimicrobial and antioxidant efficacy of *Citrus limon* L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa. *South African J. Bot.* 102, 46–49.
- [28] Arruda, D.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Katzin, A.M., Uliana, S.R.B., 2009. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomed. Pharmacother.* 63, 643–649.
- [29] El Haib, A., 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. PhD thesis, University of Toulouse III, France
- [30] Krauth-Siegel, R.L., Comini, M.A., 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780, 1236–1248.
- [31] Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J.P., Fleury, M.J., 2017. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb. Pathog.* 110, 56–65.
- [32] Stafford, J.L., Neumann, N.F., Belosevic, M., 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 187–248.
- [33] Schaich, K.M., Tian, X., Xie, J., 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods* 14, 111–125.
- [34] Ghazouani, N., Abderrabba, M., Bouajila, J., 2016. *Teucrium ramosissimum* (*Lamiaceae*): Volatile composition, seasonal variation, and pharmaceutical activity. *Anal. Lett.* 49, 1258–1271.
- [35] Yahyaoui, M., Ghazouani, N., Sifaoui, I., Abderrabba, M., 2017. Comparison of the effect of various extraction methods on the phytochemical composition and antioxidant activity of *Thymelaea hirsuta* L. aerial parts in Tunisia. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* 14, 997–1007.
- [36] Yahyaoui, M., Bouajila, J., Cazaux, S., Abderrabba, M., 2018. The impact of regional locality on chemical composition, antioxidant and biological activities of *Thymelaea hirsuta* L. extracts. *Phytomedicine* 41, 13–23.
- [37] ICestimator, 2018, <http://www.antimalarial-icestimator.net/runregression1.2.htm> (accessed 2 March 2018)
- [38] Mighri, H., Akrouf, A., El-jeni, H., Zaidi, S., Tomi, F., Casanova, J., Neffati, M., 2010. Composition and intraspecific chemical variability of the essential oil from *Artemisia herba-alba* growing wild in a Tunisian arid zone. *Chem. Biodivers.* 7, 2709–2717.
- [39] Neffati, A., Skandrani, I., Ben Sghaier, M., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K., Neffati, M., Chraief, I., Hammani, M., Chekir-Ghedira, L., 2008. Chemical composition, mutagenic and antimutagenic activities of essential oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *J. Essent. Oil Res.* 20, 471–477.
- [40] Dob, T., Benabdelkader, T., 2006. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 18, 685–690.
- [41] Zaouali, Y., Bel Hadj Yahya, I., Jaoudi, R., Messaoud, C., Boussaid, M., 2018. Sex-related differences in essential oil composition, phenol contents and antioxidant activity of aerial parts in *Pistacia lentiscus* L. during seasons. *Ind. Crop. Prod.* 121, 151–159.
- [42] Artech Garcia, A., Vanaclocha, B., Salazar, J.I.G., Cobo, R.M., 1998. *Fitoterapia, Vademecum de prescripcion.* 3a ed. Masson, Barcelona.
- [43] Delimi, A., Taibi, F., Bouchelaghem, S., Boumendjel, M., Hennouni-Siakhène, N., Chefrouf, A., 2017. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil of *Artemisia herba alba* (*Asteraceae*) against *Ephestia kuehniella* (*Lepidoptera*: *Pyrilidae*). *Int. J. Biosci.* 10(2), 130–137.

- [44] Sardashti, A., 2012. Chemical composition of essential oils from two *Artemisia* species and their antimicrobial effect in drinking water. *Med. Plants* 4(2).
- [45] Lota, M.L., De Rocca Serra, D., Tomi, F., Jacquemond, C., Casanova, J., 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *J. Agric. Food Chem.* 50, 796–805.
- [46] Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., Vamvakias, M., 2002. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. *J. Agric. Food Chem.* 50, 147–153.
- [47] Njoroge, S.M., Ukeda, H., Kusunose, H., Sawamura, M., 1994. Volatile components of japanese yuzu and lemon oils. *Flavour Fragr. J.* 9, 159–166.
- [48] Bachrouch, O., Mediouni-Ben Jemâa, J., Wissem, A.W., Talou, T., Marzouk, B., Abderraba, M., 2010. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* 46, 242–247.
- [49] Amhamdi, H., Aouinti, F., Wathelet, J.-P., Elbachiri, A., 2009. Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Rec.Nat.Prod.* 3, 90–95.
- [50] Asai, T., Matsukawa, T., Kajiyama, S., 2017. Metabolomic analysis of primary metabolites in *citrus* leaf during defense responses. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 376–381.
- [51] Kadri, A., Chobba, I.B., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., Gdoura, R., 2011. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. *African J. Biotechnol.* 10, 2923–2929.
- [52] Benyoucef, F., Dib, M. EA., Arrar, Z., Costa, J., Muselli, A., 2018. Synergistic antioxidant activity and chemical composition of essential oils From *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis*. *J. Appl. Biotechnol. Reports* 5, 151–156.
- [53] Kim, H.J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H.Y., Jin, Z., 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2849–2854.
- [54] Bourgou, S., Tammar, S., Salem, N., Mkadmini, K., Msaada, K., 2016. Phenolic composition, essential oil, and antioxidant activity in the aerial part of *Artemisia herba-Alba* from several provenances: A Comparative Study. *Int. J. Food Prop.* 19, 549–563.
- [55] Santos-Gomes, P.C., Fernandes-Ferreira, M., 2001. Organ and season dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *J. Agric. Food Chem* 49, 2908–2916.
- [56] Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W., 2016. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* 3, 25.
- [57] Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A., 1989. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 792–799.
- [58] Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., Yildirim, A., 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three turkish *Artemisia* species. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1408–1416.
- [59] Quintans-Júnior, L., Moreira, J.C.F., Pasquali, M.A.B., Rabie, S.M.S., Pires, A.S., Schröder, R., Rabelo, T.K., Santos, J.P.A., Lima, P.S.S., Cavalcanti, S.C.H., Araújo, A.A.S., Quintans, J.S.S., Gelain, D.P., 2013. Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, p-cymene, and geranyl acetate in experimental models. *ISRN Toxicol.* 2013, 459-530.
- [60] Le, T.B., Beaufay, C., Nghiem, D.T., Mingeot-Leclercq, M.P., Quetin-Leclercq, J., 2017. *In vitro* anti-leishmanial activity of essential oils extracted from Vietnamese plants. *Molecules* 22, 1–12.
- [61] De Muylder, G., Ang, K.K., Chen, S., Arkin, M.R., Engel, J.C., McKerrow, J.H., 2011. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1253.

- [62] De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., Cameron, S., Gilbert, I.H., Wyatt, P.G., Frearson, J.A., Fairlamb, A.H., Gray, D.H., 2013. Comparison of a high-throughput high-content untracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 57, 2913–2922.
- [63] Leal, S.M., Pino, N., Stashenko, E.E., Martínez, J.R., Escobar, P., 2013. Antiprotozoal activity of essential oils derived from Piper spp. grown in Colombia. *J. Essent. Oil Res.* 25, 512–519.
- [64] Essid, R., Rahali, F.Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F., 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Ind. Crops Prod.* 77, 795–802.
- [65] Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, M., Chaib, N., Idrissi, N.G., 2000. Evaluation *in vitro* de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Thérapeutique* Manuscrit n° 2162.
- [65] Zheljaskov, V.D., Cantrell, C.L., Tekwani, B., Khan, S.T., 2008. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. *Planta Med.* 74, 380–385.
- [66] Jomaa, S., Rahmo, A., Alnori, A.S., Chatty, M.E., 2012. The cytotoxic effect of essential oil of Syrian *Citrus limon* peel on human colorectal carcinoma cell line (Lim1863). *Middle East J. Cancer* 3, 15–21.
- [67] Machado, M., Pires, P., Dinis, A.M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., 2012. Monoterpenic aldehydes as potential anti-leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Exp. Parasitol.* 130, 223–231.
- [68] Santin, M.R., Dos Santos, A.O., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Ferreira, I.C., Ueda-Nakamura, T., 2009. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 105, 1489–1496.
- [69] Mikus, J., Harkenthal, M., Steverding, D. J., Reichling J., 2000. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med.* 66, 366–368.
- [70] Escobar, P., Milena Leal, S., Herrera, L.V., Martinez, J.R., Stashenko, E., 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 184–190.
- [71] Sibanda, S., Chigwada, G., Poole, M., Gwebu, E.T., Noletto, J.A., Schmidt, J.M., Rea, A.I., Setzer, W.N., 2004. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *J. Ethnopharmacol.* 92, 107–111.
- [72] Brenzan, M.A., Nakamura, C.V., Prado Dias Filho, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M.C.M., Aparício Garcia Cortez, D., 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 101, 715–722.
- [73] Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–8.
- [74] Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., Rohloff, J., 2010. Essential-oil composition, antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. *Chem. Biodivers.* 7, 1009–1018.
- [75] Aloui, Z., Messaoud, C., Haoues, M., Neffati, N., Jamoussi, I.B., Essafi-benkhadir, K., Boussaid, M., Guizani, I., Karoui, H., 2016. *Asteraceae Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* essential oils trigger apoptosis and cell cycle arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 1–15.
- [76] Marshall, F.N., 1982. Pharmacology and toxicology of probucol. *Artery* 10, 7–21.
- [77] Jenner, P.M., Hagan, E.C., Taylor, J.M., Cook, E.L., Fitzhugh, O.G., 1964. Food flavorings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food Cosmet. Toxicol.* 2, 327–343.
- [78] Piccolella, S., Nocera, P., Carillo, P., Woodrow, P., Greco, V., Manti, L., Fiorentino, A., Pacifico, S., 2016. An apolar *Pistacia lentiscus* L. leaf extract: GC-MS metabolic profiling and evaluation of cytotoxicity and apoptosis inducing effects on SH-SY5Y and SK-N-BE(2)C cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 95, 64–74.

Appendix A: supplementary materials

Table A.1: Geographical and climatic characteristics of the harvesting areas of the chosen plants

Harvesting area	Geographical coordinates	Mean pluviometry (mm/year)	Mean temperature *	Bioclimate	Soil quality
<i>Artemisia herba-alba</i>					
Area 1: <i>Krib</i>	Long 9°08'; Lat 36°18' Altitude 900 m [1]	542 [2]	35.1 °C, August [2]	Semi-arid sub-level higher with temperate winter in the North. Medium semi-arid sub-layer with cool winter in the South and risk of frost and snow for at least two months [3]	Soil of plain, vertic or slightly evolved, heavy textured supply, poorly draining. Some rubified alluvial soils suitable for arboriculture are found in the vicinity of the Krib plain. [3]
Area 2: <i>Sidi Bouzid</i>	Long 9°30'; Lat 35°02' Altitude 327 m [4]	377 [2]	23.5 °C, August [2]	Arid bioclimatic stage, between the upper sub-stage with temperate winter and the lower sub-stage with cool winter [4]	n.r
<i>Pistacia lentiscus</i>					
Area 1: <i>Seliana</i>	Long 9° 34'; Lat 36°05' Altitude 1266 m [5]	440-560 [6]	25.9 °C, July [2]	Semi-arid medium to cool winter [6]	It may have developed on alluvia derived from red older soils [7]
Area 2: <i>Zaghouan</i>	Long 10°06'43"; Lat 36°24' Altitude 1295 m [8]	483 ([2])	26.8 °C, August [2]	Semi-arid climate superior to mild and temperate winter [9]	The soil is predominantly calcimagnetic with calcareous brown soil with medium to good fertility. The soil pH is 6.1 [9;10]
<i>Citrus limon</i>					
Area 1: <i>Béja</i>	Long 9°10'55"; Lat 36°43'30" Altitude 222 m [11]	622 [2]	27.3 °C, August [2]	Sub-humid bioclimatic stage [9]	Slightly evolved soil, of non-climatic origin, alluvial supply, with a vertic nature [12]
Area 2: <i>Menzel Bouzelfa</i>	Long 10°35'; Lat 36°41' Altitude 48 m [13]	397 [2]	26.3 °C, August [2]	Semi-arid upper bioclimatic stage with mild and temperate winters [9]	n.r

*: Mean temperature of the hottest month of the year, n.r: not reported in literature.

Table A.1 references:

- [1] Official website of the municipality of Krib, 2019. <http://www.commune-elkrib.gov.tn> (accessed 5 March 2019).
- [2] OpenStreetMap, 2019. Les données climatiques pour les villes du monde entier. <http://umap.openstreetmap.fr/fr/> (accessed 5 March 2019).
- [3] Mizouri, M., Barbery, J., Willaine, P., 1990. Carte des ressources en sols de la Tunisie, Feuille de Maktar : Nouvelle approche méthodologique. Tunis : Ministère de l'Agriculture, (212), 87p., multigr. (Etudes spéciales - Direction des sols ; 212).
- [4] Official website of the municipality of Sidi Bouzid, 2019. <http://www.commune-sidibouzid.gov.tn> (accessed 5 March 2019).
- [5] Official website of the municipality of Séliana, 2019. <http://www.commune-siliana.gov.tn> (accessed 5 March 2019).
- [6] Agence de réhabilitation et de rénovation urbaine, 2017. Plan de gestion environnementale et sociale du projet de réhabilitation du quartier populaire El Ons dans la commune de Rouhia Gouvernorat de Siliana. (<http://www.collectiviteslocales.gov.tn/wp-content/uploads/2017/06/PGES-REHABILITATION-QUARTIER-EL-ONS-COMMUNE-ROUHIA-SILIANA.pdf>) (accessed 5 March 2019).
- [7] Fournet, A., 1969. Etude pédagogique de la dorsale Tunisienne (Transversale Kébir- Bargou-Serj - Oussltic), PhD thesis, Faculty of Pharmacy, Paris France.
- [8] Official website of the municipality of Zaghouan, 2019. <http://www.commune-zaghouan.gov.tn> (accessed 5 March 2019).
- [9] CNEA, 2007. Elaboration d'une étude sur l'état de désertification pour une gestion durable des RN/Avril 2007. Documents from Tunisian Ministry of Environment and Sustainable Development
- [10] Belkhodja, K., Bortoli, L., Cointepas, J., Dimanche, P., Fournet, A., Jacquinet, J-C, Mori, A., 1971. Les sols de la Tunisie septentrionale. Documents from Tunisian Ministry of Agriculture.
- [11] Official website of the municipality of Béja, 2019. <http://www.commune-beja.gov.tn> (accessed 5 March 2019).
- [12] Ben Hassine, D., Abderrabba, M., Yvon, Y., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Bouajila, J., 2012. Chemical composition and *in vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. *Molecules* 17, 9540–9558.
- [13] Official website of the municipality of Menzel Bouzelfa, 2019. <http://www.commune-menzelbouzelfa.gov.tn> (accessed 5 March 2019).

Table A.2: Harvesting conditions and voucher specimens of selected plants

Plant Species	Harvested part	Harvesting period	Voucher specimen
<i>Artemisia herba-alba</i>	Aerial part	September to October 2016	P.1.01
<i>Pistacia lentiscus</i>	Leaves	November to December 2016	P.1.08003
<i>Citrus limon</i>	Leaves	January to February 2017	-



Adapted image of www.d-map.com

Figure A.1: Tunisian map presenting the different sampling areas of the three plants: *Artemisia herba alba* of Area 1 (*Artemisia 1*) and Area 2 (*Artemisia 2*), *Pistacia lentiscus* of Area 1 (*Pistacia 1*) and the Area 2 (*Pistacia 2*), and *Citrus lemon* of Area 1 (*Citrus 1*) and Area 2 (*Citrus 2*).

Section II. Caractérisation des extraits organiques des différentes plantes et évaluation *in vitro* de leur activité antileishmanienne

Cette section du chapitre 2 traitera de l'extraction, la caractérisation par dosage des familles chimiques et l'activité antiparasitaire des 4 types d'extraits organiques et aqueux obtenus par macération à froid des 3 plantes sélectionnées pour cette étude. Un seul extrait sera sélectionné pour la suite du travail. Celui-ci sera caractérisé après une microextraction en phase solide.

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Technique d'extraction : la macération à température ambiante

La macération à froid a été la technique choisie pour préparer les différents extraits (organiques et aqueux) à partir des plantes récoltées. Il s'agit de la technique classique qui sert à extraire des composés ayant une volatilité limitée tels que les cires et les pigments etc., ainsi que des molécules bioactives présentant une masse molaire importante comme les polyphénols et les flavonoïdes. L'avantage de cette technique est qu'elle se déroule à température ambiante, ce qui permet de préserver les molécules fragiles, dégradables par la chaleur, notamment les structures phénoliques qui présentent des activités biologiques particulières. Brièvement, cette technique repose sur un processus d'interaction et de transfert de matière plante-solvant. Le choix du solvant à utiliser est généralement déterminé par une pré-sélection de molécules extractibles en fonction de leur affinité avec un solvant donné, leur capacité à se dissoudre dans celui-ci, mais aussi par rapport au domaine d'application envisagé. Le solvant doit pouvoir également être éliminé après extraction par vaporisation. Dans notre cas, les ExOrg préparés sont destinés à une application dans le domaine pharmaceutique, donc notre choix s'est porté exclusivement sur des solvants acceptés dans ce domaine, qui sont l'eau, l'éthanol (EtOH), l'acétone et l'acétate d'éthyle (AcOEt) [1].

Les feuilles et la partie aérienne ont été séchées dans une pièce à air ventilé à l'abri de la lumière, la chaleur et l'humidité. Puis, elles ont été soumises à un broyage grossier à l'aide d'un broyeur, de type Moulinex[®], ensuite la fraction granulométrique inférieure à 100 µm a été sélectionnée grâce à un tamis.

La poudre de plante a été immergée dans le solvant d'extraction avec un ratio (m/v) plante/solvant de 1 :10. Le mélange a été gardé dans une bouteille ambrée à température ambiante sous agitation régulière pendant 24 h. Ensuite, le mélange plante/solvant a été filtré

puis le filtrat a été concentré à sec à grâce à un évaporateur rotatif de type IKA RV 10 digital. La température et la pression qui ont été appliquées dépendent de la nature du solvant. Néanmoins, la température ne doit pas dépasser les 40 °C afin de préserver l'intégrité des molécules bioactives. L'ensemble du procédé d'extraction des extraits est récapitulé dans la Fig. 2.2.

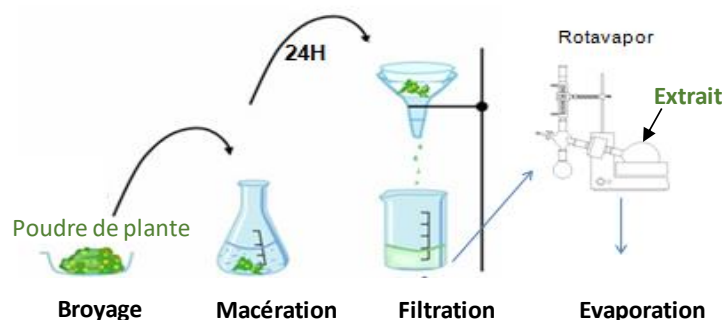


Figure 2.2 : Protocole de la macération à froid.

L'extrait ainsi obtenu a été pesé et le rendement d'extraction calculé selon l'équation qui suit :

$$\text{Rendement en extrait (\%)} = \frac{\text{masse d'ExOrg récupérée}}{\text{masse de la poudre de plante séchée}} \times 100 \quad \text{Equation. 1}$$

II.1.2. Techniques de caractérisation : Micro-extraction en phase solide

La micro-extraction en phase solide ou Solid Phase Micro Extraction (SPME) est une technique d'extraction ne nécessitant pas l'utilisation de solvants. Elle sert à préconcentrer les molécules d'intérêt et à améliorer les limites de détection. La technique SPME couplée à un appareillage analytique, comme dans notre cas la GC-MS, est donc un dispositif qui regroupe toutes les étapes de préparation et d'analyse d'un échantillon puisqu'elle permet d'extraire, de concentrer puis de dériver et transférer les molécules à l'appareil d'analyse. Cette technique s'est révélée une des meilleures méthodes pour les analyses qui requièrent des procédés d'extraction longs, coûteux et nécessitant l'utilisation de solvants organiques à fort impact environnemental [2]. La technique SPME consiste à faire immerger une fibre de silice fondue enrobée d'un polymère dans un échantillon. Par un mécanisme d'adsorption/désorption, les analytes se distribuent entre la fibre et l'échantillon. Une fois saturée, la fibre est introduite au niveau de l'injecteur d'un dispositif de chromatographie en phase gazeuse, où les analytes subissent une désorption par effet thermique, puis sont entraînés vers la colonne chromatographique (Fig. 2.3).

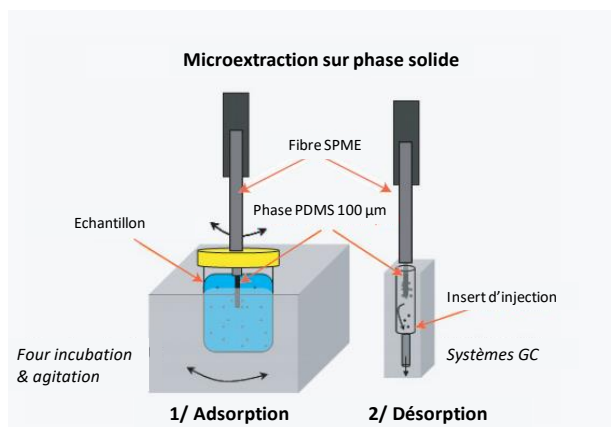


Figure 2.3 : Vue d'ensemble d'une analyse GC couplée à une micro-extraction sur phase solide [3].

L'extraction a été réalisée à l'aide d'une fibre PDMS (poly di-méthyl siloxane) de 100 µm qui est le revêtement le plus couramment utilisé. Cette fibre a été immergée dans un flacon avec un septum contenant 300 mg d'extrait à analyser, qui est plongé dans un bain marie maintenu sous agitation constante de 190 rpm et à une température ne dépassant pas 82 °C. L'étape d'extraction a duré environ 1 h. Ensuite, la fibre saturée a été transférée dans l'injecteur d'un dispositif de GC-MS dont les conditions sont identiques à celles utilisées pour l'analyse des huiles essentielles (voir Section I, Chapitre 2).

Il est à noter que cette technique a été utilisée pour caractériser uniquement l'extrait sélectionné à la fin de ce chapitre.

II.1.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée suivant les tests DPPH et ABTS. Les protocoles utilisés ont été détaillés dans la Publication 1.

II.1.4. Dosage des familles chimiques

Le dosage global des familles chimiques a été réalisé afin d'avoir plus d'information quant aux composés extraits par les différents solvants. Ces dosages nous ont également permis de comparer l'efficacité biologique par rapport aux conditions d'extraction. De plus, la quantification des différentes familles chimiques dans les extraits nous a permis, dans certains cas, de trouver une corrélation entre activité et composition. Cette corrélation contribue, en effet, à la compréhension du ou des mécanismes d'action biologique.

a) Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols dans les différents extraits a été réalisé suivant la même procédure que celle appliquée pour les huiles essentielles (voir Publication 1).

b) Dosage des flavonoïdes totaux

Dans ce présent travail, le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon le protocole adapté par Arvouet-Grand *et al.* [4]. Cette méthode repose sur le pouvoir du chlorure d'aluminium de réagir avec le squelette des flavonoïdes afin de former un complexe par chélation grâce à l'aluminium qui peut être détecté par spectrophotométrie. Ce complexe, de couleur jaunâtre, est connu pour sa stabilité importante. Le protocole commence par la préparation d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2 (m/v) % dans du méthanol. Cette solution a été ajoutée à volume égal à l'échantillon à doser. Ensuite, après une incubation à l'abri de la lumière durant 15 minutes, l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un échantillon témoin contenant l'extrait et le méthanol (1 : 1) sans AlCl_3 . La gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions à des concentrations allant de 0 à 10 mg/mL, en choisissant la quercétine comme flavonoïde de référence. La teneur en flavonoïdes totaux a été également extrapolée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en quercétine par gramme d'extrait sec (mEQ/g extrait sec). Pour chaque extrait, ces mesures ont été répétées au moins trois fois sur des prélèvements différents.

c) Dosage des tanins condensés

La teneur des extraits préparés en tanins condensés a été évaluée suivant la méthode de la vanilline en milieu acide [5,6]. Son principe repose sur le pouvoir de la vanilline à réagir avec le squelette des tanins condensés en milieu acide fort pour former un complexe qui absorbe fortement à 510 nm. Pour ce faire, une solution de vanilline à 1 (m/v) % a été préparée par dissolution de 1 g de vanilline dans 100 mL d'acide sulfurique H_2SO_4 (7 M) dans un bain de glace, car la réaction est fortement exothermique. Ensuite, 500 μL de cette solution de vanilline (1 %) ont été ajoutés à 250 μL d'extrait dilué dans le solvant approprié. La réalisation du témoin renfermant la solution de vanilline avec le solvant est recommandée pour chaque solvant utilisé. Le mélange réactionnel a été bien agité à l'aide d'un vortex puis incubé pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et de la chaleur. La même procédure a été appliquée pour la gamme étalon qui a été réalisée en utilisant la catéchine, un tanin condensé de référence dont la concentration variait entre 0 et 17 mg/L. La lecture des absorbances des différents échantillons a été réalisée à 510 nm. Enfin, la teneur en tanins condensés a été extrapolée à partir de la courbe d'étalonnage. Celle-ci est exprimée en milligrammes équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec (mEC/g extrait sec). Pour chaque échantillon la mesure a été répétée au moins trois fois sur 3 prélèvements différents.

II.1.5. Activité antileishmanienne et cytotoxicité

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans la Publication 1.

II.1.6. Analyse statistique

Dans notre étude, étant donné que toutes les mesures ont été effectuées au moins trois fois ($n = 3$), les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel IBM SPSS Statistics 21.0[®] pour appliquer le test de l'analyse de la variance (one-way-Anova). Le test de Duncan a été réalisé afin d'identifier les différences significatives entre les différentes moyennes avec un niveau de significativité de 0,05. Le test de la corrélation de Pearson a été également appliqué sur les moyennes obtenues afin de déterminer l'absence ou la présence d'une relation linéaire significative entre les différentes variables. Ce test repose sur un calcul d'un coefficient appelé coefficient de Pearson (ou R^2) qui est une valeur standardisée de la covariance et qui peut varier de -1 à +1. Plus le R^2 tend vers la valeur absolue de 1, plus la corrélation entre les deux variables est significativement importante. Pour un R^2 se rapprochant de zéro, la corrélation est faible. Si le R^2 est positif alors les deux variables possèdent une relation de proportionnalité. Si le R^2 est négatif, alors les deux variables sont inversement proportionnelles. Dans notre étude, le test de Pearson a été réalisé à l'aide du logiciel XL STAT[®].

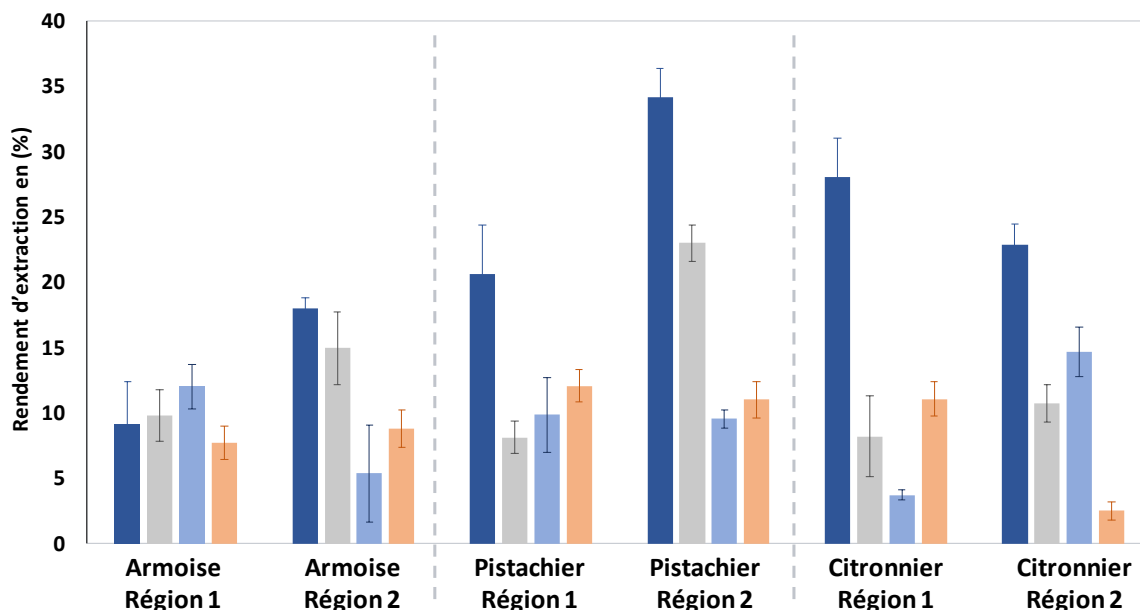
II.2. Résultats et discussion :

II.2.1. Rendements d'extraction par macération à froid

Le rendement d'extraction a été calculé pour chaque plante, chaque région et chaque solvant utilisé afin d'estimer l'efficacité de cette méthode. Les régions de récolte sélectionnées pour chaque espèce sont définies dans le tableau SM1 de la Publication 1.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes dans la Fig. 2.4. Les rendements d'extraction sont très variables d'une plante à une autre, d'une région à une autre pour une même plante, et d'un solvant à un autre. Les rendements ne dépassent pas 17 % pour l'armoise, cependant ils peuvent atteindre environ 38 % pour le pistachier. Cette variabilité de rendement est due à la composition très différentes en molécules bioactives aussi bien quantitativement que qualitativement caractérisant chacune des espèces récoltées. De plus, la différence de rendement constatée entre les régions pour une même plante est due à une composition différente en molécules et plus probablement à cause d'une variation relative à l'abondance plutôt qu'à une variation qualitative des molécules. En effet, généralement, les molécules contenues dans une espèce donnée sont caractéristiques et varient en abondance en fonction de plusieurs facteurs notamment les conditions propres à chaque site de récolte, comme la salinité et le pH du sol, le voisinage de la plante récoltée qui peut être favorable ou non au développement de celle-ci, la zone géographique et son altitude, l'existence ou non d'insectes

ravageurs, etc [7–9]. Il est à noter que ce constat a été le même pour toutes les plantes de notre étude.



Moyenne \pm écart-type (n = 3)

Figure 2.4 : Rendement d'extraction par macération à froid dans de l'eau (■), de l'éthanol (■), l'acétone (■) et l'acétate d'éthyle (■), respectivement pour l'armoise herbe-blanche (armoise), pistachier lentisque (pistachier) et le citronnier, de deux régions différentes pour chaque plante.

Enfin, le rendement d'extraction varie considérablement selon le solvant d'extraction utilisé et, ce, pour une même espèce et une même région de récolte. Néanmoins, une tendance similaire est notable pour toutes les plantes et les régions par rapport aux solvants employés. En effet, dans tous les cas, le rendement est largement supérieur pour les solvants les plus polaires. En effet, les caractéristiques d'un solvant d'extraction donné vont déterminer la gamme de molécules bioactives capables d'être solubilisées par celui-ci, grâce à leur affinité avec lui. Parmi les paramètres couramment étudiés, la polarité des solvants peut donner une prédiction préliminaire des familles ou classes de molécules extractibles par un solvant donné. Les solvants choisis lors de notre étude peuvent être classés dans l'ordre de polarité croissante suivant : *acétate d'éthyle* < *acétone* < *éthanol* < *eau*. Ainsi, en termes d'efficacité, l'eau a globalement le pouvoir d'accomplir les meilleurs rendements. Ceci peut être expliqué par le fait que l'eau possède un moment dipolaire important, voire supérieur à celui des alcools, cétones et esters. Elle est capable de déstabiliser les parois cellulaires et peut donc pénétrer plus profondément dans les matrices végétales, et ainsi entrer en contact avec une quantité plus importante de solutés, ce qui favoriserait leur extraction [10]. L'eau a également le pouvoir

d'extraire les protéines, les gommes, les mucilages, les sels minéraux et les acides aminés [11]. L'éthanol, quant à lui, permet de solubiliser plusieurs familles comme les terpénoïdes, les phénols, les hétérosides (flavonoïdes, quinones, coumarines etc.), les alcaloïdes, les polyols, les tanins, les acides organiques, les sels minéraux et les acides aminés. Structurellement, d'une manière générale, l'eau ou les alcools comme l'éthanol sont capables d'extraire les composés dont la structure est riche en groupements hydrophiles [12]. Par ailleurs, l'acétate d'éthyle, le solvant le moins polaire dans notre étude, permet d'extraire préférentiellement les molécules présentant une polarité moyenne tels que les aglycones libres [13]. Du point de vue de la structure chimique, ce solvant est capable de solubiliser les molécules dont la structure comporte des chaînes hydrophobes telles que les lipides et les terpènes et stérols [12]. Il peut également extraire des flavonoïdes comme c'est le cas avec la feuille de myrtille de jardins (*Solanum scabrum*, Solanaceae) [14].

A l'appui de ces informations, nous pourrions avoir une idée très générale quant à la composition en différentes molécules bioactives contenues dans les extraits préparés. Ce postulat a été vérifié ultérieurement par un dosage des différentes familles chimiques pour chaque extrait préparé.

En outre, la variation d'espèce, la différence entre les sites de récolte ainsi que les solvants d'extraction ont contribué considérablement à extraire une multitude de molécules bioactives différentes les unes des autres. Cette diversité pourrait être particulièrement intéressante pour le criblage d'une activité biologique donnée telle que l'activité antileishmanienne *in vitro* dans notre cas.

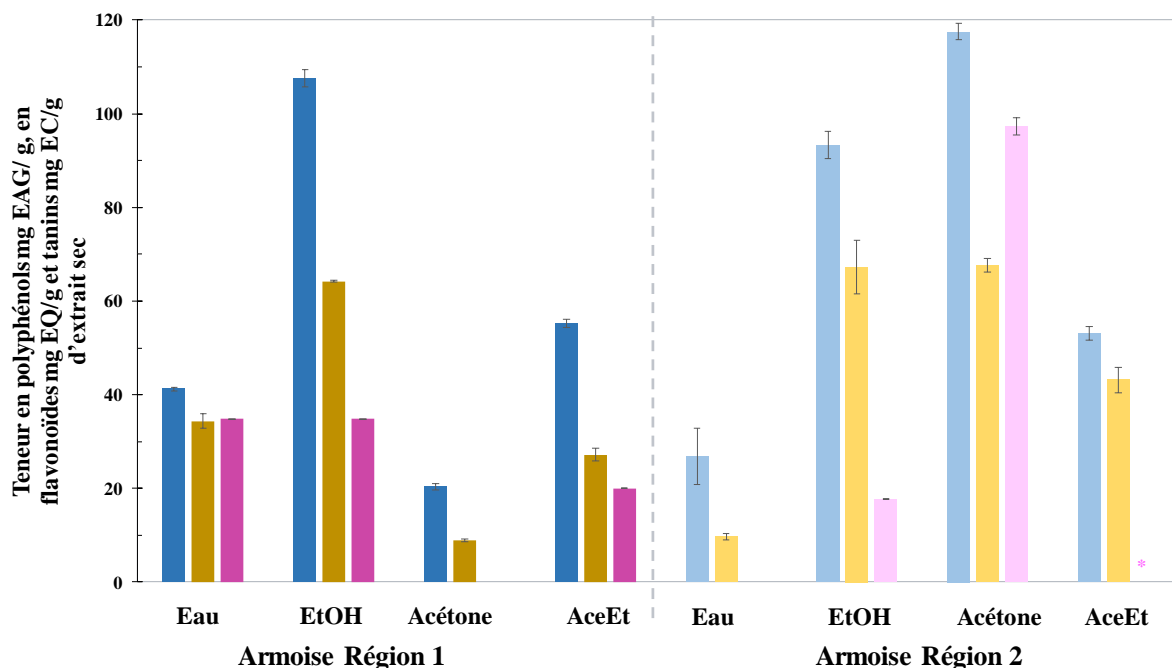
II.2.2. Armoise herbe-blanche

a) Teneur en différentes familles chimiques

Les teneurs des extraits en molécules bioactives, polyphénols, flavonoïdes et tanins, ont été calculées et représentées, pour les deux plantes d'armoise récoltée dans deux régions différentes à savoir Krib (Région 1) et Sidi Bouzid (Région 2), par les histogrammes de la Fig. 2.5.

La teneur en polyphénols totaux des extraits préparés varie de $20,4 \pm 0,7$ à $117,5 \pm 1,7$ mg EAG/g d'extrait sec. La teneur la plus élevée a été obtenue pour une macération à l'acétone de l'armoise de la Région 2. Ce même solvant a été néanmoins moins efficace pour extraire les polyphénols de l'armoise de la Région 1. Selon la région de récolte, nous pouvons classer les solvants par ordre d'efficacité d'extraction des polyphénols à partir de l'armoise comme suit :

- Pour la Région 1 : EtOH > AcOEt > eau > acétone.
- Pour la Région 2 : acétone > EtOH > AcOEt > eau.



* : non déterminé ; moyenne \pm écart-type (n = 3).

Figure 2.5 : Teneur en polyphénols totaux (■/■), en flavonoïdes (■/■) et en tanins condensés (■/■) des extraits obtenus par macération dans l'eau, l'éthanol (EtOH), l'acétone et l'acétate d'éthyle (AcOEt) des parties aériennes de l'armoise herbe-blanc (Armoise) cueillies dans deux régions de la Tunisie : Krib (Région 1) et Sidi Bouzid (Région 2).

A partir de ce classement nous pouvons dire que dans l'armoise de la Région 1, les polyphénols abondamment présents sont de caractère polaire puisqu'ils sont extractibles par un solvant de polarité importante (EtOH) avec une teneur moyenne de 108 mg EAG/g d'extrait sec. Par ailleurs, dans l'armoise de la Région 2, les polyphénols majoritairement présents sont moyennement polaires à polaires puisqu'ils sont extractibles par l'acétone et l'EtOH à des teneurs moyennes respectives de 118 mg EAG/g d'extrait sec et 93 mg EAG/g d'extrait sec, respectivement. L'EtOH a été le solvant qui a démontré la meilleure efficacité pour extraire les polyphénols de l'espèce armoise herbe-blanc.

La teneur en flavonoïdes varie de $8,9 \pm 0,2$ à $67,7 \pm 1,5$ mg EQ/g d'extrait sec. Comme pour les polyphénols, les solvants les plus polaires ont été les plus efficaces pour extraire les flavonoïdes de l'armoise de la Région 1 (EtOH et eau) avec des teneurs moyennes respectives de 64 mg EQ/g d'extrait sec et 34 mg EQ/g d'extrait sec. Pour l'armoise de la Région 2, comme pour les polyphénols, les flavonoïdes ont été préférentiellement extraits par l'acétone et l'EtOH. La composition abondante en polyphénols et notamment en flavonoïdes de ces extraits nous a incités à nous intéresser à leur composition précédemment rapportée dans la littérature. Dans ce contexte, nous nous sommes référés à l'étude de Bourgou et al. qui ont analysé par HPLC en phase inverse les extraits méthanoliques d'armoise herbe-blanc issus de différentes

localisations de Tunisie. La composition de ces extraits a été particulièrement riche en flavonoïdes [15], ce qui est en accord avec nos résultats de l'armoise de la Région 2. Parmi les molécules les plus abondantes, le kaempferol, l'acide trans-cinnamique, l'apigénine, l'acide p-coumarique, la naringénine, l'acide caféique, l'acide chlorogéniques et l'acide syringique ont été identifiés [15]. Dans notre étude, les solvants les moins efficaces dans l'extraction des flavonoïdes pour les deux récoltes d'armoise sont l'acétone et l'eau respectivement pour la Région 1 et la Région 2. Ceci révèle encore une fois la différence structurale des flavonoïdes présents dans chacune des récoltes.

Enfin, la teneur en tanins condensés est fortement dépendante aussi bien de la région de récolte que du solvant d'extraction utilisé. Les solvants d'extraction les plus efficaces pour les tanins ont été l'EtOH et l'acétone, respectivement pour la Région 1 et la Région 2 avec des teneurs moyennes respectives de 35 mg EC/g d'extrait sec et de 97 mg EC/g d'extrait sec. Par ailleurs, comme pour l'extraction des polyphénols, les solvants d'extraction des tanins les moins efficaces sont l'acétone et l'eau, respectivement pour la Région 1 et la Région 2. En effet, pour ces extraits, aucune trace de tanins n'a été détectée.

Pour conclure, les extraits les plus riches en molécules bioactives sont l'extrait d'éthanol et l'extrait d'acétone, respectivement pour les récoltes de la Région 1 et de la Région 2. Ceci révèle que les molécules abondamment présentes dans l'armoise de la Région 1 sont de caractère polaire tandis qu'elles sont moyennement polaires dans l'armoise de la Région 2.

b) Activité antioxydante

La détermination de l'activité antioxydante des extraits préparés sert à quantifier la capacité des antioxydants contenus dans les extraits à piéger les radicaux libres par les deux tests DPPH et ABTS. Les différentes activités mesurées en termes d'IC₅₀ définie par la concentration d'inhibition à 50 %, exprimée en mg/L, des différents extraits d'armoise (Région 1 et Région 2) ainsi que le contrôle positif (l'acide ascorbique ou vitamine C) sont représentées dans le Tableau 2.1.

Les résultats de l'activité antioxydante montrent qu'il y a une différence entre les deux tests établis. Par exemple, pour le test DPPH, tous les extraits préparés à partir de l'armoise récoltée de la Région 1 ne possèdent aucune activité notable (IC₅₀ > 100 mg/L), alors qu'une activité antioxydante très faible a été détectée par test ABTS pour les extraits aqueux et d'acétate d'éthyle avec respectivement des IC₅₀ de 71 et de 77 mg/L. La valeur plus élevée du pouvoir antioxydant détectée pour ces deux extraits peut s'expliquer par le fait que le test DPPH est réalisé en milieu organique (réactif solubilisé dans du méthanol), dans lequel les réactions de réduction par transfert d'hydrogène s'avèrent très lentes par rapport à celles qui se déroulent en

milieu aqueux dans le test ABTS^{•+} qui sont cinétiquement plus rapides [16]. Pour cette raison, le test DPPH pourrait parfois sous-estimer le pouvoir antioxydant.

Tableau 2.1 : Activité antioxydante des différents extraits préparés à partir d'armoise herbe-blanche de deux régions de la Tunisie (Région 1 et Région 2) définie par deux tests : DPPH et ABTS.

Echantillon		IC ₅₀ DPPH (mg/L)	IC ₅₀ ABTS (mg/L)
Armoise Région 1	Eau	> 100	71,7 ± 1,3
	EtOH	> 100	> 100
	Acétone	> 100	> 100
	AcOEt	> 100	77,2 ± 0,2
Armoise Région 2	Eau	> 100	> 100
	EtOH	32,4 ± 1,2	46,8 ± 0,4
	Acétone	70,3 ± 2,0	38,4 ± 3,1
	AcOEt	> 100	85,2 ± 1,4
Vitamine C		3,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1

Moyenne ± écart-type (n = 3)

Le pouvoir antioxydant des extraits de l'armoise de la Région 2 montre des résultats différents. En effet, les extraits présentent des IC₅₀ allant de 32,4 ± 1,2 mg/L et dépassant les 100 mg/L. Ceci révèle des activités antioxydantes modérées à très faibles. L'extrait aqueux est considéré comme inactif pour le piégeage des radicaux libres, et, ce, pour les deux tests. La teneur en molécules bioactives pour l'extrait aqueux était la moins intéressante (Fig. 2.5) révélant ainsi que celui-ci est pauvre en groupements hydroxyles présents dans les structures phénoliques. Or, la teneur en molécules bioactives (surtout les polyphénols) est corrélée à l'activité antioxydante d'un extrait donné car ils jouent un rôle de piégeage des radicaux [17]. En outre, cette corrélation est évidente, vu que ces composés phénoliques sont favorisées dans la réaction de réduction des radicaux notamment le radical cation ABTS^{•+} [16]. L'estimation du pouvoir oxydant pourrait néanmoins être sous-estimée dans la mesure où elle ne tient pas compte de toutes les structures, surtout en absence de caractérisation des molécules responsables d'une éventuelle activité de piégeage de radicaux dans l'espèce d'armoise herbe-blanche. Par ailleurs, les extraits d'acétone et d'EtOH de la Région 2 présentent les meilleures activités antioxydantes avec des valeurs d'IC₅₀ de 32,4 ± 1,2 et 70,3 ± 2,0 mg/L témoignant d'une activité de piégeage des radicaux libres modérée. Cette activité pourrait être due à une composition caractérisée par la présence de flavonols (kaempférol), de flavones (apigénine) et de flavonones (naringénine) [15]. Cette activité serait liée à leur structure riche en substituants hydroxyles à savoir le groupement 3-OH et un système de doubles liaisons conjuguées. Ces caractéristiques confèrent une stabilité considérable au radical formé [15]. De plus, les acides hydroxycinnamiques, les

acides *trans*-cinnamiques, *p*-coumariques, caféiques et chlorogéniques, pouvant être présents dans les extraits d'armoise herbe-blanche, ont démontré une activité antioxydante puissante qui est liée au nombre et au schéma de substitution des groupes hydroxyles phénoliques [18]. L'activité antioxydante modérée des extraits de la Région 2 serait donc due soit à la présence de ces structures mais en quantité très faible, soit à une composition différente.

c) Activité antileishmanienne et cytotoxicité

Les résultats de l'activité antileishmanienne des extraits d'armoise procédée sur les deux formes différentes du *Leishmania major* ainsi que leur toxicité sur les cellules hôtes sont répertoriés dans le Tableau 2.2. L'efficacité antileishmanienne varie de façon importante d'un extrait à un autre, d'une région de récolte à une autre et également entre la forme amastigote axénique et la forme amastigote intramacrophagique.

Tableau 2.2 : Activité antileishmanienne des extraits d'armoise herbe-blanche de deux régions (Région 1 et Région 2) sur les formes amastigotes axénique et amastigote intramacrophagique du *Leishmania major* et leur toxicité sur les cellules Raw264.7

Echantillon		IC ₅₀ amastigote (µg/mL) ou µM		CC ₅₀ (µg/mL)	SI*
		Axénique	Intramacrophagique		
Armoise	Eau	24,71 ± 2,96 ³	27,32 ± 7,04 ³	76,56 ± 4,20	2,80 ¹
	Région 1				
	EtOH	8,60 ± 0,68 ²	12,03 ± 1,79 ²	76,74 ± 4,20	6,38 ¹
	Acétone	>100	-	-	-
	AcOEt	>100	36,20 ± 4,30 ⁴	78,15 ± 3,28	2,15 ¹
Armoise	Eau	8,32 ± 2,54 ²	7,47 ± 2,48 ²	57,24 ± 3,47	7,66 ¹
Région 2	EtOH	>100	>100	>100	> 1
	Acétone	12,73 ± 1,81 ²	1,56 ± 0,51 ¹	75,82 ± 5,27	48,6 ³
	AcOEt	50,32 ± 7,59	>100	>100	> 1
HePC		2,74 ± 0,34 ¹	1,98 ± 0,56 ¹	62,12 ± 4,32	31,40 ²

Moyenne ± écart-type (n = 6). L'analyse statistique a été réalisée par One-Way-ANOVA avec le post-test Duncan avec un niveau de significativité $p < 0,05$ pour comparer les moyennes par colonne. Dans la même colonne, les moyennes avec différents chiffres en exposant (^{1,2,3,4}) sont significativement différentes. Seules les moyennes des extraits actifs (IC₅₀ > 20 µg/mL) ont été comparées. Pour les toxicités des extraits, le test One-Way-ANOVA a été appliqué uniquement sur les indices de sélectivité (* : SI).

(-) : extrait dont l'activité n'a pas pu être déterminée à cause de son insolubilité dans le milieu de culture.

HePC : miltéfosine, contrôle positif.

Les meilleures activités sur la forme axénique du *L. major* ont été obtenues pour l'extrait EtOH de la Région 1 et l'extrait aqueux de la Région 2 avec des valeurs d'IC₅₀ voisines de 8 µg/mL. Cette activité est considérée comme très intéressante. L'extrait d'acétone de la Région 2 a conduit à une IC₅₀ aux alentours de 12 µg/mL, révélant ainsi une activité inhibitrice intéressante. En revanche, aucune activité significative n'a été observée pour les autres extraits des Régions 1 et 2, vu que les valeurs d'IC₅₀ pour la forme axénique sont supérieures à 20 µg/mL.

L'activité antileishmanienne sur la forme amastigote intramacrophagique de ces mêmes extraits a présenté une légère différence par rapport à celle observée pour la forme amastigote axénique. Les extraits inactifs sur la forme libre (axénique) n'ont démontré aucune efficacité sur la forme intramacrophagique ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$). Comme les résultats sur les deux formes du parasite sont en accord, nous pouvons conclure que ces extraits ne présentent aucune efficacité antileishmanienne.

D'autre part, les extraits ayant démontré une activité importante sur la forme amastigote axénique ont aussi présenté une efficacité sur la forme intracellulaire du parasite. L'extrait aqueux de l'armoise de la Région 2 conserve la même efficacité antiparasitaire (autour de $8 \mu\text{g/mL}$) pour les deux formes du parasite, ce qui révèle une activité très intéressante de cet extrait ainsi que sa capacité à franchir les barrières cellulaires pour exercer l'effet antiparasitaire avec la même efficacité [19]. Néanmoins, une légère toxicité a été constatée puisque l'indice de sélectivité (SI) de cet extrait est légèrement inférieur à 10. Quant à l'extrait éthanolique de la Région 1, bien qu'il ait conservé une activité intéressante pour la forme intracellulaire ($IC_{50} = 12,03 \pm 1,79 \mu\text{g/mL}$), son activité a légèrement diminué par rapport à son activité sur la forme libre du parasite. En outre, une cytotoxicité a été révélée pour cet extrait avec un SI de 6,4. Enfin, l'efficacité de l'extrait acétone de la Région 2 sur la forme amastigote intramacrophagique est très intéressante avec une IC_{50} qui se rapproche significativement ($p < 0,05$) de celle déterminée pour le contrôle positif (HePC). Cette activité a été considérablement améliorée en passant de la forme libre ($12,73 \pm 1,81 \mu\text{g/mL}$) à la forme intracellulaire du parasite ($1,56 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$). Une action immunomodulatrice de cet extrait sur les macrophages pourrait être à l'origine de l'action antileishmanienne observée [20]. De plus, aucune cytotoxicité n'a été constatée pour cet extrait étant donné que la valeur de SI est de 48. Cet indice est significativement supérieur à celui de la miltéfosine (HePC), le médicament de référence. Cet extrait n'endommage donc pas les cellules macrophagiques et son action est très sélective aux parasites. De ce fait, l'extrait acétone de l'armoise de la Région 2 pourrait être étudié pour son action antileishmanienne puissante contre le parasite *L. major*.

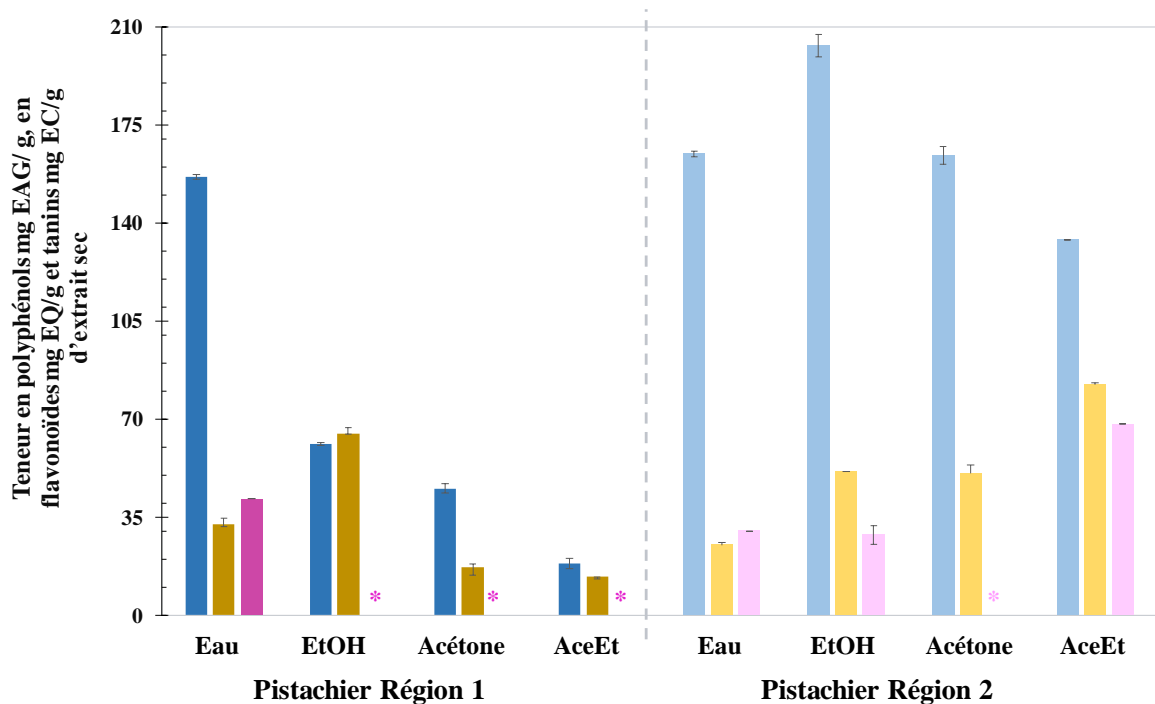
L'efficacité antileishmanienne des extraits de l'armoise herbe-blanche sur *L. major* a été prouvée auparavant pour l'extrait aqueux d'une plante récoltée au Maroc, avec une valeur de IC_{50} de $4 \mu\text{g/mL}$ sur la forme promastigote [21]. Toutefois, la toxicité n'a pas été évaluée dans cette étude. D'après plusieurs auteurs, l'artémisinine et ses dérivés sont à l'origine de l'activité antiparasitaire importante du genre armoise. L'activité *in vitro* de cette molécule a été démontrée sur toutes les formes du parasite *Leishmania major* notamment l'amastigote intracellulaire avec une IC_{50} de 3×10^{-5} M. De plus, aucune toxicité n'a été révélée sur les cellules hôtes [21]. L'efficacité de cette molécule a été validée ensuite par des travaux sur la

leishmaniose cutanée expérimentale prouvant que les injections intralésionnelles conduisaient à la cicatrisation de la plaie et la diminution de la charge parasitaire [21].

II.2.3. Pistachier lentisque

a) Teneur en différentes familles chimiques

La quantification des molécules bioactives dans les différents extraits préparés à partir du Pistachier lentisque récolté à Seliana (Région 1) et à Zaghouan (Région 2) est présentée sous forme d'histogramme dans la Fig. 2.6.



Moyenne ± écart-type (n=3) ; * : non déterminé

Figure 2.6 : Teneur en polyphénols totaux (■/■), en flavonoïdes (■/■) et en tanins condensés (■/■) des extraits d'eau, d'éthanol (EtOH), d'acétone et d'acétate d'éthyle (AcOEt) issus de la macération des feuilles de Pistachier lentisque (Pistachier) cueillies dans deux régions de la Tunisie : Seliana (Région 1) et Zaghouan (Région 2).

La teneur en polyphénols a été estimée entre $18,4 \pm 2,0$ à $203,2 \pm 4,1$ mg EAG/g d'extrait sec dans les deux régions confondues. Toutefois, les teneurs sont nettement supérieures dans les extraits de la Région 2 que dans ceux de la Région 1. Ceci indique que le Pistachier de la Région 2 contient une quantité nettement plus importante en polyphénols que le Pistachier de la Région 1.

D'autre part, l'abondance en polyphénols suivant les solvants utilisés peut-être classée par ordre décroissant :

- Région 1 : Eau > EtOH > Acétone > AcOEt.

- Région 2 : EtOH > Eau = Acétone > AcOEt.

Ce classement montre que les polyphénols présents dans le pistachier de la Région 1 sont extractibles de façon abondante par les solvants polaires, notamment l'eau, ce qui révèle leur caractère polaire. En revanche, les polyphénols du pistachier de la Région 2 sont aussi bien extractibles par les solvants polaires que par les solvants les moins polaires comme l'acétate d'éthyle, ce qui montre la diversité de structures présentes dans ces extraits.

Par ailleurs, les deux régions présentent des teneurs en flavonoïdes comparables pour les extraits obtenus avec les solvants polaires à savoir l'eau et l'EtOH. Ces teneurs ne dépassent pas les 60 mg EQ/ g d'extrait sec. Néanmoins, pour les solvants d'extraction moins polaires (acétone et AcOEt), les flavonoïdes sont extraits moins efficacement à partir du pistachier de la Région 1 par rapport au pistachier de la Région 2. Il en découle que le matériel végétal de la Région 1 contient plutôt des flavonoïdes à caractère polaire tandis que celui de la Région 2 contient plus de flavonoïdes à caractère apolaire.

De la même manière, en comparant les teneurs en tanins, les extraits du Pistachier de la Région 2 sont plus riches en tanins que ceux du Pistachier de la Région 1, notamment l'extrait d' AcOEt avec une teneur dépassant les 60 mg EC/ g d'extrait sec.

b) Activité antioxydante

Les résultats de l'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres des différents extraits préparés sont représentés dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Activité antioxydante des différents extraits préparés à partir du pistachier lentisque de deux régions (Région 1 et Région 2) définie par deux tests : DPPH et ABTS.

Echantillon		IC ₅₀ DPPH (mg/L)	IC ₅₀ ABTS (mg/L)
Pistachier Région 1	Eau	10,1 ± 0,7	12,7 ± 0,3
	EtOH	31,4 ± 0,9	34,3 ± 0,3
	Acétone	>100	84,5 ± 0,6
	AcOEt	>100	>100
Pistachier Région 2	Eau	7,6 ± 0,5	3,3 ± 0,2
	EtOH	6,0 ± 0,2	7,4 ± 0,2
	Acétone	8,1 ± 0,1	8,6 ± 0,1
	AcOEt	57,7 ± 3,4	6,4 ± 0,1
Vitamine C		3,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1

Moyenne ± écart-type (n = 3)

Les valeurs de concentrations d'inhibition à 50 % sont significativement différentes d'un solvant de macération à un autre et d'une région de récolte à une autre. En effet, ces valeurs varient de 3,3 ± 0,2 mg/L et à plus de 100 mg/L. Il est important de remarquer que l'activité antioxydante est d'autant plus intéressante que la polarité du solvant est grande. Par exemple,

pour le pistachier de la Région 1, la meilleure activité a été obtenue pour l'extrait du solvant le plus polaire, à savoir l'eau ($IC_{50} \sim 10$ mg/L), suivie de l'EtOH ($IC_{50} \sim 30$ mg/L), ensuite vient l'extrait d'acétone avec une activité faible ($IC_{50} > 100$ mg/L), révélée par le test ABTS, enfin, l'extrait le moins polaire d'acétate d'éthyle s'est avéré inactif pour le piégeage des radicaux libres (DPPH[•] et ABTS^{•+}). De plus, les activités obtenues pour les extraits du pistachier des deux régions montrent que celles-ci sont nettement plus intéressantes pour la Région 2 que pour la Région 1. En effet, l'efficacité de piégeage des radicaux libres est remarquable notamment pour l'extrait aqueux avec des concentrations d'inhibition comparables à celles obtenues pour l'antioxydant de synthèse qui est la vitamine C ($3,3 \pm 0,2$ mg/L vs $2,1 \pm 0,1$ mg/L). Cet extrait présente donc une activité antioxydante très importante. Une activité antioxydante très intéressante a également été démontrée pour les extraits d'EtOH et d'acétone de la Région 2 avec des IC_{50} de 6 et 8 mg/L, respectivement. Enfin, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité très forte dans le piégeage des radicaux libres d'ABTS^{•+} avec une IC_{50} de $6,4 \pm 0,1$ mg/L, alors que son activité était modérée pour les radicaux DPPH[•] ($57,7 \pm 3,4$ mg/L). Si nous nous référons aux résultats de la composition en molécules bioactives des extraits des deux régions, nous pouvons rappeler que leur abondance, notamment en composés phénoliques, présentait également une corrélation avec la polarité des solvants d'extraction et de la région de récolte. Ainsi, nous pouvons penser que les polyphénols seraient les composés responsables de l'activité de piégeage des radicaux libres des extraits du pistachier. L'efficacité antioxydante des extraits de la Région 2 est sans doute reliée à une plus grande teneur en polyphénols extractibles par les solvants les plus polaires. Comme évoqué précédemment, les polyphénols contribuent fortement à la génération de radicaux libres très stables capables de piéger les ROS présents en milieu.

Une activité antioxydante remarquable a également été rapportée pour les extraits de *Pistacia lentiscus* grecque [22]. Dans cette étude, la capacité à piéger les radicaux libres, similaire à celle des antioxydants synthétiques, a été attribuée aux constituants des extraits, particulièrement polaires, qui sont les polyphénols et les flavonoïdes [22]. Romani *et al.* ont mis en évidence la présence, dans les feuilles du pistachier, d'acides phénoliques comme l'acide gallique et l'acide ellagique et des flavonoïdes comme les dérivés de la myricétine [23]. La catéchine, qui est un flavonoïde-3-ol, a été également caractérisée notamment dans les extraits polaires de cette plante. En outre, l'existence de dérivés de galloyle (un tanin) isolés des feuilles du pistachier lentisque jouant un rôle très important dans l'inhibition des radicaux libres a aussi été démontrée [24].

Afin de valider cette relation établie entre la composition en molécules bioactives et l'activité antioxydante par piégeage des radicaux déjà avancée dans la littérature, nous avons effectué le

test de corrélation de Pearson. Les résultats démontrent, que pour le pistachier, il existe bel et bien une corrélation entre ces deux paramètres. Une corrélation négative significativement grande a été établie entre la teneur en tanins et la concentration inhibitrice à 50 % obtenues pour le test DPPH avec $R^2 = -0,737$ ($p < 0,05$). Ceci prouve que la présence abondante de cette famille chimique dans l'extrait diminue fortement la valeur d'IC_{50-AA} (obtenue par le test DPPH) et donc augmente d'une manière très significative l'efficacité antioxydante. Entre autres, les dérivés de galloyle seraient responsables de cette activité [24] qui serait préférentiellement mesurable avec le radical DPPH[•]. De plus, une corrélation linéaire négative significativement très forte a été démontrée entre la teneur des extraits en polyphénols et leur activité antioxydante aussi bien par le test ABTS que pour le test DPPH avec des coefficients de corrélation R^2 respectifs de - 0,902 et - 0,861 ($p < 0,05$). Les polyphénols contribueraient donc fortement à l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres ABTS^{•+} et DPPH[•]. A partir de ces résultats, nous pouvons aussi remarquer que la réactivité des polyphénols est comparable avec les deux radicaux utilisés DPPH[•] et ABTS^{•+}.

c) *Activité antileishmanienne et cytotoxicité*

Les résultats de l'étude de l'activité antileishmanienne ainsi que de la cytotoxicité des extraits de pistachier lentisque des deux régions sont répertoriées dans le Tableau 2.4. Nous remarquons qu'une variation très importante est observée entre les différents extraits d'une même région et également d'une région à une autre. En outre, pour un même extrait l'activité diffère d'une forme du parasite à une autre. Pour la forme amastigote axénique, seuls les extraits aqueux et d'acétate d'éthyle obtenus à partir de la récolte de la Région 1 ont présenté une efficacité antiparasitaire significative ($p < 0,05$) avec des IC₅₀ d'environ 3 µg/mL. Statistiquement, ces extraits ont démontré une activité équivalente à celle observée pour le contrôle positif (HePC). Par ailleurs, les extraits aqueux, EtOH et acétone de la Région 2 ont démontré des activités voisines ($p > 0,05$) et avec des IC₅₀ autour de 20 µg/mL. Néanmoins, leur inhibition est significativement différente de celle du contrôle positif révélant une activité faible. Aucune activité n'a été constatée contre la forme amastigote axénique pour les autres extraits (IC₅₀ > 20 µg/mL). Cependant, la tendance est complètement différente pour la forme intramacrophagique. En effet, les résultats indiquent que tous les extraits de pistachier de la Région 1 ne possèdent aucune activité sur la forme intramacrophagique, même les extraits ayant une activité très intéressante sur la forme libre du parasite. Ces extraits semblent perdre leur capacité antiparasitaire lorsque le parasite est internalisé par le macrophage. Selon Rycker et *al.*, des résultats similaires peuvent être observés lorsqu'une molécule n'est pas capable de franchir les barrières cellulaires pour atteindre le parasite à l'intérieur de la vacuole parasitophore. En effet, la molécule active doit traverser trois barrières biologiques et résister à différentes conditions de pH (neutre et acide) [25].

Tableau 2.4 : Activité antileishmanienne des extraits de pistachier lentisque de deux régions (Région 1 et Région 2) sur les formes amastigotes axénique et amastigote intramacrophagique du *Leishmania major* et leur toxicité sur cellules Raw264.7.

Echantillon	IC ₅₀ amastigote (µg/mL) ou µM		CC ₅₀ (µg/mL)	SI *	
	Axénique	Intramacrophagique			
Pistachier Région 1	Eau	3,15 ± 0,25 ¹	28,30 ± 1,78	> 50	>1,76
	EtOH	50,51 ± 14,69	22,34 ± 8,44	> 100	4,47 ¹
	Acétone	> 100	> 100	> 100	> 1
	AcOEt	2,66 ± 0,73 ¹	29,79 ± 1,63	68,50 ± 4,12	3 ¹
Pistachier Région 2	Eau	14,66 ± 5,16 ²	16,94 ± 2,83 ³	78,15 ± 3,28	4,61 ¹
	EtOH	19,04 ± 5,49 ²	7,27 ± 0,32 ²	75,20 ± 6,50	10,34 ¹
	Acétone	23,02 ± 3,32 ²	1,56 ± 0,55 ¹	66,20 ± 4,12	42,43 ³
	AcOEt	>100	>100	>100	>1
HePC		2,74 ± 0,34 ¹	1,98 ± 0,56 ^{1,2}	62,12 ± 4,32	31,4 ²

Moyenne ± Ecart-type (n = 6). L'analyse statistique a été réalisée par One-Way-ANOVA avec le post-test de Duncan avec un niveau de significativité $p < 0,05$ pour comparer les moyennes par colonne. Dans la même colonne, les moyennes avec différents chiffres en exposant (^{1,2,3,4}) sont significativement différentes. Seules les moyennes des extraits actifs (IC₅₀ > 20 µg/mL) ont été comparées. Pour les toxicités des extraits, le test One-Way-Anova a été appliqué uniquement sur les indices de sélectivité (*SI).

(-) : extrait dont l'activité n'a pas pu être déterminée à cause de son insolubilité dans le milieu de culture.

HePC : miltéfosine, contrôle positif.

Par ailleurs, les extraits aqueux, EtOH et acétone de la Région 2 ont présenté la meilleure efficacité antileishmanienne sur le parasite internalisé. L'extrait d'acétone est le plus efficace avec une IC₅₀ de 1,56 ± 0,55 µg/mL, encore plus intéressante que celle obtenue pour la miléfosine (1,98 ± 0,56 µg/mL). De plus, cette activité très intéressante est consolidée par une cytotoxicité minimale sur les cellules macrophagiques. En effet, l'indice de sélectivité (~ 43) révèle que l'action de ces extraits est sélective aux parasites et n'endommage pas les cellules hôtes. Cet indice de sélectivité de l'extrait acétone dépasse significativement celui de la miltéfosine. Il est à noter que ce même extrait n'a pas présenté d'activité notable sur la forme amastigote axénique. Ceci montre son action indirecte sur les macrophages infectés pour inhiber la prolifération parasitaire [20]. De la même manière, l'extrait éthanolique du pistachier de la Région 2 présente une activité significativement plus importante sur la forme intramacrophagique que sur la forme libre en augmentant en moyenne de 2,6 fois. En outre, cette efficacité n'est pas significativement différente de celle de la miltéfosine. Enfin, l'extrait aqueux du pistachier de la Région 2 a également présenté une activité modérée sur la forme intramacrophagique, activité comparable à celle notée sur la forme amastigote axénique. Néanmoins, la toxicité observée sur les cellules macrophagiques prouve que son action n'est pas sélective aux parasites.

Afin de comprendre l'action préférentielle des extraits du pistachier de la Région 2 sur la forme intramacrophagique, nous nous sommes penchés sur la composition de ces extraits. En effet, d'après le paragraphe II.2.3(a), ces extraits sont particulièrement riches en molécules bioactives notamment en polyphénols. Il a été déjà démontré que l'acide gallique et l'acide ellagique figurent parmi les polyphénols abondamment présents dans cette plante [23,26]. Une étude récente s'est intéressée au pouvoir antileishmanien et à la cytotoxicité de ces deux acides phénoliques. Une inhibition des promastigotes du *Leishmania major* a été observée avec des IC₅₀ de 16,4 et 9,8 µg/mL respectivement pour l'acide gallique et l'acide ellagique [27]. En outre, ces deux composés ont démontré leur capacité à diminuer de manière significative l'infection et le pouvoir infectieux des macrophages infectés par *L. major* (avec des valeurs de IC₅₀ de 5,0 et 0,9 µg / mL, respectivement pour l'acide gallique et l'acide ellagique). Pour ces deux composés l'indice de sélectivité était supérieur à 20 [27]. Fait intéressant, l'augmentation de la capacité phagocytaire, du volume lysosomal, de la libération de nitrites et du calcium intracellulaire dans les macrophages induites par ces acides phénoliques ont démontré leur activité d'immunomodulation [27]. Il semble donc que ces extraits actifs agissent par action immunomodulatrice sur les cellules de macrophages infectés par *L. major*.

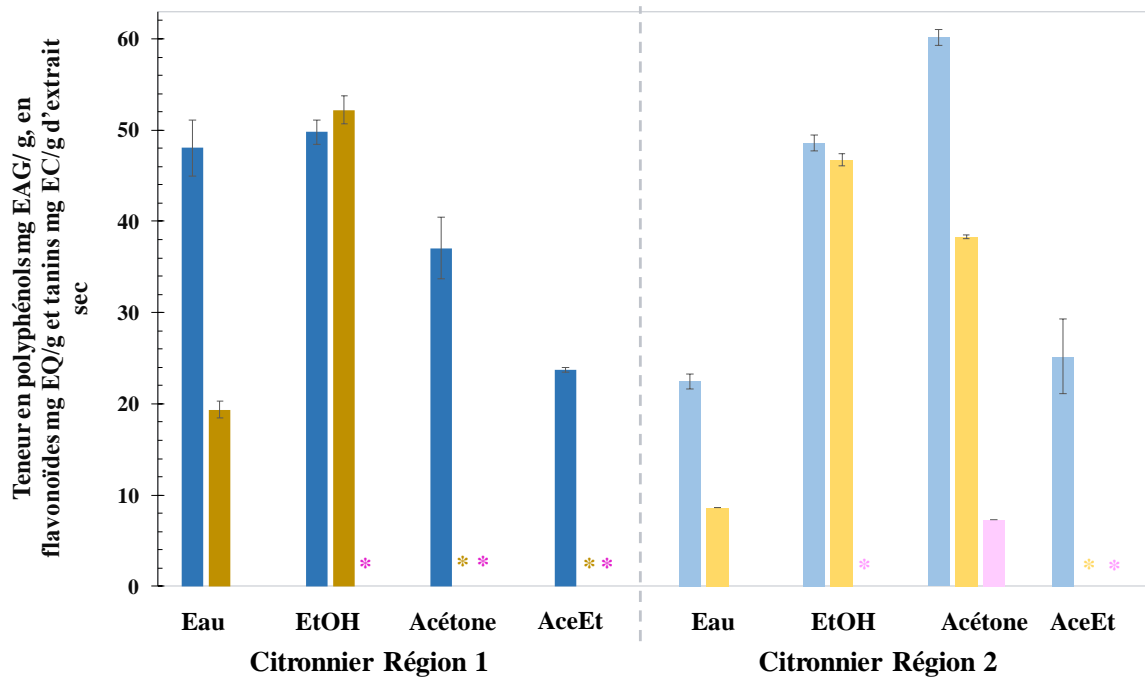
Il est important de souligner que d'après la littérature, il est toujours plus intéressant qu'un composé possède une activité sur la forme intracellulaire que sur la forme libre. Cependant, les composés qui exercent un effet uniquement sur la forme d'amastigote libre peuvent présenter un intérêt, car une optimisation chimique supplémentaire peut permettre à ces petites molécules d'atteindre la vacuole et de présenter leur effet antiparasitaire. D'autres stratégies d'administration alternatives, telles que l'encapsulation et la vectorisation, pourraient également être prometteuses pour ces composés [19].

II.2.4. Citronnier

a) Teneur en différentes familles chimiques

La teneur des extraits des feuilles de citronnier en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés est représentée par les histogrammes de la Fig. 2.7 respectivement pour les récoltes des régions 1 (Béja) et 2 (Menzel Bouzelfa).

Comme pour les deux précédentes plantes, les teneurs sont différemment distribuées d'un solvant d'extraction à un autre et d'une région à une autre. Toutefois, la teneur en tanins est très faible voire impossible à déterminer pour la plupart des extraits en raison de la difficulté de solubilisation de ces derniers dans le milieu réactionnel. A notre connaissance, la composition en tanins condensés des extraits issus du citronnier n'a jamais été reportée auparavant.



Moyenne \pm écart-type (n=3) ; * : non déterminé

Figure 2.7 : Teneur en polyphénols totaux (■/■), en flavonoïdes (■/■) et en tanins condensés (■/■) des extraits d'eau, d'éthanol (EtOH), d'acétone et d'acétate d'éthyle (AcOEt) issus de la macération des feuilles de citronnier cueillies dans deux régions de la Tunisie : Béja (Région 1) et Menzel Bouzelfa (Région 2).

Les polyphénols totaux ont été détectés dans tous les extraits préparés à partir de la récolte des deux régions. La teneur de ces extraits fluctue entre $22,5 \pm 0,8$ et $60,2 \pm 0,9$ mg EAG/g d'extrait sec. L'efficacité des solvants d'extraction pour la solubilisation des polyphénols est région dépendante. En effet, l'EtOH et l'eau ont la meilleure efficacité pour la récolte dans la Région 1 alors que l'acétone présente la meilleure teneur d'extraction des polyphénols pour la Région 2. A partir de ce constat, nous pouvons déduire que les polyphénols abondants dans le matériel végétal de la première région de récolte sont plutôt à caractère polaire, tandis qu'ils sont à polarité moyenne pour le matériel végétal de la Région 2. Le classement des solvants qui extraient efficacement les polyphénols par ordre décroissant sont :

- Région 1 : Eau = EtOH > AcOEt > Acétone.
- Région 2 : Acétone > EtOH > AcOEt > Eau.

La teneur des différents extraits en flavonoïdes montre que la composition dépend très fortement de la nature du solvant et de la région de récolte des feuilles du citronnier. Par ailleurs, le solvant d'extraction le plus efficace est l'EtOH pour les deux régions de récolte avec des teneurs très proches, aux alentours de 50 mg EQ/g d'extrait sec. Les flavonoïdes du *Citrus limon* ont toujours attiré l'attention des chercheurs puisqu'il s'agit de composés responsables

de la bioactivité de cette plante notamment dans la prévention des maladies chroniques majeures comme les maladies cardiovasculaires [28,29]. Les flavonoïdes très largement répandus dans l'espèce du *Citrus* sont la naringénine et l'héspérétine ainsi que leur formes glycosides comme la naringine, la néohéspéridine (néohéspéridosides), la narirutine et l'hépidine (rutinodides) [28,29]. D'autres flavones polyméthoxylés sont présentes en quantité moins importantes mais sont dotées d'activités biologiques très intéressantes comme la nobilétine et la tangéretine [30]. La nobilétine possède une capacité inhibitrice puissante sur l'adénosine monophodiestérase cyclique [31] ainsi qu'une activité antifongique contre le *Deutériophome tracheiphila* [32]. Quant à la tangéretine, elle possède une activité anti-proliférative contre les cellules leucémiques promyélocytaires HL-60 [33,34]. D'une manière plus générale, les propriétés biologiques des flavonoïdes issus du genre *Citrus* sont largement répertoriées dans la bibliographie et incluent les activités anticancéreuse, antivirale, anti-inflammatoire, ainsi que la capacité de réduire la fragilité capillaire et de restreindre l'agrégation des plaquettes humaines [35,36]. Les extraits éthanoliques des zestes de différents fruits du *Citrus* ont démontré des effets anticancérogènes, antiprolifératifs, co-chimiothérapeutiques et estrogéniques. En effet, la tangerétine, la nobilétine, l'héspérétine, l'hépidine et la naringine sont des exemples d'agents chimiothérapeutiques [37]. Ces flavonoïdes ont prouvé une activité inhibitrice contre la prolifération de certaines cellules cancéreuses à travers divers mécanismes d'action. En outre, ces flavonoïdes possèdent des effets très prometteurs en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques classiques contre divers cancers [37].

b) Activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante (Tableau 2.5) montre que malgré les différentes compositions en molécules bioactives des extraits (Fig. 2.7), leur capacité antioxydante est similaire, que ce soit d'un solvant d'extraction à un autre ou d'une région de cueillette à une autre. Cette activité s'avère modérée (pour les extraits aqueux de la Région 1) à très faible (pour les extraits éthanoliques des deux régions), voire absente pour la plupart des extraits qui n'ont démontré aucune activité significative de piégeage des radicaux libres (DPPH[•] et ABTS^{•+}) puisque leur IC₅₀ dépasse les 100 mg/L.

L'application de la corrélation de Pearson entre la teneur en polyphénols et la capacité antioxydante des différents extraits de citronnier a démontré qu'il n'existe pas de relation entre ces deux paramètres et qu'aucune corrélation ne pouvait donc être établie ($R^2 = 0,413$ pour le test DPPH avec $p < 0,05$). Ce résultat est en accord avec certaines études antérieures [38,39], mais est en désaccord avec celle d'Abeyasinghe *et al.* [40].

Tableau 2.5 : Activité antioxydante des différents extraits préparés à partir du citronnier des deux régions (Région 1 et Région 2) définie par deux tests : DPPH et ABTS.

Echantillon		IC ₅₀ DPPH (mg/L)	IC ₅₀ ABTS (mg/L)
Citronnier Région 1	Eau	46,1 ± 0,7	> 100
	EtOH	> 100	79,1 ± 2,1
	Acétone	> 100	> 100
	AcOEt	> 100	> 100
Citronnier Région 2	Eau	> 100	> 100
	EtOH	> 100	71,9 ± 2,5
	Acétone	> 100	> 100
	AcOEt	> 100	> 100
Vitamine C		3,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1

Moyenne ± écart-type (n = 3)

La relation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols dépend de plusieurs facteurs comme les groupements fonctionnels des molécules en question, les interactions synergiques entre elles ainsi que les conditions opératoires des essais réalisés. De plus, il est important de noter que pour la plante du citronnier, le réactif Folin-Ciocalteu semble ne pas être assez spécifique aux structures des polyphénols puisqu'il peut également réagir avec la vitamine C et les sucres présents [39]. En outre, vu la grande diversité de structures chimiques des polyphénols et la différence de réactivité induite, un échantillon pourrait être riche en polyphénols mais sa capacité antioxydante rester faible [38].

Par ailleurs, la corrélation de Pearson a montré une corrélation négative significativement importante entre la prédominance de la composition de l'extrait en flavonoïdes et son activité antioxydante par test DPPH, avec un coefficient R² de -0,783 (p < 0,05). En effet, ceci démontre que la présence des flavonoïdes est fortement liée à l'effet antioxydant observé. Ce résultat est en accord avec celui de Mohammadian et *al.* qui ont pu démontrer une corrélation linéaire significative (avec un R² de -0,973, p < 0,05) entre les flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante pour toutes les récoltes de *Citrus limon* effectuée [39]. Structuellement, les flavonoïdes possèdent des groupements phénoliques qui servent comme source d'atomes d'hydrogène labiles facilement disponibles produisant ainsi des radicaux très stables (-O[•]). La nature chimique des flavonoïdes dépend de la classe structurelle, du degré d'hydroxylation, d'autres substitutions et conjugaisons et du degré de polymérisation [41]. Plusieurs études ont pu mettre en évidence la relation structure/activité antioxydante des flavonoïdes pour les extraits d'agrumes. Les données retrouvées suggèrent que la glycosylation, la O-méthylation, la O-glycosylation jouent un rôle majeur dans la détermination du pouvoir antioxydant des flavonoïdes dans le genre *Citrus* [42]. En effet, l'activité antioxydante est défavorisée par la

glycosylation tandis qu'elle est favorisée par l'hydroxylation et par la présence d'une double liaison C₂ – C₃ en conjonction avec une fonction 4-oxo [43]. Ceci pourrait nous donner un aperçu sur la structure des flavonoïdes présents dans les extraits que nous avons préparés. Par ailleurs, l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols varient de manière significative avec le degré de maturité de la matière végétale ainsi que le moment de la récolte. En effet, il a été démontré que l'activité antioxydante mesurée par DPPH et ABTS se trouve à son niveau minimal pour une récolte pendant le mois de février pour cette espèce [44], ce qui expliquerait l'activité antioxydante faible trouvée pour nos extraits, étant donné que notre récolte a été réalisée entre janvier et février. Il serait intéressant ultérieurement de suivre la teneur en polyphénols et flavonoïdes ainsi que l'activité antioxydante des extraits de citronnier pour des récoltes réalisées sur le même site mais à des mois différents de l'année.

c) Activité antileishmanienne et cytotoxicité

L'activité antileishmanienne et la cytotoxicité des extraits de feuilles de citronnier sont répertoriés dans le Tableau 2.6. A notre connaissance, il s'agit de la première étude qui évalue le pouvoir de la plante du *Citrus limon* sur les parasites *Leishmania*.

Tableau 2.6 : Activité antileishmanienne des extraits de citronnier de deux régions (Région 1 et Région 2) sur la forme amastigote axénique et amastigote intramacrophagique du *Leishmania major* et leur toxicité sur cellules Raw264.7.

Echantillon	IC ₅₀ amastigote (µg/mL) ou µM		CC ₅₀ (µg/mL)	SI*	
	Axénique	Intramacrophagique			
Citronnier Région 1	Eau	>100	>100	>100	>1
	EtOH	>100	29,90 ± 0,87 ⁵	69,78 ± 3,89	2,33 ¹
	Acétone	27,11 ± 7,44	3,84 ± 1,20 ¹	30,42 ± 1,75	7,92 ³
	AcOEt	2,71 ± 0,34 ¹	50,24 ± 2,40	75,25 ± 2,25	1,5 ¹
Citronnier Région 2	Eau	13,19 ± 4,17 ²	>100	>100	>1
	EtOH	9,63 ± 0,62 ²	6,74 ± 1,26 ²	14,2 ± 1,20	2,1 ¹
	Acétone	62,44 ± 18,72	11,84 ± 0,49 ³	70,89 ± 4,50	5,99 ^{2,3}
	AcOEt	12,31 ± 2,20 ²	14,77 ± 2,69 ⁴	76,32 ± 3,47	5,17 ²
HePC		2,74 ± 0,34 ¹	1,98 ± 0,56 ¹	62,12 ± 4,32	31,4 ⁴

Moyenne ± écart-type (n = 6). L'analyse statistique a été réalisée par One-Way-ANOVA avec le post-test Duncan avec un niveau de significativité p < 0,05 pour comparer les moyennes par colonne. Dans la même colonne, les moyennes avec différents chiffres en exposant (^{1,2,3,4}) sont significativement différentes. Seules les moyennes des extraits actifs (IC₅₀ > 20 µg/mL) ont été comparées. Pour les toxicités des extraits, le test One-Way-ANOVA a été appliqué uniquement sur les indices de sélectivité (*SI).

(-) : extrait dont l'activité n'a pas pu être déterminée à cause de son insolubilité dans le milieu de culture.

HePC : miltéfosine, contrôle positif.

Pour *Citrus limon* également, l'activité des extraits est considérablement différente d'un solvant d'extraction à un autre et d'une région de récolte à une autre. En outre, une différence d'activité est constatée entre la forme amastigote libre et la forme intracellulaire. La meilleure efficacité sur la forme amastigote axénique des *L. major* a été obtenue avec l'extrait d' AcOEt du citronnier de la Région 1, extrait ayant montré une activité similaire à celle observée pour le contrôle positif. Toutefois, cet extrait perd son activité sur la forme amastigote intramacrophagique. Ceci pourrait être lié à sa capacité limitée à franchir les barrières cellulaires. Inversement, l'extrait acétone du citronnier de la Région 1 ne présente aucune activité inhibitrice sur la forme amastigote libre du *L. major* mais exerce une activité très intéressante ($3,84 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$) sur la forme intracellulaire.

Cette efficacité est statistiquement similaire ($p > 0,05$) à celle observée par la miltéfosine. Cependant, une faible toxicité sur les cellules macrophagiques a été révélée avec un indice de sélectivité de ~ 8 . Tous les autres extraits de la Région 1 n'ont montré aucune activité antiparasitaire aussi bien sur la forme axénique que sur la forme intramacrophagique du parasite.

D'autre part, les extraits aqueux, EtOH et AcOEt de la Région 2 ont démontré une efficacité pour la forme amastigote libre, néanmoins, significativement plus faible que celle observée pour la miltéfosine. En outre, le pouvoir antiparasitaire des extraits aqueux et d'acétone est différent pour la forme amastigote intracellulaire. Pour le premier, une perte d'efficacité antileishmanienne est observée par rapport à l'amastigote axénique, ce qui traduirait la difficulté du passage de cet extrait à travers les différentes barrières biologiques [19]. Inversement, pour l'extrait acétone, l'action antiparasitaire a été améliorée lorsque le parasite a été internalisé par la cellule hôte. Ceci impliquerait que cet extrait agit sur les parasites *via* l'activation des macrophages [20]. Enfin, l'extrait éthanolique a démontré une légère amélioration d'efficacité antiparasitaire de la forme libre à la forme intracellulaire alors que l'activité de l'extrait d' AcOEt est similaire pour les deux formes du parasite. Cependant, tous les extraits de citronnier présentent un indice de sélectivité très faible, notamment l'extrait éthanolique ($SI \ll 10$). On en déduit que l'action antiparasitaire est altérée par la destruction des cellules hôtes.

Les flavonoïdes potentiellement présents dans ces extraits pourraient être à l'origine de cette efficacité. En effet, des études récentes se sont intéressées à l'activité de la naringénine pour le traitement de la leishmaniose viscérale (LV) [45]. L'analyse *in vitro* a démontré que cette molécule possède un effet inhibiteur significatif sur le *L. donovani* et qu'elle est capable d'inhiber les promastigotes à une certaine phase du cycle cellulaire. L'étude a été ensuite poursuivie par une analyse de l'efficacité de la naringénine sur le modèle animal de la LV sur

des souris cosanguines BALB/c infectées par *L. donovani* et traitées pendant 14 jours. Il a été démontré que la charge parasitaire a été réduite très significativement par rapport à celle des souris infectées non traitées. De plus, le traitement à la naringénine n'a pas provoqué de toxicité puisqu'aucune altération des enzymes hépatiques et rénales n'a été constatée et l'architecture de ces organes n'a pas subi de modification histologique. Le mécanisme de la naringénine repose sur la production des ROS et des NO^{*} activant ainsi l'expression de NFκB et d'iNOS, ce qui induit la réduction de la charge parasitaire [45]. D'autres études ont également démontré le potentiel antiparasitaire de la nobilétine, un autre flavonoïde éventuellement présent dans le citronnier, contre le parasite *Trypanosoma brucei* responsable des trypanosomiasés [46].

Le test de corrélation de Pearson sur l'ensemble des résultats obtenus pour la plante du citronnier a montré une très forte corrélation positive d'une part entre la capacité antioxydante par piégeage des radicaux (DPPH) et l'activité antileishmanienne sur la forme amastigote axénique avec un R² de 0,996, et d'autre part, entre l'activité antioxydante (par test DPPH) et l'activité sur la forme amastigote intramacrophagique avec un R² de 0,990. Il en découle que le mécanisme d'action antiparasitaire, déjà avancée pour la naringénine [45], reposant sur la génération des radicaux libres, est validée pour les extraits de citronnier pour notre étude.

II.3. Conclusion

Pour toutes les plantes étudiées, les extraits ont démontré une efficacité antileishmanienne qui dépend fortement des solvants de macération et de la région de récolte de la plante. Certains extraits ont montré une efficacité remarquable aussi bien sur la forme amastigote axénique que sur la forme amastigote intramacrophagique (tel que l'extrait aqueux d'armoise de la Région 2). D'autres possèdent une activité considérable sur le parasite libre mais n'inhibent pas la forme internalisée du *L. major* (tels que les extraits aqueux et AcOEt du pistachier de la Région 1). Ceci est probablement dû aux molécules actives qui se trouvent incapables de franchir les barrières cellulaires et de résister aux différentes conditions rencontrées, notamment de pH. Inversement, certains extraits n'ont aucune activité sur les amastigotes axéniques de *L. major* mais exercent une inhibition sur la forme internalisée du parasite (extrait acétone du citronnier de la Région 1). Ces extraits possèderaient une action immunomodulatrice sur les macrophages infectés, qui serait à l'origine de leur action antileishmanienne. D'après la littérature, ce type de composés est privilégié. En outre, il est important que cette activité soit consolidée par une bonne sélectivité vis-à-vis des parasites induisant une toxicité minimale aux cellules hôtes.

Section III. Choix de l'extrait à encapsuler et sa caractérisation par SPME/GC-MS

Pour les étapes suivantes de ce projet de thèse, nous avons sélectionné un seul extrait. Pour ce faire, nous avons rassemblé toutes les données recueillies des tests antileishmaniens et de cytotoxicité des différentes plantes et différentes récoltes sur la forme amastigote intramacrophagique (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 : Récapitulatif des résultats de l'activité antileishmanienne et cytotoxicité des huiles essentielles (EssOil) et extraits des plantes récoltées.

Activité sur amastigotes intramacrophagique	EssOil	Extraits				
		Eau	EtOH	Acétone	AcOEt	
Armoise	Région 1	+	–	+	–	–
	Région 2	–	++	–	++	–
Citronnier	Région 1	++	–	–	++	–
	Région 2	+	–	++	+	+
Pistachier	Région 1	+	–	–	–	–
	Région 2	–	+	++	++	–

Armoise : *Artemisia herba-alba* ; Citronnier : *Citrus limon* ; Pistachier : *Pistacia lentiscus*.
EtOH : éthanol ; AcOEt : acétate d'éthyle.

(–) : IC₅₀ > 20 µg/mL : inactif ;

(+) : 10 µg/mL < IC₅₀ < 20 µg/mL : actif ;

(++) : IC₅₀ < 10 µg/mL : très actif.

(+ ou ++): couleur verte : pas toxique aux macrophages (SI > 10)

(+ ou ++): couleur orange : peu toxique aux macrophages (5 < SI < 10)

(+ ou ++): couleur rouge : très toxique aux macrophages (SI < 5)

Nos critères de choix étaient les suivants : le rendement de la plante, l'activité antileishmanienne notamment sur la forme intramacrophagique ainsi que l'originalité du travail par rapport aux études de la littérature.

Comme déjà relevé, les travaux sur l'activité antileishmanienne de la plante d'armoise, sont nombreux [47–49]. En effet, depuis 1993, des chercheurs de l'université du Michigan ont réalisé des fractionnements afin d'identifier la molécule responsable de l'activité antiparasitaire : l'artémisinine. Cette molécule est actuellement utilisée en tant qu'agent antipaludique [50]. Pour leur part, les travaux portant sur l'activité antileishmanienne du pistachier lentisque sont moins fréquents [51]. Néanmoins, son huile essentielle s'est avérée

cytotoxique et son rendement a été extrêmement faible. Seuls les extraits (d'acétone et d'AcOEt) de la Région 2 (Zaghouan) ont présenté une activité antileishmanienne intéressante avec une cytotoxicité faible. Ces raisons nous ont amené à écarter cette plante de notre étude. Enfin, pour le citronnier, à notre connaissance, aucune étude sur l'activité antiparasitaire de cette plante, notamment des extraits ou l'huile essentielle issus des feuilles, n'a été réalisée. Nos résultats démontrent une activité antileishmanienne très intéressante aussi bien de l'huile essentielle que des extraits (avec une cytotoxicité variable d'un extrait à un autre). Cette plante remplit donc nos critères de choix.

Afin de choisir l'extrait de citronnier adéquat, les différents rendements ont été comparés. En effet, ce paramètre est très important afin de pouvoir réaliser les essais de formulation. Le rendement d'extraction de l'huile essentielle active (Région 1) est aux alentours de 0,5 % tandis que celui des extraits est nettement supérieur et dépasse les 5 %. Notre choix s'est donc porté sur les extraits organiques. Les activités antileishmanienne (sur la forme intramacrophagique) les plus intéressantes ont été déterminées pour l'extrait d'acétone de la Région 1 et l'extrait éthanolique de la Région 2 avec des IC_{50} respectives de $3,84 \pm 1,20$ et de $6,74 \pm 1,26$ $\mu\text{g/mL}$. Cependant, la cytotoxicité est significativement plus importante pour l'extrait éthanolique de la Région 2 (SI ~ 2). L'extrait d'acétone de la Région 1 a donc été sélectionné pour réaliser l'étude d'encapsulation dans une NE. Malgré une légère cytotoxicité constatée (SI ~ 8), l'encapsulation de cet extrait pourrait être une stratégie prometteuse qui permettrait éventuellement de diminuer sa toxicité et donc d'améliorer son efficacité antiparasitaire.

L'étape suivante a consisté à caractériser plus finement les molécules volatiles de cet extrait par GC-MS afin d'identifier la ou les molécules potentiellement responsables de l'activité antiparasitaire. Etant donnée la complexité de la composition des extraits organiques, nous avons choisi d'ajouter une étape de microextraction par couplage de SPME à l'appareillage analytique, dans notre cas la GC-MS, afin de préconcentrer les molécules et améliorer leur limite de détection. Il est important de noter que cette analyse préliminaire de la composition n'a été réalisée qu'une seule fois. En outre, en l'absence d'une analyse complémentaire à la GC-FID, la quantification des composés détectés n'a pas été possible.

Les résultats sont représentés dans le chromatogramme de la Fig. 2.8.

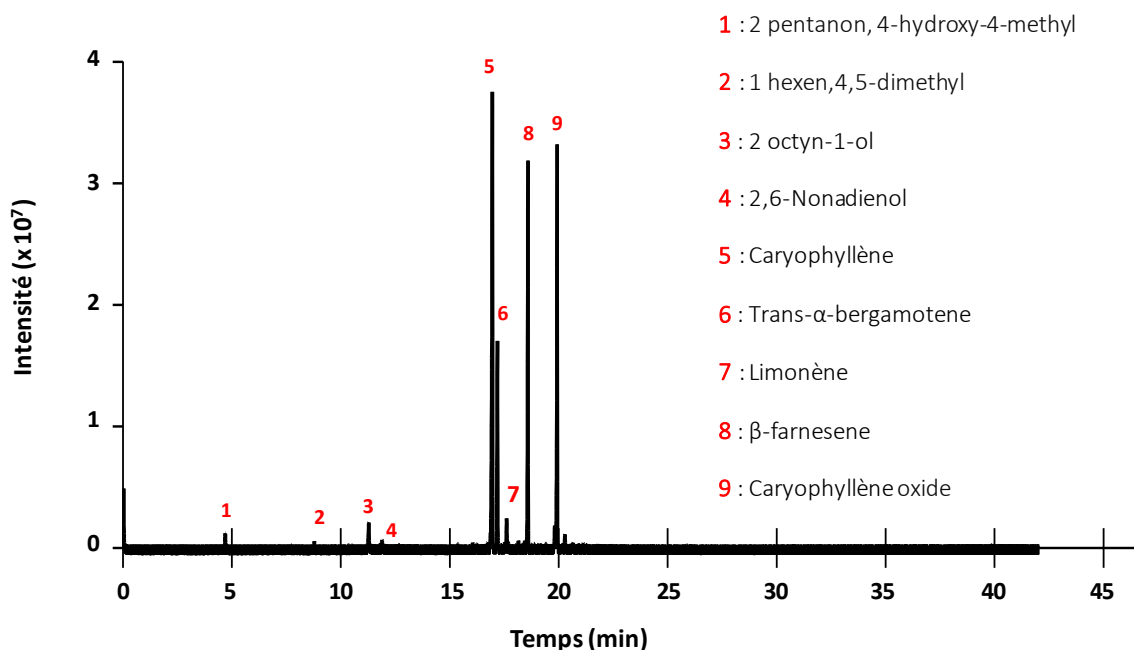


Figure 2.8 : Chromatogramme obtenu par analyse SPME/ GM-MS de l'extrait acétone des feuilles de citronnier de la Région 1.

L'extraction par SPME nous a permis de caractériser neuf composés différents dans l'extrait de citronnier de la Région 1. En comparaison avec la composition de l'huile essentielle issue de la même plante (Publication 1, Table 3), nous retrouvons 3 composés communs qui sont : le limonène, le caryophyllène et l' α -bergamotene. Comme démontré dans la Publication 1, le limonène, présent majoritairement dans l'huile essentielle du citronnier de la Région 2, pourrait être à l'origine de son activité antileishmanienne modérée. En effet, le limonène a une activité intéressante sur la forme intracellulaire du *Leishmania amazonensis* [52]. Le caryophyllène, ainsi que son dérivé caryophyllène oxide, l' α -bergamotene et le farnesene sont des sesquiterpènes qui entrent dans la composition de l'huile de Copaiba [53] obtenue par distillation de la résine récoltée par incision du tronc d'un arbre d'Amazonie : le copayer (*Copaifera officinalis*) [54]. L'huile de Copaiba a été très largement décrite en littérature pour son action antiparasitaire, notamment contre *leishmania amazonensis* qui cause la leishmaniose cutanée (LC) du nouveau monde [53]. Son efficacité a été prouvée d'une part sur la forme promastigote et sur la forme intramacrophagique avec des IC₅₀ respectives de 15 μ g/mL et 20 μ g/mL [55]. Elle a été également montrée sur le modèle de LC expérimentale en traitement oral en révélant une diminution significative de la taille moyenne de lésion ($1,1 \pm 0,4$ mm²) en comparaison avec un groupe contrôle non traité ($4,4 \pm 1,3$ mm²) [56]. Cette efficacité ne dépend pas de la molécule majoritaire, le β -caryophyllène [57], mais de la synergie entre les différents sesquiterpènes (caryophyllène, caryophyllène oxide, bergamotène et farnesène ...) et probablement avec les diterpènes présents (kauranes, clérodanes et labdanes) [58,59]. Ces

conclusions ont été tirées à la suite du fractionnement de l'huile de Copaiba qui a conduit à la perte de son activité biologique [60]. Cependant, le test de l'activité antileishmanienne du β -caryophyllène sur les souches de l'ancien monde, *L. major* et *L. infantum*, a prouvé une efficacité très intéressante avec une IC_{50} de $1,33 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ et $1,06 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$, respectivement. Les indices de sélectivité, aux alentours de 20, révèlent une action sélective du β -caryophyllène aux parasites et une toxicité minimale sur les cellules du macrophage [61].

L'action de l'extrait pourrait donc aussi bien provenir de l'activité antileishmanienne du caryophyllène sur les parasites *L. major* que d'une synergie entre les différents sesquiterpènes présents.

Etant donné que nous sommes passés par une étape de microextraction (par SPME), la composition obtenue de l'extrait n'est pas exhaustive. Seules les molécules qui possèdent une affinité pour la fibre utilisée (PDMS) dans les conditions de l'extraction ($T = 82 \text{ }^\circ\text{C}$, pendant 1h) ont été isolées. Il serait donc judicieux d'approfondir la caractérisation de cet extrait afin d'identifier la ou les molécules responsables de l'activité antileishmanienne contre les *L. major* par : (i) répétition de l'analyse SPME/GC-MS déjà réalisée dans cette étude, (ii) optimisation des conditions d'extraction par SPME, (iii) quantification par une étude complémentaire à la GC-FID, (iv) étude approfondie de la littérature portant sur les composés identifiés potentiellement actifs, (v) Reconstitution artificielle du mélange de molécules actives bioc et analyse de l'activité antileishmanienne en parallèle. En perspective, la caractérisation complète de l'extrait rend possible l'étude *ex-vivo* de la diffusion de l'extrait (encapsulé ou non) à travers la peau.

Il existe une autre alternative qui consiste à la réalisation dans un premier temps d'un fractionnement bio-guidé de l'extrait, ensuite la caractérisation de la fraction ou la molécule ayant l'activité la plus intéressante.

Conclusion

Les extraits ainsi que les huiles essentielles des trois plantes choisies ont démontré un potentiel antileishmanien important. Cette activité a significativement varié entre les extraits et l'huile essentielle d'une même plante. Elle est donc fortement reliée à la technique d'extraction appliquée. Une différence d'activité a été également constatée pour les extraits et l'huile essentielle d'une même plante, d'une région de récolte à une autre. Ceci est dû à la différence de composition induite par les différentes conditions géographiques et climatiques que subit la plante. D'autre part, nous avons constaté une variation considérable d'activité d'un solvant d'extraction à un autre. En effet, cette différence est associée aux caractéristiques, notamment la polarité des solvants, qui jouent un rôle très important dans la sélection des molécules bioactives extractibles à partir d'un matériel végétal donné. Une différence notable a été également observée entre l'activité d'un extrait organique ou huile essentielle sur la forme amastigote axénique et son activité sur la forme amastigote intramacrophagique. Une action favorisée plutôt sur la forme libre indique que les composés actifs peuvent difficilement franchir les barrières cellulaires pour atteindre les parasites lorsqu'ils sont internalisés au sein du macrophage. Inversement, lorsque l'action sur la forme intramacrophagique est favorisée, les composés actifs agiraient par activation des cellules hôtes afin d'inhiber les parasites. Généralement, les extraits qui sont actifs sur la forme amastigote intracellulaire sont largement privilégiés par rapport à ceux actifs sur la forme amastigote libre car ce modèle *in vitro* présente une meilleure prédictibilité.

En raison de l'originalité des résultats obtenus pour le *Citrus limon*, nous avons choisi de poursuivre notre étude avec l'extrait acétone du citronnier de la Région 1. La caractérisation de cet extrait a montré que celui-ci contient des molécules ayant un pouvoir antiparasitaire, à savoir le caryophyllène, le caryophyllène oxide, le bergamotène et le farnésène, dont l'action est probablement le résultat d'une synergie entre elles. Une caractérisation plus approfondie ou un fractionnement bioguidé seront nécessaires, afin de conclure quant aux molécules responsables de cette activité. L'encapsulation de l'extrait pourrait jouer un rôle dans l'amélioration de l'efficacité de celui-ci contre *L. major* et diminuer sa légère toxicité.

Références bibliographiques

- [1] UFAG Laboratoire AG, Contrôle Des Solvants Résiduels. (2019).
- [2] G. Burgot, Microextraction en phase solide, (2019).
- [3] C. De Perre, A. Crespo, N. Abou Mrad, K. Le Ménach, F. Jaber, E. Parlanti, H. Budzinski, Intérêt de la micro-extraction sur phase solide couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux, *Spectra Anal.* 266 (2009).
- [4] A. Arvouet-Grand, A. Vennat, A. Pourrat, P. Legret, Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants., *J. Pharm. Belg.* 49 (1994) 462–468.
- [5] R. Broadhurst, R.B. Broadhurst, W.T. Jones, Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Food Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin*, *J. Sci. Food Agric.* 28 (2015) 788–794.
- [6] F.S. Naczka, R. Zadernowski, Protein precipitating capacity of condensed tanins of beach pea, canola hulls, evening primrose and faba bean., *J. Agric. Food Chem.* 73 (2001) 467–471.
- [7] B. Andrea, C. Valentina, D. Sandro, C. Paolo, A. Alberto, Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity, (2007).
- [8] S.A. Said, C. Fernandez, S. Greff, F. Torre, A. Derridj, T. Gauquelin, J.-P. Mevy, S.A. Said, C. Fernandez, S. Greff, F. Torre, A. Derridj, T. Gauquelin, J.-P. Mevy, Inter-Population Variability of Terpenoid Composition in Leaves of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria: A Chemoecological Approach, *Molecules.* 16 (2011) 2646–2657.
- [9] F. Aouinti, B. Imelouane, M. Tahri, J.P. Wathelet, H. Amhamdi, A. Elbachiri, New study of the essential oil, mineral composition and antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco, *Res. Chem. Intermed.* 40 (2014) 2873–2886.
- [10] P. Ivanov, Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pressions, Thèse de doctorat, 2010.
- [11] M. Wichtl, *Plantes thérapeutiques-Tradition, pratique officielle, science et thérapeutique France : Tec&Doc&EMI.*, 2003.
- [12] B. Ben Amor, Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs, texturation par détente instantanée contrôlée DIC. Thèse de Doctorat de l'université de la Rochelle. France, 2008.
- [13] M. Ferat, Recherche de substances bioactives de *centaurea microcarpa* coss et dur. Diplôme d'études supérieure en biologie de l'Université Mohamed Boudiaf, M'sila., 2009.
- [14] C.P. Anokwuru, G.N. Anyasor, O. Ajibaye, O. Fakoya, Effect of Extraction Solvents on Phenolic, Flavonoid and Antioxidant activities of Three Nigerian Medicinal Plants., *Nat. Sci.* 9 (2011) 53–61.
- [15] S. Bourgou, S. Tammar, N. Salem, K. Mkadmini, K. Msaada, Phenolic Composition, Essential Oil, and Antioxidant Activity in the Aerial Part of *Artemisia herba-alba* from Several Provenances: A Comparative Study, *Int. J. Food Prop.* 19 (2016) 549–563.
- [16] K.M. Schaich, X. Tian, J. Xie, Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays, *J. Funct. Foods.* 14 (2015) 111–125.
- [17] X. Li, X. Wu, L. Huang, Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui), *Molecules.* 14 (2009) 5349–5361.
- [18] B.T. Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon R.A.; Aruoma O.I., Phenolics As Potential Antioxidant Therapeutic Agents: Mechanism and Actions., *Mutat. Res.* 579 (2005) 200–213.
- [19] S.M. Leal, N. Pino, E.E. Stashenko, J.R. Martínez, P. Escobar, Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia, *J. Essent. Oil Res.* 25 (2013) 512–519.

- [20] G. De Muylder, K.H. Ang, S. Chen, M.R. Arkin, J.C. Engel, J.H. McKerrow, A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e1253.
- [21] F.Y. Yang, D.M., Liew, Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis., *Parasitology.* 106 (1993) 7–11.
- [22] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris, M. Komaitis, Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chem.* 107 (2008) 1120–1130.
- [23] A. Romani, P. Pinelli, C. Galardi, N. Mulinacci, M. Tattini, Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L., *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 79–86.
- [24] M.C. Baratto, M. Tattini, C. Galardi, P. Pinelli, A. Romani, F. Visioli, R. Basosi, R. Pogni, Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves, *Free Radic. Res.* 37 (2003) 405–412.
- [25] M. De Rycker, I. Hallyburton, J. Thomas, L. Campbell, S. Wyllie, D. Joshi, S. Cameron, Comparison of a High-Throughput High-Content Intracellular *Leishmania donovani* Assay with an Axenic Amastigote Assay, 57 (2013) 2913–2922.
- [26] F. Khallouki, A. Breuer, E. Merieme, C.M. Ulrich, R.W. Owen, Characterization and quantitation of the polyphenolic compounds detected in methanol extracts of *Pistacia atlantica* Desf. fruits from the Guelmim region of Morocco, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134 (2017) 310–318.
- [27] M. Alves, L.M. Brito, A.C. Souza, B.C. Queiroz, T.P. de Carvalho, J.F. Batista, S.M. Oliveira, I.L. de Mendonça, S.R. de S. Lira, M.H. Chaves, J.C.R. Gonçalves, S.M.P. Carneiro, D.D.R. Arcanjo, F.A. de A. Carvalho, Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*, *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 390 (2017) 893–903.
- [28] S. Kawaii, Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, M. Yano, HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from Citrus juices., *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 128–135.
- [29] S. Kawaii, Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, M. Yano, Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits., *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3565–3571.
- [30] S. Li, H. Wang, L. Guo, H. Zhao, C.-T. Ho, Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites, *J. Funct. Foods.* 6 (2014) 2–10.
- [31] N. Nikaido, T. Ohomoto, U. Sankawa, T. Hamanaka, K. Totsuka, Inhibition of Cyclic AMP Phosphodiesterase by Flavonoids, *Planta Med.* 46 (1982) 162-166.
- [32] J. Pinka, O. Lavie, M. Chorin, Fungistatic constituents in citrus varieties resistant to the mal-secco disease, *Phytochemistry.* 7 (1968) 169-174.
- [33] T. Hirano, K. Abe, M. Gotoh, K. Oka, Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxic on normal lymphocytes., *Br. J. Cancer.* 72 (1995) 1380–1388.
- [34] S. Kawaii, Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, M. Yano, Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation., *Anticancer Res.* 19 (1999) 1261–1269.
- [35] R. Huet, Constituants des agrumes à effet pharmacodynamique : les citroflavonoïdes, *Fruits.* 37 (4) (1982) 267-271
- [36] O. Benavente-García, J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño, J.A. Del Río, Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids, *Journal Agric. Food. Chem.* 45 (12) (1997) 4505-4515.
- [37] E. Meiyanto, A. Hermawan, A. Anindyajati, Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13 (2012) 427–436.
- [38] B. Li, B. Smith, M.D. Hossain, Extraction of phenolics from citrus peels., *Separat Purif Technol.* 48 (2006) 182–188.

- [39] M.A. Mohammadian, Z. Mobrami, R.H. Sajedi, Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature, *Brazilian J. Plant Physiol.* 23 (2011) 203–208.
- [40] D. Abeysinghe, L. Xian, D.S. Chong, Z. Wang Shu, H. Chun, C. Zhou, S. Kun, Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species, *Food Chem.* 104 (2007) 1338–1344.
- [41] S. Rafiq, R. Kaul, S.A. Sofi, N. Bashir, F. Nazir, G. Ahmad Nayik, Citrus peel as a source of functional ingredient: A review, *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 17 (2018) 351–358.
- [42] D. Di Majo, M. Giammanco, M. La Guardia, E. Tripoli, S. Giammanco, E. Finotti, Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships, *Food Res. Int.* 38 (2005) 1161–1166.
- [43] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956.
- [44] X. Dong, Y. Hu, Y. Li, Z. Zhou, The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 243 (2019) 281–289.
- [45] G. Kaur, K. Chauhan, S. Kaur, Immunotherapeutic potential of Codonopsis clematidea and naringenin against visceral leishmaniasis, *Biomed. Pharmacother.* 108 (2018) 1048-1061.
- [46] M. Nakanishi, M. Hino, M. Yoshimura, Y. Amakura, H. Nomoto, Identification of sinensetin and nobiletin as major antitrypanosomal factors in a citrus cultivar, *Exp. Parasitol.* 200 (2019) 24-29
- [47] A. Mathlouthi, M. Belkessam, M. Sdiri, M.F. Diouani, A. Souli, S. El-Bok, M. Ben-Attia, Chemical Composition and Anti-*Leishmania major* Activity of Essential Oils from *Artemisia* spp. Grown in Central Tunisia, *J. Essent. Oil-Bearing Plants.* 21 (2018) 1186–1198.
- [48] L.E. Mesa, D. Vasquez, P. Lutgen, I.D. Vélez, A.M. Restrepo, I. Ortiz, S.M. Robledo, *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. Leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50 (2017) 52–60.
- [49] B. Tamargo, L. Monzote, A. Piñón, L. Machín, M. García, R. Scull, W. Setzer, *In vitro* and *in vivo* evaluation of essential oil from *Artemisia absinthium* L. Formulated in Nanocochleates against Cutaneous Leishmaniasis, *Medicines.* 4 (2017) 38.
- [50] A. Messaï, M.-C. Abdeldjelil, S. Beghou, A.-R. Bensegueni, Effet antiprotozoaire de l'artémisinine : historique des découvertes et applications en médecine vétérinaire, in: *Le 2ème Séminaire Int. Sur Les Plantes Médicinales SIPM'2, 2011*: p. 2011.
- [51] A. Bouyahya, I.C. Chadon Assemian, H. Mouzount, I. Bourais, A. Et-Touys, H. Fellah, A. Benjouad, N. Dakka, Y. Bakri, Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs?, *Ind. Crops Prod.* 128 (2019) 62–69.
- [52] D.C. Arruda, D.C. Miguel, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, A.M. Katzin, S.R. Uliana, Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*, *Biomed. Pharmacother.* 63 (2009) 643–649.
- [53] K.C. De Albuquerque, A.D. Da Veiga, J.V. Da Silva, H.P. Brigido, E.P. Ferreira, E.V. Costa, A.M. Marinho, S. Percário, M.F. Dolabela, Brazilian Amazon Traditional Medicine and the treatment of difficult to heal Leishmaniasis wounds with *Copaifera*, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2017 (2017) 8350320.
- [54] B.J. Martins Da Silva, A.A. Pinto Hage, E.O. Silva, A.P. Drummond Rodrigues, Medicinal plants from Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review, *Journal of Integrative Medicine.* 16 (4) (2018) 211-222
- [55] C.V. Nakamura, A.O. Dos Santos, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, V.F. Da Veiga Junior, Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2012 (2012) 898419

- [56] A.O. dos Santos, M.A. Costa, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias-Filho, V.F. da Veiga-Júnior, M.M. de Souza Lima, C.V. Nakamura, *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice, *Exp. Parasitol.* 129 (2011) 145–151.
- [57] A. Santos, T. Ueda-Nakamura, B. Dias Filho, V. Veiga-Junior, M. Pinto, C. Nakamura, Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*, *J. Ethnopharmacol.* 120 (2008) 204–208.
- [58] V. Veiga Junior, A. Pinto, M.A. Maciel, Plantas medicinais: cura segura?, *Quim. Novamica Nov.* 28 (2005) 519–528.
- [59] V. Veiga Jr, A. Pinto, OGenero Copaifera L., *Quim. Nova.* 25 (2002) 273–286.
- [60] M. Lima, V. Veiga-Junior, H. Christo, A. Pinto, P. Fernandes, *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of Copaifera multijuga Hayne and its fractions, *Phyther. Res.* 17 (2003) 1048–1053.
- [61] R. Essid, F.Z. Rahali, K. Msaada, I. Sghair, M. Hammami, A. Bouratbine, K. Aoun, F. Limam, Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia, *Ind. Crops Prod.* 77 (2015) 795–802.

Chapitre 3 : Formulation de nanoémulsions encapsulant l'extrait : stabilité physicochimique et activité antileishmanienne

Ce chapitre est dédié à l'optimisation d'une formulation visant à encapsuler l'extrait précédemment choisi (extrait d'acétone de citronnier de Béjà - Région 1-).

Dans un premier temps, un bref rappel bibliographique est d'abord réalisé concernant les nanoémulsions (NEs), leur intérêt, leur aspects thermodynamiques, leurs méthodes de fabrication ainsi que l'avantage de la voie d'administration topique. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux NEs stabilisées par des biopolymères ainsi qu'à leur intérêt en comparaison aux NEs stabilisées par des tensioactifs conventionnels. Une brève présentation de la protéine choisie pour notre étude (β -lactoglobuline) est ensuite réalisée.

Dans un second temps, la partie expérimentale s'intéresse d'abord à l'optimisation de la formulation de la NE, huile-dans-eau ne contenant pas d'extrait. Pour cela, nous avons eu recours à la méthodologie des plans d'expériences qui nous a permis de déterminer les paramètres présentant une influence significative sur les propriétés physicochimiques caractérisant la NE. Après avoir défini les systèmes ainsi que les conditions optimales de la formulation, l'encapsulation de l'extrait a été réalisée à plusieurs concentrations. Pour les différents systèmes obtenus, différentes caractérisations ont été mises en œuvre afin d'évaluer leur stabilité sur 30 jours. Nous avons ensuite étudié l'efficacité antileishmanienne des systèmes formulés notamment sur la forme amastigote intramacrophagique du *Leishmania major*. Dans cette partie, une évaluation de la stabilité physicochimique des différents systèmes formulés sous les conditions opératoires du test antiparasitaire a été également effectuée.

A l'issu de ce chapitre, nous avons sélectionné le système adéquat qui a satisfait le compromis stabilité-activité. Afin de pouvoir appliquer ce système en expérimentation animale, nous avons choisi d'ajouter un viscosifiant, la gomme xanthane, dans la phase continue de la NE afin de l'adapter à une application topique.

I. Contexte bibliographique

I.1 Généralités sur les nanoémulsions

Les émulsions sont très largement utilisées dans le domaine pharmaceutique pour leur aptitude à encapsuler, solubiliser, piéger et contrôler la libération des molécules actives. Leur intérêt principal est d'encapsuler une ou des molécules actives à l'intérieur de la phase dispersée afin d'assurer leur protection vis-à-vis de stress environnementaux, comme l'oxygène, la lumière, la chaleur ou encore le pH ou les enzymes, qui pourraient engendrer leur dégradation [1]. Les émulsions peuvent également servir à libérer d'une manière contrôlée un principe actif [2]. L'encapsulation joue un rôle important dans les formulations à visée pharmaceutique notamment pour masquer une odeur ou un goût désagréable [3], réduire une toxicité [4], améliorer la pénétration à travers une barrière biologique (comme la peau) [5] et même pour détoxifier en piégeant les substances toxiques dans la phase interne [6].

Les NEs diffèrent des émulsions par la taille des gouttes dispersées dans la phase continue qui est à l'échelle nanométrique (de 20 à 200 nanomètres) contre une taille qui peut atteindre des dizaines de micromètres pour les émulsions classiques [7]. Cette caractéristique confère aux NEs des propriétés très intéressantes puisqu'elle leur offre une surface spécifique plus importante ainsi qu'une meilleure stabilité.

I.2. Intérêt pharmaceutique des nanoémulsions en tant que vecteur antileishmanien pour la voie topique

La nanovecteurs jouent un rôle important pour une meilleure pénétration, un ciblage pertinent ainsi qu'une libération contrôlée de substances actives [8]. En effet, la taille nanométrique leur confère la capacité à cibler préférentiellement une population de cellules particulières [9]. Plusieurs principes actifs possèdent des propriétés physicochimiques (lipophilie, masse molaire...), défavorables à leur passage à travers différentes barrières biologiques et cellulaires afin de parcourir la distance qui sépare leur site d'administration et le site d'action ciblé. Ceci engendre leur mauvaise absorption, leur dégradation ou métabolisation prématurée, leur élimination et donc leur incapacité d'atteindre leur cible au niveau tissulaire ou cellulaire [10]. En outre, les nanovecteurs sont capables d'assurer la stabilité physique en protégeant les molécules bioactives de la dégradation due aux conditions environnementales telles que la chaleur, la lumière ou l'oxygène [11].

La taille nanométrique des gouttelettes des NEs procure à ces dernières plusieurs atouts suscitant ainsi l'intérêt des chercheurs et industriels dans le domaine pharmaceutique. Elles procurent aux molécules peu solubles dans l'eau une augmentation de la solubilité, une

amélioration de la dissolution et de l'absorption ainsi qu'une meilleure perméation à travers les membranes biologiques. Ceci est dû à la taille nanométrique ainsi qu'à la grande surface spécifique des gouttelettes [12]. Plusieurs études ont démontré le potentiel des NEs en tant que véhicules pour la délivrance et la libération contrôlée de principes actifs et également pour optimiser leur dispersion à travers les différents tissus biologiques [13]. Par ailleurs, selon le système de NE choisi, la libération contrôlée du principe actif permet d'éviter la toxicité du traitement vu que la nanoencapsulation permet de mieux atteindre la cible thérapeutique. De cette façon, une réduction de la dose administrée pourrait être envisagée [13].

Parmi les molécules approuvées pour le traitement des leishmanioses ainsi que celles qui sont en cours de développement, 90% présentent une faible solubilité dans l'eau. Cette propriété constitue un frein à l'efficacité thérapeutique [14,15]. Dans ce contexte, l'application des nanotechnologies dans le traitement des leishmanioses représente une stratégie attrayante étant donné le mécanisme d'absorption de particules nanométriques par les macrophages, principales cellules phagocytaires impliquées dans la maladie. En effet, il a été démontré que les macrophages expriment des récepteurs qui internalisent efficacement les nanoparticules d'une taille de l'ordre de 50 à 500 nm [16]. Le processus phagocytaire permet aux nanogouttelettes d'être phagocytées, ce qui fournit une concentration intracellulaire importante du principe actif ainsi qu'une libération modifiée de celui-ci au sein de la cellule cible [17]. Ainsi, la nanovectorisation permet de véhiculer les principes actifs antileishmaniens jusqu'à la localisation intracellulaire dans le site d'action ce qui pourrait améliorer considérablement l'efficacité et diminuer les effets de toxicité [18]. Ces dernières années, plusieurs études ont proposé la conception de traitements antileishmaniens à base de NEs encapsulant aussi bien des agents chimiothérapeutiques comme l'amphotéricine B [19] que des molécules d'origine naturelle [20–23].

Par ailleurs, l'innocuité des NEs dont la phase huileuse est biocompatible, biodégradable et non mutagène a été déjà démontrée [24]. Généralement, ces systèmes sont non toxiques, non irritants et peuvent facilement être appliqués sur la peau ou les muqueuses. Toutefois, une certaine toxicité peut être observée et semble varier avec les caractéristiques de la NE (taille des gouttes, potentiel zéta ...), le choix du tensioactif et également selon la méthode de fabrication de la NE. En effet, pour certaines méthodes d'émulsification (émulsification à basse énergie), la présence de solvants organiques ainsi qu'une concentration élevée en tensioactifs pourraient s'avérer toxiques [24].

Le choix de la voie d'administration est crucial dans l'optimisation de l'efficacité thérapeutique. Dans cette optique, l'application de nanotechnologies pour une administration topique est devenue une approche très intéressante permettant de renforcer l'efficacité thérapeutique d'un

principe actif tout en limitant sa toxicité. Il a été démontré que les NEs sont de bons vecteurs permettant la libération contrôlée et l'optimisation de la distribution du principe actif à travers les différentes couches de la peau. Grâce à la phase interne lipophile des NEs huile-dans-eau (H/E), ces systèmes sont appropriés pour le transport des principes actifs faiblement solubles dans l'eau à travers la peau. Par ailleurs, la taille nanométrique des gouttelettes offre une surface interfaciale maximale avec la peau ce qui permet au principe actif une distribution homogène et une pénétration renforcée à travers les couches cutanées où réside la cible thérapeutique. Ceci favorise l'efficacité du traitement et minimise sa toxicité. Dans ce contexte, l'encapsulation des molécules bioactives issues de plantes en vue du développement d'un traitement topique pour diverses maladies a déjà été le centre d'intérêt de plusieurs équipes de recherche. Des travaux de développement de NEs encapsulant des molécules telles que la catéchine, l'épicatéchine, (-)-épicatéchine gallate, la caféine, la curcumine ou l'acide férulique, ainsi que leur délivrance à travers la peau ont été décrits [25–30]. Ces formulations ont démontré aussi bien une amélioration de la perméabilité cutanée et de la biodisponibilité qu'un renforcement de l'efficacité thérapeutique [31].

D'autre part, les NEs en application topique suscitent un intérêt croissant car elles représentent une alternative très intéressante aux systèmes de formulations conventionnels puisqu'elles possèdent leurs propres effets bioactifs. Ainsi, il a été démontré que l'application topique des NEs, sans principe actif, implique la réduction de la perte d'eau transdermique, [12,32–34].

Il convient de mentionner que dans notre cas, l'administration topique de la substance active (extrait de plante) sur les lésions de LC représente un choix stratégique qui nous permettrait de s'affranchir de la toxicité systémique induite par les traitements chimiothérapeutiques, généralement administrées par voie intraveineuse, et de traiter uniquement localement. De plus, puisque les NEs jouent le rôle de promoteur d'absorption, il a été démontré que ces systèmes conviennent aussi à une administration transdermique d'une substance active pour le traitement des maladies dermiques [35]. Pour certains principes actifs, cette stratégie permet d'éviter le métabolisme hépatique et offre une libération plus étalée dans le temps [36]. De cette manière, elle réduit les effets secondaires, améliore la biodisponibilité et augmente l'observance du patient [37,38]. Dans le contexte de notre étude, ceci représente un défi puisque l'objectif de la formulation développée est l'amélioration de l'efficacité thérapeutique par action exclusivement locale. Nous estimons que le passage de l'extrait de plante sélectionné dans la voie systémique augmenterait le risque de toxicité de l'extrait et réduirait son efficacité thérapeutique.

I.3. Procédés d'obtention des nanoémulsions

Il existe deux principales méthodes de formulation de NEs : les méthodes à basse énergie et les méthodes à haute énergie. Pour les méthodes à basse énergie, aucune source d'énergie externe n'est nécessaire, la dispersion d'une phase dans une autre sous formes de gouttelettes se fait soit spontanément par mélange des deux phases en présence d'agents émulsionnants (méthode d'émulsification spontanée) soit par modifications de paramètres opératoires tels que la température (méthode de température d'inversion de phases) ou la composition du système (méthode d'inversion de phases ou méthode de point d'inversion d'émulsion). Ces méthodes nécessitent généralement l'utilisation de solvants organiques, ainsi qu'une concentration élevée en tensioactifs [39,40]. Quant aux méthodes à haute énergie, le procédé d'émulsification nécessite un apport d'énergie mécanique externe capable de produire des forces disruptives suffisamment importantes pour produire des gouttelettes de taille nanométrique. Pour ce faire, les procédés utilisés sont l'homogénéisateur haute pression, le microfluidiseur haute pression et les appareils à ultrasons. Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement à l'homogénéisateur à haute pression (HHP) qui représente actuellement la méthode la plus largement utilisée pour préparer des NEs à l'échelle industrielle [41,42], et que nous avons mis en œuvre dans le cadre de notre étude. La méthode consiste à pré-émulsionner les deux phases avec une turbine puis d'introduire l'émulsion grossière ainsi obtenue dans l'HHP où une valve force son passage par une chambre de turbulence à travers un orifice de très petit diamètre en appliquant une force de compression. La valve est ensuite soulevée à la sortie de la chambre et une détente subite conduit à l'éclatement des gouttes (Fig.3.1). Ce processus met en jeu un ensemble de forces disruptives intenses qui sont la turbulence, le cisaillement et la cavitation. Le phénomène prédominant étant la turbulence, il est l'origine de la dispersion des globules en gouttelettes plus fines à travers le volume de l'émulsion [43].

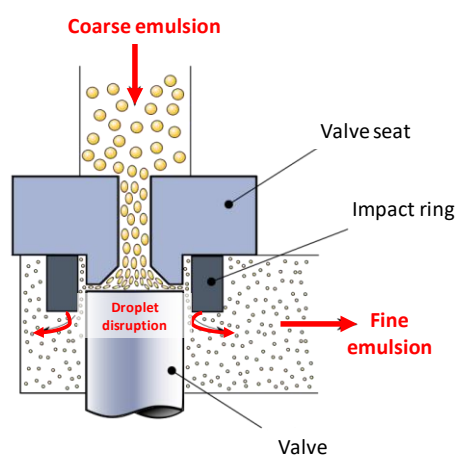


Figure 3.1 : Représentation schématique du principe de d'émulsification par un procédé à haute énergie : l'homogénéisateur à haute pression [44].

L'émulsification par homogénéisation haute pression peut être continue ou discontinue. Après pré-émulsification, il est possible de passer le mélange plusieurs fois dans l'HHP jusqu'à obtention de la taille de gouttelettes de NE ou l'indice de polydispersité désirés [45]. Il a été démontré que, d'une manière générale, la taille des gouttelettes a tendance à diminuer avec l'augmentation de la pression appliquée et le nombre de passage à travers le HHP [46]. D'autre part, la taille des gouttelettes est fortement reliée aux propriétés physicochimiques du système notamment la tension interfaciale des deux liquides et la cinétique d'adsorption de l'agent émulsionnant à l'interface. Ainsi, la taille des gouttelettes diminue avec la diminution de la tension interfaciale H/E et la diminution de la vitesse d'adsorption de l'émulsionnant à cette interface [42]. Il a également été démontré que la viscosité des deux liquides peut avoir un impact sur la taille de gouttelettes obtenue par HHP. D'après McClements, pour une meilleure efficacité de ce procédé, le ratio des viscosités des deux phases ($\eta_{\text{phase dispersée}}/\eta_{\text{phase continue}}$) doit se situer dans la gamme comprise entre 0,05 et 5 [42].

Il est à noter que la méthode d'émulsification choisie pour notre étude représente un intérêt particulier puisque l'utilisation d'une méthode à haute énergie va de pair avec une réduction de la quantité d'émulsifiant introduite dans la formulation. Ceci est favorable à une minimisation de la toxicité que pourrait entraîner le traitement [24].

I.4. Mécanismes de déstabilisations des nanoémulsions

Bien que seul le diamètre des gouttes semble distinguer les NEs des émulsions classiques, de nombreuses propriétés en découlent, notamment la stabilité des systèmes. En effet, la dispersion d'une phase dans une autre sous forme d'émulsion conduit à la formation d'un système thermodynamiquement instable en raison de l'énergie libre de surface qui augmente considérablement par rapport à l'état non dispersé des liquides. Conformément au principe de la thermodynamique, tout système tend à évoluer vers un état assurant un niveau énergétique minimum. Pour cela, les émulsions tendent à se déstabiliser de façon à minimiser la surface de contact interfaciale entre les deux liquides non miscibles ainsi que l'énergie libre [47]. Cette déstabilisation peut impliquer des mécanismes de déstabilisation irréversibles comme le mûrissement d'Ostwald et la coalescence et/ou des mécanismes réversibles qui sont la floculation et la séparation gravitationnelle (Fig. 3.2)[1].

Lors d'une déstabilisation irréversible, la taille des gouttes dispersées évolue vers des tailles plus importantes, et il est impossible de restaurer la taille initiale des gouttes. En revanche, au cours d'une déstabilisation réversible, la taille des gouttes n'est pas modifiée mais macroscopiquement le système émulsionné tend à l'inhomogénéité macroscopique traduisant une distribution spatiale différentes des gouttelettes [45]. Il est alors possible de redisperser les gouttelettes et de retrouver l'homogénéité du système par simple agitation. Les systèmes

émulsionnés peuvent subir un ou plusieurs de ces phénomènes simultanément et l'apparition de l'un d'eux peut favoriser la survenue d'un autre.

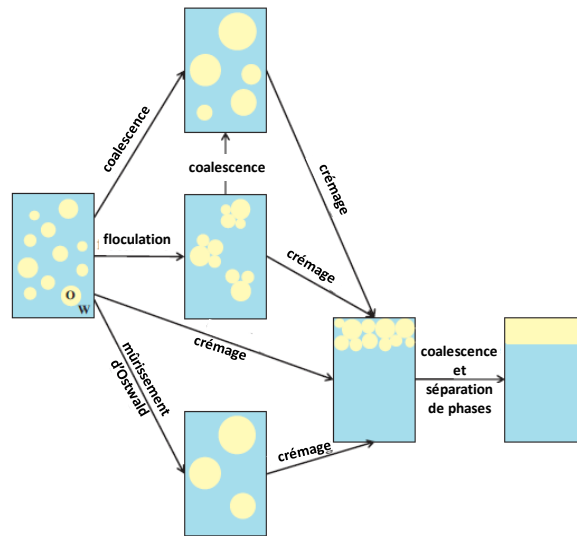


Figure 3.2 : Représentation schématique des divers mécanismes de déstabilisation d'une émulsion (huile (O) dans eau (W)) [1]. Mûrissement d'Ostwald

La principale force motrice du phénomène du mûrissement d'Ostwald est la solubilité de la phase dispersée dans la phase continue [48]. Il s'agit de la cause principale de la déstabilisation des NEs en raison de la taille de gouttes très petite. Contrairement aux émulsions conventionnelles, la pression de Laplace dans les gouttelettes est bien plus importante dans les NEs, ce qui favorise, en cas de polydispersité, la solubilité dans la phase continue et le déversement des plus petites gouttes, dont la pression interne est importante, dans les plus grosses par flux de matière. Ce phénomène est moins probable pour les émulsions conventionnelles puisqu'à partir d'une certaine taille de gouttes, de l'ordre du micromètre, la différence de potentiel chimique entre les gouttes devient négligeable et donc insuffisante pour entraîner le mûrissement d'Ostwald [49]. L'ajout dans la phase dispersée d'une huile ayant une solubilité limitée dans la phase continue peut limiter ce phénomène. Le mûrissement d'Ostwald a été peu observé lorsque les NEs H/E ont été formulées avec une huile à base de triglycérides à longues chaînes aliphatiques telles que l'huile d'arachide [50].

1.4.1. Coalescence

Ce phénomène découle de la fusion de deux gouttes pour former une goutte de plus grande taille. Se répétant, ceci conduit à la séparation complète des deux phases. Ce phénomène est favorisé par tout phénomène entraînant le rapprochement des gouttes les unes des autres. En effet, il a été démontré que le mouvement brownien des gouttes mène à leur collision, entraînant ainsi la coalescence [51,52]. De plus, lors du rapprochement des gouttes, plus la quantité de tensioactif à l'interface est faible, plus le film recouvrant les gouttes est facilement rompu et donc plus la coalescence est favorisée [52]. Toutefois, pour les NEs, vu la petite taille des

gouttes, il a été démontré qu'elles ont la capacité de résister à ce mécanisme de déstabilisation. En effet, le rapport entre l'épaisseur du film interfacial formé par le tensioactif et le rayon de la goutte est plus élevé dans le cas des nanogouttelettes, ce qui rend le film plus résistant par rapport à une émulsion conventionnelle et limite aussi la coalescence [53].

1.4.2. Flocculation

La flocculation conduit à l'agglomération des gouttes dispersées pour former des « floccs ». A la différence de la coalescence, les floccs sont formés par une collision de gouttes agrégées mais qui n'ont pas fusionné. Cet événement est le résultat d'une balance entre deux forces que subit la goutte, à savoir le mouvement brownien et la résultante des différentes forces d'interactions dans le système, qui sont d'une part, les interactions attractives de Van der Waals, et d'autre part les interactions répulsives dues à la double couche électrique qui résulte de l'interpénétration des charges existantes sur les surfaces respectives des gouttes [54].

La NE représente l'un des systèmes émulsionnés les plus protégés contre le phénomène de flocculation. En effet, par opposition aux macroémulsions, le mouvement brownien est prédominant pour les NEs. En outre, les interactions attractives entre les gouttelettes due aux énergies de Van der Waals, sont considérées négligeables puisqu'elles sont proportionnelles aux rayons des particules, qui sont très faibles dans le cas des nanogouttelettes [45].

1.4.3. Crémage ou sédimentation

Le crémage et la sédimentation sont gouvernés par la pesanteur. Ces phénomènes se manifestent différemment en fonction de la densité des deux liquides : si la densité du liquide dispersé est supérieure à celle du liquide de la phase continue, il y aura une sédimentation, dans le cas inverse, un crémage. Ce mécanisme résulte d'une compétition entre deux forces que subit une gouttelette : son mouvement brownien aléatoire et le champ de pesanteur terrestre imposé dont la direction dépend de la densité des liquides. Il en découle *in fine* une séparation gravitationnelle des deux phases.

Les NEs résistent, en général, à ce mécanisme de déstabilisation. En effet, par opposition aux émulsions conventionnelles, le mouvement brownien prédominant par rapport aux forces de pesanteur favorise la distribution aléatoire des gouttelettes à travers le volume de la NE, ce qui s'oppose au phénomène de séparation gravitationnelle. En outre, même au cas où ce phénomène est présent, il est largement ralenti en raison de la taille nanométrique des gouttelettes. Il a été estimé que pour un diamètre de goutte inférieur à 50 nm, la séparation gravitationnelle pourrait être complètement évitée [40,41,45]. Pour ces raisons, en dépit de leur état hors équilibre thermodynamique, les NEs sont considérées cinétiquement plus stables par rapport aux macroémulsions.

I.5. Stabilisation des nanoémulsions

Afin de rendre possible le mélange de deux liquides non miscibles sous forme d'émulsion, il est nécessaire de faire appel à un agent émulsionnant. Par définition, il s'agit d'une molécule amphiphile ayant une activité interfaciale et la capacité de se placer aux interfaces réduisant ainsi la tension interfaciale et rendant possible la formation et/ou la stabilisation du système émulsionné. En général, les émulsifiants sont classés en deux catégories selon la taille des molécules en question : les tensioactifs de faible masse molaire et les agents émulsionnants macromoléculaires.

Généralement, les tensioactifs synthétiques sont les principaux agents émulsifiants utilisés pour la formation des émulsions à visée pharmaceutique [55]. Ils peuvent causer directement ou indirectement des problèmes de toxicité liée à la santé et à l'environnement [56,57]. Plusieurs tensioactifs synthétiques incorporés dans les formulations pharmaceutiques peuvent être intrinsèquement à l'origine d'une toxicité ou encore être à l'origine d'une modification de la distribution ou l'élimination du médicament [56,58]. De plus, la plupart des tensioactifs possèdent un effet irritant sur la peau et provoquent une toxicité importante aussi bien chez les animaux que chez les humains. L'un des mécanismes de toxicité des tensioactifs ioniques, notamment les anioniques, consiste en la formation de liaisons avec les protéines du milieu biologique telles que les enzymes et les membranes phospholipidiques pouvant causer diverses modifications biochimiques et leur dysfonctionnement [56,59]. Par ailleurs, par rapport aux émulsions conventionnelles, la préparation des NEs exige une quantité importante de tensioactif nécessaire pour recouvrir la grande surface interfaciale, ce qui augmente la toxicité potentielle des formulations, notamment dans le cas d'une administration répétée [60]. Pour toutes ces raisons, des alternatives à l'usage des tensioactifs synthétiques ont été développées afin de pallier ces problèmes de toxicité qui réduisent considérablement l'efficacité thérapeutique. Dans ce contexte, l'introduction d'émulsifiants macromoléculaires notamment de polymères naturels tels que les polysaccharides et les protéines peut être une alternative intéressante déjà mise à profit dans le domaine alimentaire, et de plus en plus étudiée dans le domaine pharmaceutique [1].

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons donc uniquement aux émulsifiants macromoléculaires, plus particulièrement, les protéines qui sont des biopolymères ayant démontré leur potentiel dans la stabilisation des systèmes émulsionnés.

1.5.1. Protéines en tant qu'agents émulsionnants

Dans la classe des biopolymères, les protéines, aussi bien d'origine végétale qu'animale, sont des molécules à haute valeur ajoutée surtout qu'elles sont extraites à partir de sources renouvelables, abondantes et peu onéreuses.

La capacité émulsifiante des protéines provient de leur structure polypeptidique amphiphile. La chaîne polypeptidique est une structure formée par des acides aminés qui sont tantôt hydrophobes (alanine, valine, leucine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine et proline) et tantôt hydrophiles (glycine, sérine, thréonine, cystéine, asparagine, glutamine, méthionine aspartate, glutamate, histidine, lysine et arginine). De là, les protéines acquièrent des propriétés amphiphiles leur permettant de s'adsorber à l'interface eau/huile et de stabiliser ainsi un système émulsionné par diminution de sa tension interfaciale [61].

Grâce à leur structure commune, les protéines conduisent globalement au même mécanisme de stabilisation des systèmes émulsionnés mais avec des cinétiques différentes. En fonction de son environnement, une protéine peut subir des remaniements de conformation et de structure. En effet, lorsqu'elle est adsorbée à une interface huile/eau, la protéine déploie ses résidus d'acides aminés hydrophobes à la surface de sa structure et les oriente vers la phase huileuse. De la même façon, les résidus hydrophiles s'orientent vers la phase aqueuse du système [62,63]. Ce mécanisme, dénommé « la dénaturation interfaciale » [64,65], a une cinétique qui varie considérablement avec la molécule en question puisqu'il dépend de la flexibilité moléculaire ainsi que de l'organisation et l'empilement des protéines adsorbées à l'interface [66]. Les protéines relativement déformables (telles que les caséines) subissent des changements de conformation relativement rapides, alors que ces changements sont plus lents pour les protéines globulaires plus rigides (telles que la β -lactoglobuline). Pour le cas des NEs H/E, l'ampleur des changements conformationnels dépend également de la polarité des huiles employées entraînant un déploiement des surfaces hydrophobes de la protéine plus faible lorsque la polarité de l'huile est plus importante, ce qui engendre une formation plus lente du réseau viscoélastique [67,68].

La stabilisation des gouttelettes est assurée grâce à la formation d'un film interfacial viscoélastique fortement cohésif qui résulte des interactions intermoléculaires covalentes (exemple : liaisons disulfure) et non covalentes (les interactions hydrophobes). Il a même été démontré qu'il est possible pour certaines protéines comme celles du lactosérum (exemple : β -lactoglobuline) de se polymériser au niveau de l'interface huile/eau par création de liaisons disulfure [69,70]. Il en découle que la teneur élevée d'une protéine en groupements thiol (exemple β -lactoglobuline par rapport à la caséine) va de pair avec son potentiel à former un film cohésif à l'interface [71]. Le film interfacial, difficile à rompre, rend les globules dispersés résistants au phénomène de coalescence qui se produit à la suite d'une collision des gouttelettes animées par leur mouvement brownien [72].

La stabilisation des gouttelettes est également possible grâce au phénomène de dénaturation interfaciale des protéines, puisque les structures qui en découlent peuvent limiter le rapprochement des gouttes par stabilisation stérique [72,73]. Par ailleurs, d'autres mécanismes

de stabilisation peuvent être envisagés par contrôle des conditions environnementales. En effet, à part les fonctions impliquées dans la chaîne peptidique, des fonctions carboxyle (-COOH) ainsi que des fonctions amine (-NH₂) existent à l'état libre dans la structure moléculaire des protéines. Selon le pH du milieu, ces fonctions peuvent ou non porter des charges positives ou négatives à la surface. Pour une valeur de pH inférieure au point isoélectrique (pI) de la protéine, celle-ci est chargée globalement positivement, alors que pour $\text{pH} > \text{pI}$, elle est globalement chargée négativement. Le pH adéquat à la charge globale de la protéine est alors un paramètre à considérer lors de la formulation de l'émulsion qui va jouer un rôle important sur la stabilisation. Cette charge peut modifier les propriétés interfaciales de la protéine et peut contribuer à stabiliser les gouttelettes par répulsions électrostatiques [74]. L'amplitude de la charge globale, directement liée à l'écart du pH du milieu par rapport au pI de la protéine, est également un paramètre à considérer puisqu'elle est proportionnelle à sa solubilité dans l'eau qui influence sa vitesse de diffusion et d'adsorption à l'interface [75]. Toutefois, la stabilisation électrostatique des gouttelettes par les protéines est sensible à plusieurs conditions opératoires telles que le changement de pH et la force ionique du milieu. Comme déjà expliqué, la charge électrostatique faible (pour un pH voisin du pI) peut causer aussi bien la floculation que la coalescence des gouttelettes. Le système aurait alors tendance à crêmer [76]. Par ailleurs, une force ionique élevée contrebalance les forces répulsives entre les gouttelettes, ce qui entraîne la neutralisation des charges à la surface et résulte *in fine* en une démixtion [76,77]. La température joue également un rôle très important dans la stabilisation des systèmes émulsionnés par des protéines puisque ces dernières sont thermosensibles. En effet, sous l'effet de la chaleur, une protéine adsorbée peut subir une dénaturation thermique qui engendre d'une part l'augmentation de l'hydrophobie des gouttes, et d'autre part l'exposition des groupements thiols de la protéine dans la phase aqueuse. Le premier phénomène cause une attraction plus importante entre les gouttes qui expose le système aux phénomènes de déstabilisation. Par ailleurs, le deuxième phénomène favorise la formation de ponts disulfure entre les polymères à la surface des gouttes entraînant le rapprochement de celles-ci et le phénomène de floculation [78].

1.5.2. Agents émulsifiants : protéine vs tensioactif conventionnel

Le remplacement des tensioactifs par des protéines est, certes, une approche très intéressante offrant plusieurs avantages notamment la diminution de la toxicité des systèmes émulsionnés. Néanmoins, il est intéressant de comparer ces deux classes d'émulsifiants afin de se rendre compte des avantages et des inconvénients que pose l'utilisation de chacun notamment sur la stabilité des systèmes. Dans ce contexte, plusieurs travaux se sont intéressés aux propriétés interfaciales de ces deux types d'agents émulsifiants [1,65,77,79–81]. Les résultats de ces publications peuvent se résumer ainsi :

- La cinétique d'adsorption des protéines aux interfaces huile/eau est lente par rapport à celle des tensioactifs synthétiques de faible masse molaire.
- Lorsqu'elles sont adsorbées à la surface, les protéines subissent une dénaturation interfaciale qui fait que leur conformation se modifie afin d'exposer différentes parties de leur structure selon leur affinité pour l'eau ou pour l'huile. Toutefois, les tensioactifs de faible masse molaire ne subissent aucun remaniement de structure à l'interface.
- L'adsorption des tensioactifs à l'interface est sous forme de monocouche dont l'épaisseur varie en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique. Les protéines, pour leur part, s'adsorbent à l'interface sous forme d'une ou plusieurs couches selon leur teneur initiale dans la phase aqueuse.
- A l'interface, les interactions intermoléculaires sont non-covalentes pour les tensioactifs tandis qu'elles peuvent aussi être covalentes pour les protéines. Par conséquent, les protéines forment des films denses et cohésifs à l'interface, ce qui limite la déformation des gouttes lors de leur collision ; ce n'est pas le cas des tensioactifs de faible masse molaire.
- La valeur de la tension interfaciale d'un système stabilisé par un tensioactif est moins élevée que celle d'un système stabilisé par une protéine.
- L'adsorption des tensioactifs à l'interface est réversible alors que celle des protéines est presque irréversible. Cette particularité se répercute sur la stabilité des systèmes émulsionnés sur le long terme. En effet, les émulsions stabilisées par des tensioactifs sont moins stables à long terme contre le phénomène de coalescence que celles stabilisées avec des protéines.

Bien que l'utilisation des protéines présente quelques limites, elle demeure une des alternatives les plus attrayantes à l'utilisation des tensioactifs synthétiques notamment dans le domaine pharmaceutique. Pour notre étude, nous avons choisi une protéine, qui a déjà fait l'objet de plusieurs travaux dans notre équipe pour son potentiel stabilisant des NEs, qui est la β -lactoglobuline.

1.5.3. Protéine choisie : β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline (β -lg) est la protéine majoritaire dans le lactosérum du lait des mammifères sauf celui de l'Homme et des rongeurs. Dans le lait de vache, elle a une teneur de 3 g/L ce qui représente environ 50 % de toutes les protéines du lactosérum. Elle fait partie de la grande famille des transporteurs protéiques dénommée protéines de liaison aux molécules hydrophobes ou lipocalines en raison de la séquence d'acides aminés qu'elle renferme ainsi que sa structure tridimensionnelle [82]. La β -lg est considérée comme une protéine globulaire relativement petite qui est constituée, dans sa structure primaire, d'une chaîne peptidique de 162 acides

aminés. La masse molaire d'un monomère est de 18 300 g/mol [70,72]. Le pI de cette protéine a été estimé à 5,2 [83].

Si l'usage de cette protéine en tant qu'agent émulsifiant dans l'industrie agroalimentaire est très développé, à notre connaissance, aucun exemple d'application de la β -lg dans l'industrie pharmaceutique n'existe.

En raison de sa nature amphiphile, cette protéine a la capacité de s'adsorber facilement à l'interface huile/eau, où elle se déplie partiellement. A faibles concentrations, c'est-à-dire à des concentrations inférieures à la concentration de la saturation de l'interface (7×10^{-4} (m/m) %), la β -lg se place à l'interface et se déplie en occupant une aire maximale. En revanche, à des concentrations plus importantes, d'autres interactions latérales protéine-protéine entrent en jeu, ce qui induit une conformation plus compacte [87]. D'après Bouyer *et al.*, à de fortes concentrations (> 1 (m/m) %), un film de β -lg se forme à l'interface huile/eau possédant un comportement viscoélastique qui contribue à la stabilisation de l'émulsion. En effet, lors d'une collision entre deux gouttes, l'interface élastique résiste à la contrainte de déformation empêchant ainsi la coalescence et favorisant la stabilité du système [87]. Le dépliement partiel de la structure tridimensionnelle à l'interface provoque l'exposition du groupe réactif thiol qui entraîne la polymérisation lente de la protéine récemment adsorbée avec celle à l'interface [69,70]. Ces interactions latérales protéine-protéine sont à l'origine d'une conformation plus compacte de la β -lg [87].

Il a été rapporté que la β -lg a le pouvoir de stabiliser avec succès un système émulsionné à un pH de 7 qui assure une charge négative globale suffisamment grande pour maintenir la répulsion électrostatique entre les différentes gouttelettes [78]. Comme pour la majorité des protéines, la β -lg est sensible à la chaleur. En effet, d'après la mesure de la taille des gouttes d'un système émulsionné avec la β -lg, un phénomène de floculation a été observé à la suite d'une élévation de la température ($\sim 70^\circ\text{C}$) [78]. Le dépliement de la protéine est de plus en plus important lorsque la température s'élève entraînant une exposition des groupes thiols qui font augmenter les interactions attractives entre les gouttes formant alors des ponts disulfures inter-gouttes, résultant en la formation de flocs [62].

Dans le cas d'une émulsification de type HHP, la pression appliquée peut également avoir une influence sur l'intégrité de la protéine. Dans des travaux antérieurs menés dans notre équipe, il a été prouvé qu'une pression appliquée de 300 MPa avec 5 cycles au sein du HHP ont conduit à des modifications significatives dans la structure de la β -lg, utilisée pour émulsionner des NEs (H/E), ce qui a entraîné l'augmentation significative de la taille des globules [88].

Enfin, il est à noter que l'usage de certains polymères naturels peut poser un problème à cause de leur potentiel allergique. Dans notre cas, la β -lg, étant d'origine animale, est impliquée dans

l'allergie aux produits laitiers [89]. Toutefois, nous pensons que la voie d'administration topique pourrait permettre de limiter une éventuelle réaction allergique du fait que la β -lg resterait dans le *stratum corneum* contrairement à son administration par voie orale.

I.6. Conclusion

Pour une application topique sur les lésions de *Leishmania major*, les NEs semblent donc être de très bons candidats grâce à leur capacité de renforcer l'efficacité thérapeutique, d'améliorer la pénétration cutanée des molécules actives et d'empêcher l'évaporation de l'eau transdermique. Grâce à ses propriétés stabilisantes des NEs au cours du temps, le choix de la β -lg semble être une approche intéressante alternative à l'usage des tensioactifs synthétiques provoquant un effet irritant et toxique lors d'une administration répétée [60].

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

La β -lactoglobuline, d'origine bovine, servant à la préparation des NEs (lot SLBC2933V, degré de pureté $\geq 90\%$) a été achetée chez Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Le MCT 70/30 (medium chain of triglycerids) (lot 15020511) est composé d'un ratio 70/30 d'acide caprylique (C8) et d'acide caprique (C10). Cette huile commerciale composée de triglycérides à chaînes moyennes dérivée du palmier et de la noix de coco, a été offerte par la Stéarinerie DUBOIS (Boulogne-Billancourt, France). L'huile de sésame raffinée de qualité pharmaceutique (lot 232-370-6) a été fournie par COOPER (Melun, France). L'azide de sodium (lot K305.2) a été obtenu auprès de Carl Roth (Karlsruhe, Allemagne). La miltéfosine a été fournie par Zentaris Aeterna (Francfort, Allemagne). La gomme de xanthane (XG) (SatiaxaneTM CX 910, lot 20060134) a été offerte par Degussa (Paris, France). L'eau ultra purifiée provenant d'un appareil Millipore Synergy 185 couplé à un RiOs5TM à une résistivité de 18,2 M Ω cm a été utilisée pour la préparation de toutes les solutions. La solution de phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄) (lot SLBC5939V) et la solution de phosphate de potassium dibasique (K₂HPO₄) (lot 068K8600) ont été achetées auprès de Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Tous les autres produits chimiques utilisés dans cette étude étaient de qualité analytique. L'extrait acétonique des feuilles de citronnier a été extrait par macération à froid suivant le protocole décrit dans le Chapitre 2, Section II.

II.2. Préparation d'une nanoémulsion avec ou sans extrait

La préparation des NEs a été réalisée suivant les conditions optimales déterminées suite à l'étude d'optimisation décrite en Annexe.

II.2.1. Préparation de la phase aqueuse

La préparation de la phase aqueuse consiste à disperser 1,2 (m/m) % de protéine dans du tampon potassium phosphate (PB) à un pH à 7,0. Cette solution a été laissée sous agitation moyenne pendant 2 heures, puis elle a été stockée à 4 °C pendant 12 h afin d'assurer l'hydratation de la protéine. La solution a ensuite été filtrée à travers un filtre seringue d'une porosité de 0,22 µm afin d'enlever les insolubles. La concentration finale de la protéine a été vérifiée par spectrophotométrie UV (V530 UV/vis spectrophotomètre, Jasco, Japan) en mesurant l'absorbance à 278 nm et en utilisant un coefficient d'extinction de 9,6 dl.cm⁻¹.g⁻¹ [83].

II.2.2. Préparation de la nanoémulsion

Deux types d'huile ont été choisis pour la formulation des NEs : MCT 70/30 (MCT) et l'huile de sésame (SO). Le MCT est une huile qui a déjà été testée dans le système de NE déjà établi dans des travaux précédents de l'équipe [60,88]. Par ailleurs, l'SO, composée d'un mélange d'acide oléique et acide linoléique, a été choisie pour ses propriétés cicatrisantes rapportées dans la littérature qui pourraient jouer un rôle dans la cicatrisation des lésions de leishmaniose cutanée [90]. Le ratio huile/eau a été fixé à 20% pour les deux types de NEs (NE MCT et NE SO).

L'émulsification a été réalisée en deux étapes. La première a consisté à ajouter progressivement la phase huileuse à la phase aqueuse en agitant à l'aide d'un Ultraturax (Ultra Turraxrotor T10, IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) avec une vitesse de 20 500 tr/min pendant 2 min à température ambiante. Ensuite, cette pré-émulsion a été introduite dans l'HHP afin de produire environ 10 mL de NE. Les conditions de l'homogénéisation haute pression ont été fixées à une température de 40 °C, une pression de 120 MPa et 4 cycles consécutifs. La NE obtenue a été stockée à température ambiante à l'abri de la lumière.

Il est à noter que la solubilisation de l'extrait acétone du citronnier a été faite au préalable dans la phase huileuse par incubation dans un bain à ultrasons pendant 30 min, afin d'améliorer sa solubilisation.

II.2.3. Choix des systèmes à étudier

Le choix de la concentration de l'extrait acétonique de citronnier à encapsuler dans les deux systèmes choisis (NE MCT et NE SO) a été réalisé suivant les conditions du test antileishmanien. Il est à rappeler que pour tester l'efficacité de l'extrait brut (non encapsulé), celui-ci a été dispersé dans une solution d'éthanol à une concentration de 100 mg/mL, ce qui correspond à une concentration finale de 1 (m/m) % d'extrait dans la NE. De plus, nous avons choisi de préparer des NEs à des concentrations en extrait plus faibles à savoir 0,5 (m/m) % et 0,1 (m/m) %, afin de déterminer l'effet de la concentration sur la stabilité physicochimique des NEs, d'une part et l'efficacité antiparasitaire, d'autre part. Des NEs contrôles, sans extrait (0

(m/m) %) ont été aussi préparées. Le Tableau 3.1 regroupe tous les systèmes étudiés ainsi que leur notation.

Tableau 3.1 : Différents systèmes de nanoémulsions étudiés.

		Concentrations en extrait (m/m) %	Notation
NE à base de MCT (NE MCT)		0 %	NE MCT 0 %
		0,1 %	NE MCT 0,1 %
		0,5 %	NE MCT 0,5 %
		1 %	NE MCT 1 %
NE à base d'huile de sésame (NE SO)		0 %	NE SO 0 %
		0,1 %	NE SO 0,1 %
		0,5 %	NE SO 0,5 %
		1 %	NE SO 1 %

II.3. Caractérisation des nanoémulsions

III.3.1. Caractérisation physicochimique sur 30 jours

La stabilité des NEs a été évaluée d'une part macroscopiquement par observations visuelles, et d'autre part par des mesures du diamètre hydrodynamique, le jour de la préparation J0, à J1, J2, J3, J5, J21, J26 et J30. Le potentiel de surface des gouttes a été mesuré à J0.

Le diamètre hydrodynamique des gouttelettes, la distribution des tailles et l'indice de polydispersité ont été déterminés par la technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS, dynamic light scattering) qui repose sur le principe de diffusion quasi élastique de la lumière, à l'aide d'un appareil de diffusion de lumière dynamique (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments), doté d'un laser He-Ne de 4 mW (633 nm). Les mesures ont été réalisées à 25°C, sous un angle d'incidence du faisceau laser de 90°.

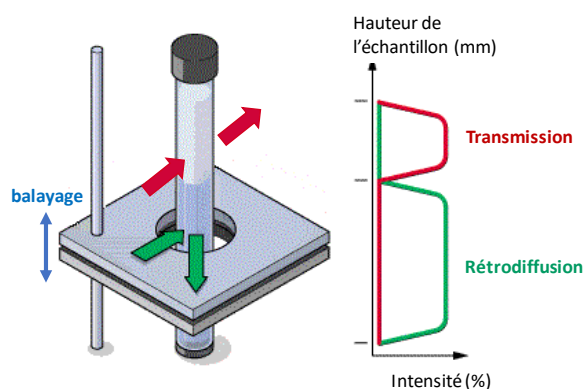
Le potentiel zéta (ζ) des gouttes a été déterminé par électrophorèse laser Doppler qui repose sur le calcul de la mobilité électrophorétique par l'équation de Henry. ζ reflète la charge de surface des gouttelettes d'une émulsion. Des valeurs élevées (en valeur absolue) confèrent au système une stabilité du système durant le stockage en raison de la présence de forces électrostatiques répulsives plus importantes entre les différentes gouttelettes [91]. Cette mesure a été réalisée en utilisant le même appareil que pour la mesure du diamètre hydrodynamique des gouttes.

Pour la mesure de la taille et du potentiel de surface, toutes les NEs ont été préalablement diluées au 1/20^e dans du tampon PB (phosphate 10 mM ; pH 7,0), afin d'éliminer les effets de la diffusion multiple. Chaque mesure a été répétée au moins 3 fois sur 3 prélèvements différents d'une même émulsion.

III.3.2. Etude de stabilité par balayage optique

L'analyseur par balayage optique (Turbiscan[®]) est largement utilisé pour évaluer la stabilité des systèmes colloïdaux. Pour le cas des systèmes émulsionnés, cette technique repose sur la diffusion multiple de la lumière par les gouttelettes de l'échantillon, elle ne nécessite donc pas de dilution de l'échantillon. En pratique, l'échantillon est illuminé par un faisceau lumineux dont la longueur d'onde se situe dans le proche infrarouge ($\lambda = 800 - 880 \text{ nm}$). Les faisceaux qui sont par la suite transmis et rétrodiffusés par l'échantillon sont reçus par deux détecteurs synchrones qui sont situés à des angles de 180° et 45° par rapport à la source du faisceau incident. De cette manière, l'appareil (Turbiscan[®] MA2000) réalise une acquisition des données de diffusion et rétrodiffusion en balayant toute la hauteur de l'échantillon (Fig.3.3).

Figure 3.3 : Principe du fonctionnement d'un Turbiscan, image adaptée de [92].



La stabilité par balayage optique de toutes les NE a été déterminée sur 30 jours (J0, J1, J3, J5, J7, J21, J30). Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentages calculés pour chacune des intensités transmises ou rétrodiffusées par rapport à l'intensité du faisceau incident de départ, et ce à chaque point de toute la hauteur de l'échantillon [93,94].

Dans notre cas, en raison de l'opacité des échantillons, aucune transmission n'a été détectée, seule la rétrodiffusion a donc été prise en compte.

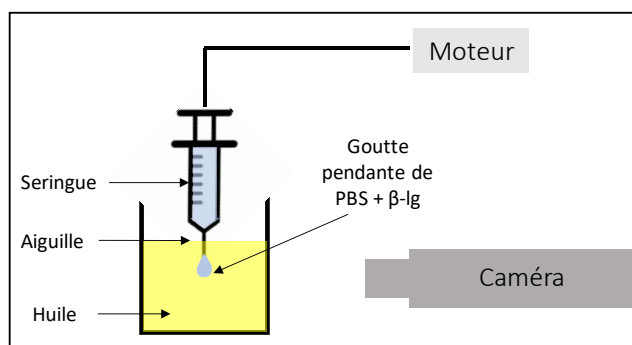
III.3.3. Mesure de la tension interfaciale

La tension interfaciale caractérisant un système de phase bidimensionnelle est un paramètre important à étudier. La mesure de la tension interfaciale nous a permis d'une part de comprendre l'effet de la protéine à l'interface huile/PB, et d'autre part de comparer entre eux les différents systèmes choisis (NE à MCT ou NE à SO).

La mesure de la tension interfaciale a été réalisée par la méthode de la goutte pendante à l'aide d'un tensiomètre dynamique à goutte (Tracker, Teclis, France). L'appareil comporte une seringue, reliée à un moteur qui permet de monter ou descendre le piston de la seringue afin de former la goutte. L'aiguille de la seringue est immergée partiellement dans la deuxième phase du système (l'huile avec ou sans extrait). L'ensemble est muni d'une caméra et d'une source de

lumière permettant de prendre des photos qui sont par la suite traitées par le logiciel (Windrop) (Fig.3.4).

Figure 3.4 : Principe de mesure de la tension interfaciale par tensiomètre dynamique à goutte.



La mesure de tension interfaciale, notée γ , des différents systèmes constitués de solution aqueuse (PB+ β -Ig) et la phase huileuse (MCT ou SO, avec ou sans extrait) a été réalisée par la formation d'une goutte pendante de solution aqueuse dans l'huile, au moyen d'une seringue de 500 μ L munie d'une aiguille droite de 18G. Les mesures de γ ont été effectuées en mode statique à une température de 20°C sur une durée minimale de 12 h et ont été répétées trois fois sur trois gouttes différentes.

III.3.4. Mesure de la viscosité

La viscosité des NEs ainsi que leurs phases huileuses respectives a été mesurée à l'aide d'un rhéomètre AR-G2 (TA Instruments, New Castle, U.S.A) afin de comprendre le comportement rhéologique des différents échantillons. Ce rhéomètre est équipé d'une géométrie cône plan en aluminium caractérisée par un diamètre de 40 mm, un angle de 1,004° et une troncature de 28 μ m. Le cisaillement appliqué a varié de 0,1 à 1000 Pa avec 3 points par décade sur une échelle logarithmique. Toutes les mesures de viscosité ont été effectuées à une température de 20,0 \pm 0,1 °C, contrôlée grâce au plan Peltier. La durée de mesure a été de 3 minutes pour chaque point afin d'atteindre des conditions d'équilibre. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicat sur trois prélèvements différents.

II.4. Évaluation de l'activité antileishmanienne et cytotoxicité des nanoémulsions

L'évaluation de l'activité antileishmanienne des NEs a été réalisée uniquement sur la forme amastigote intramacrophagique du parasite *Leishmania major*. Elle a eu pour but, d'une part de tester l'efficacité *in vitro* de l'extrait sous sa forme encapsulée, et, d'autre part, de comparer celle-ci avec l'efficacité *in vitro* de l'extrait brut, précédemment étudiée (voir Chapitre 2, Section II).

Les cultures de parasites et des cellules macrophagiques ainsi que l'infection ont été réalisées suivant le même protocole que celui détaillé dans la Publication 1 avec quelques modifications. En effet, l'incorporation des NEs dans les puits de la plaque a nécessité leur homogénéisation préalable dans le milieu de culture. Dans une plaque de 96 puits, nous avons procédé aux dilutions sériées des NEs avec le milieu DMEM supplémentée de 10 (v/v) % de sérum de veau fœtal (SVF), aux concentrations du test antileishmanien ou de cytotoxicité (entre 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 10^{-4} $\mu\text{g}/\text{mL}$), puis la plaque a été agitée pendant au moins 30 min afin de bien disperser les gouttelettes dans le milieu. Ensuite, ces solutions (dilutions) ont été directement transférées dans les puits contenant les macrophages infectés ou non.

Les systèmes testés ont été les NEs (NE MCT et NE SO) sans extrait et les NEs (à base de MCT ou SO) avec 0,1, 0,5 et 1 % d'extrait. L'activité antileishmanienne ainsi que la cytotoxicité ont été évaluées pour les différents systèmes de NEs au 3^{ème} jour après leur formulation.

Il est à noter que les concentrations prises en compte dans les différents puits correspondent à celles de l'extrait. Pour cela, un calcul du volume de NE à introduire dans le premier puit a été réalisé en tenant compte de la concentration de l'extrait dans toute la NE (Fig.3.5). Ainsi pour atteindre la concentration en extrait de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le premier puit de la plaque (colonne rouge en pointillé sur la Fig. 3.5), nous avons introduit 4 μL de NE à 1 % ou 8 μL de NE à 0,5 % ou encore 40 μL de NE à 0,1 %. Pour les NE contrôles sans extrait, les mêmes volumes prélevés ont été réalisées. Par la suite, des dilutions sériées ont été réalisées par le prélèvement du même volume d'un puit à un autre.

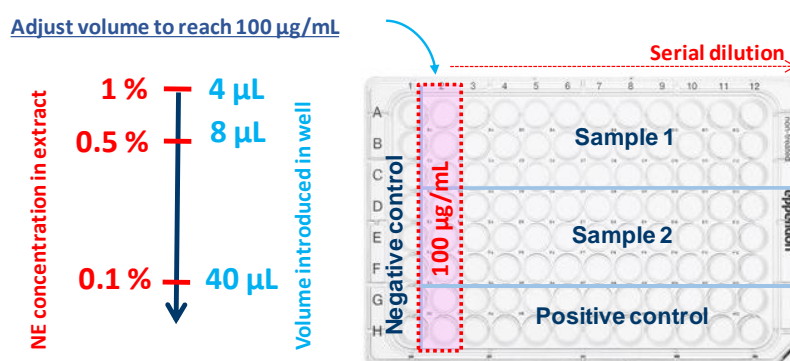


Figure 3.5 : Schéma expliquant le protocole adopté pour l'introduction des nanoémulsions chargées dans les puits de la plaque.

Dans chaque expérience, des triplicats ont été effectués pour chaque concentration. Ces expériences ont été réalisées au moins 3 fois. La viabilité cellulaire a été évaluée en suivant le même protocole détaillé dans la Publication 1 en utilisant la méthode SYBR[®] Green I. Les valeurs d'IC₅₀ et de CC₅₀, exprimant respectivement l'activité antileishmanienne et la cytotoxicité des NEs ont été calculées en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Une NE ayant une activité intéressante sur les

formes *L. major* amastigotes intramacrophagiques possède une $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$. Par ailleurs, l'indice de sélectivité, défini par le ratio entre CC_{50} et IC_{50} , doit dépasser la valeur de 10 pour que la NE ne soit pas considérée comme toxique vis-à-vis des cellules hôtes.

II.5. Evaluation de la stabilité des nanoémulsions dans le milieu de culture biologique

L'objectif de cette évaluation a été de mieux comprendre la différence des résultats observés lors de l'étude de l'activité antileishmanienne lorsque la concentration en extrait a été modifiée. Ce test a permis de déterminer l'évolution possible des tailles des nanogouttelettes dans les puits de la plaque du test biologique à la suite de sa dilution dans le milieu de culture des cellules infectées, puis après 72 heures d'incubation dans les conditions définies.

Pour réaliser cette expérience, toutes les NEs préparées, quelle que soit leur composition, ont été diluées dans le milieu de culture DMEM supplémenté de 10 % de SVF à la même concentration que dans le test antiparasitaire (100 $\mu\text{g/mL}$ d'extrait de citronnier dans le puit). Les mesures de la taille des gouttelettes par diffusion dynamique de la lumière (paragraphe 3.2.2.(a)) dans le milieu de culture ont été réalisées avant, après dilution et après incubation à 37°C pendant 72 heures. Ces paramètres ont été choisis afin de mimer les conditions du test antiparasitaire.

II.6. Analyses statistiques des données

Dans notre étude, toutes les mesures ont été effectuées au moins en triplicata ($n = 3$). Les résultats ont été alors exprimés par la moyenne \pm l'écart-type. L'analyse de ces données a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®] 5.0. Le test one-way-Anova a été appliqué sur les différentes données avec le post-test recommandé à chaque fois.

Pour le suivi de la taille des gouttelettes des différents systèmes, le test two-way-Anova a été appliqué afin de comparer l'évolution au cours du temps par rapport un contrôle. Dans notre cas, la NE ne contenant pas l'extrait, relative à chaque système, a été considérée comme un contrôle. Le post-test Bonferroni a été appliqué afin d'identifier les différences significatives entre les moyennes avec un niveau de significativité de 0,05.

III. Résultats et discussion

III.1. Etude préliminaire de formulation des NEs

Cette étude a eu pour objectif de déterminer les paramètres optimaux de formulation des NEs répondant à certains critères qui sont principalement une taille de gouttes la plus petite et un indice de polydispersité (PDI) inférieur à 0,2. Pour ce faire, un plan factoriel complet à trois

facteurs (à deux niveaux) a été établi. Les facteurs choisis ont été la fraction huileuse, la fraction d'émulsifiant (β -lg) et le type d'huile. Cette étude est détaillée dans l'Annexe portant sur l'« *Optimisation de la formulation d'une nanoémulsion stabilisée par la β -lactoglobuline par la méthodologie des plans d'expériences* ».

A l'issue de cette étude, nous avons retenu le système composé de 1,2 (m/m) % β -lg et de 20 (m/m) % d'huile. Cette formulation nous a permis d'obtenir des tailles moyennes de gouttes aux alentours de 25 nm pour une NE à base de SO et de 40 nm pour une NE à base de MCT. Les valeurs de PDI de ces NEs ne dépassent pas 0,2, ce qui caractérise une distribution de tailles étroite des gouttelettes. Ces caractérisations ont été réalisées le jour de la formulation (J0).

Dans la suite, ces systèmes de NEs ont servi à encapsuler différentes concentrations d'extrait acétonique du citronnier.

III.2. Caractérisation physico-chimique des nanoémulsions

III.2.1. Distribution de la taille et potentiel zéta à J0

La distribution de la taille des gouttelettes des NEs mesurée le jour de la formulation, noté J0, pour les deux systèmes est représentée dans la Fig.3.6.

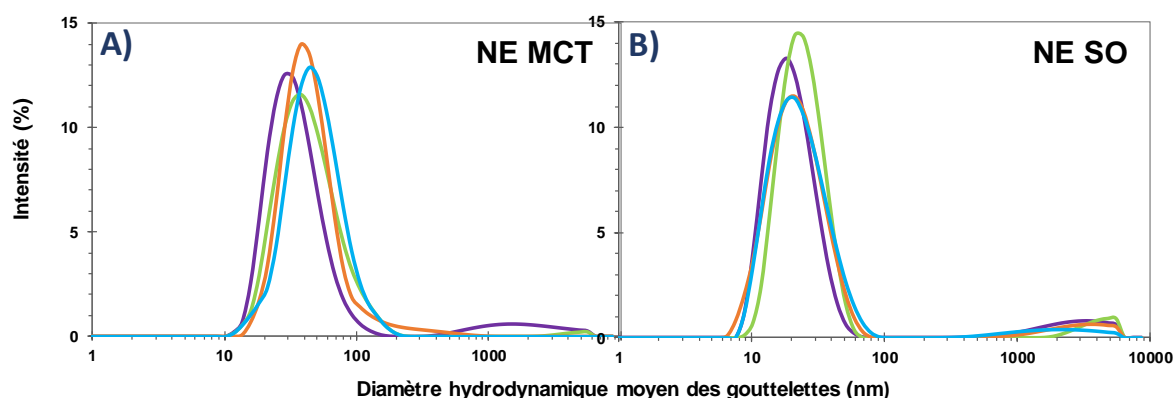


Figure 3.6 : Distribution de la taille des gouttelettes des nanoémulsions à base de MCT (NE MCT) (Figure 3.6-A) et des nanoémulsions à base d'huile de sésame (NE SO) (Figure 3.6-B) le jour de la formulation, préparées avec différentes concentrations d'extrait : 0 % (—), 0,1 % (—), 0,5% (—) et 1% (—).

Les résultats montrent que la distribution de la taille des gouttelettes des NEs préparées dépend aussi bien du type d'huile utilisée que de la concentration d'extrait incorporé dans la phase dispersée.

Pour le système NE MCT (Fig.3.6-A), lorsque la concentration de l'extrait incorporé augmente, la distribution de la taille des gouttelettes se déplace légèrement vers des valeurs de tailles plus importantes. Cette augmentation de taille n'est pas significative puisque les distributions des tailles de gouttes se chevauchent. Toutefois, celles-ci restent étroites et unimodales pour toutes les NEs ($PDI \leq 0,2$). La taille des gouttelettes moyenne obtenue à J0 est aux alentours de 40 nm.

Pour le deuxième système, NE SO (Fig. 3.6-B), la distribution de la taille des gouttelettes à J0 montre que la taille ne dépend pas significativement de la concentration de l'extrait dans la NE. Toutes les NEs contenant l'extrait possèdent une distribution de taille des gouttelettes unimodale et proche de celle de la NE ne contenant pas d'extrait. Le diamètre moyen des gouttelettes de ces NEs est aux alentours de 25 nm. NE SO semble être un système moins sensible à l'encapsulation que NE MCT.

Nous remarquons que la taille moyenne des gouttes du système NE MCT (~ 40 nm) est supérieure à celle du système NE SO (~ 25 nm). Cette différence de tailles de gouttelettes entre les deux types de systèmes pourrait être expliquée soit par la tension interfaciale soit par la viscosité de la phase dispersée qui sont généralement les deux principaux paramètres qui gouvernent la taille des gouttelettes des NEs obtenues par un procédé haute pression [95].

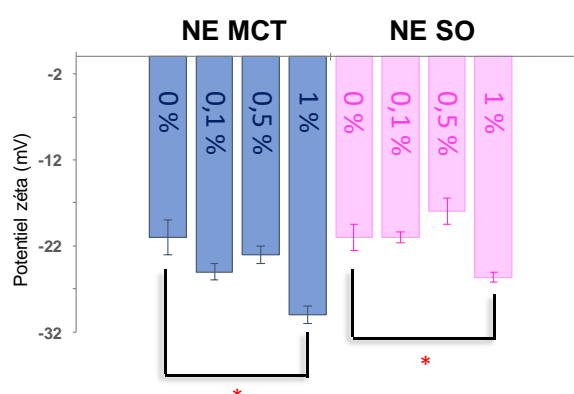
Les mesures de tensions interfaciales des huiles sans extrait, par la technique de la goutte pendante, ont montré qu'à l'interface β -lg/MCT, caractérisant le système NE MCT, la tension est de $7,7 \pm 0,3 \text{ mN.m}^{-1}$. Cette valeur est supérieure à celle mesurée pour l'interface β -lg/SO, caractérisant le système NE SO, qui est égale à $4,5 \pm 0,2 \text{ mN.m}^{-1}$. Ainsi, une valeur de γ plus faible apparaît plus favorable à la formation de plus petites gouttes, comme cela a été démontré dans des études antérieures [10,46,87]. La plus faible tension interfaciale de l'huile de sésame pourrait être due à son origine végétale [87]. En effet, les huiles végétales sont généralement constituées de mélanges de triglycérides et peuvent, selon les procédés d'extraction et de traitement, contenir des petites quantités de mono- et diglycérides, d'acides gras libres et de phospholipides. Dans notre cas, l'huile de sésame, étant raffinée, est normalement exempte de phospholipides. Cependant, elle pourrait contenir des quantités résiduelles d'acides gras et mono- et diglycérides amphiphiles. Selon le fournisseur, l'huile de sésame utilisée est majoritairement constituée d'acides oléique et linoléique. L'étude de Gaonkar a démontré que ces acides gras ne contribuent pas à l'abaissement de la tension interfaciale de l'huile de soja avec l'eau. Toutefois, les résidus de monoglycérides possèdent une activité interfaciale importante capable d'abaisser par exemple la tension interfaciale de l'huile de soja commerciale [96].

La mesure tension interfaciale entre l'huile (MCT ou SO) contenant l'extrait et la phase aqueuse (solution de β -lg) n'a pas pu être réalisée puisque la goutte se détachait pendant les 10 premières minutes de l'analyse. Ceci est probablement dû aux valeurs mesurées de γ qui sont trop basses ($\gamma < 4 \text{ mN.m}^{-1}$, données non montrées). L'abaissement des tensions interfaciales par ajout de l'extrait suggère que celui-ci contient des composés aux propriétés tensioactives, pouvant s'adsorber aux interfaces huile/eau. En effet, l'extrait de citronnier pourrait contenir des saponosides, qui sont des métabolites secondaires très connues pour leurs propriétés

tensioactives très intéressantes [97]. En effet, ces propriétés proviennent de leur structure moléculaire qui contient une partie hydrophobe stéroïde ou triterpénoïde aglycone et une partie hydrophile contenant un ou plusieurs sucres [98]. Ces composés sont utilisés en tant qu'émulsifiants dans la formulation des crèmes et des mousses cosmétiques [97]. Plusieurs études ont démontré la présence de ces composés dans la plante du citronnier, notamment dans les feuilles [99]. Les saponosides contenues dans l'extrait sec de *Centella asiatica* : l'asiaticoside et le madécassoside (crème cicatrisante Madecassol®) semblent stimuler et réguler la production de collagène, matrice fibreuse indispensable à la cicatrisation des plaies [100]. Les saponosides contenues dans l'extrait acétone du *Citrus limon* pourraient donc éventuellement contribuer à son efficacité de cicatrisation des plaies de LC.

Les mesures de viscosité des huiles MCT et SO sans extrait ont donné des valeurs moyennes respectives de 22 mPa.s et 58 mPa.s. L'SO étant plus visqueuse que MCT, ceci devrait défavoriser le phénomène de rupture des gouttelettes et donc conduire à une taille de goutte plus importante pour le système NE SO. La faible viscosité du MCT n'a donc pas contribué à diminuer la taille des gouttes dans les NEs MCT. L'effet de la tension interfaciale sur la taille de gouttes de la NE semble être prépondérant par rapport à celui de la viscosité de l'huile. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'étude d'Ali *et al.* qui a démontré que, pour des NEs préparées avec d'autres huiles (Miglyol 812, huile d'amande douce et huile de germe de blé), seule la viscosité de l'huile gouverne la taille des gouttes d'une NE préparées par HHP [46]. L'incorporation de l'extrait peut également modifier la viscosité de l'huile. Il serait donc intéressant d'évaluer ce paramètre pour les systèmes étudiés.

Les valeurs moyennes de potentiel zéta mesurées au 3^{ème} jour après la formulation pour les différentes NEs sont représentées dans la Fig.3.7.



Moyenne \pm Ecart-type (n = 3). L'analyse statistique a été réalisée par One-way-Anova avec le post-test Tukey en comparaison à NE 0% pour chaque système. Le niveau de significativité $p < 0,05$ est représenté par un astérisque rouge (*).

Figure 3.7: Potentiel zéta des nanoémulsions à différentes concentrations en extrait : 0 (m/m) % ; 0,1 (m/m) % ; 0,5 (m/m) % et 1 (m/m) %, respectivement pour le système à base MCT (NE MCT : en bleu) et le système à base d'huile de sésame (NE SO : en rose).

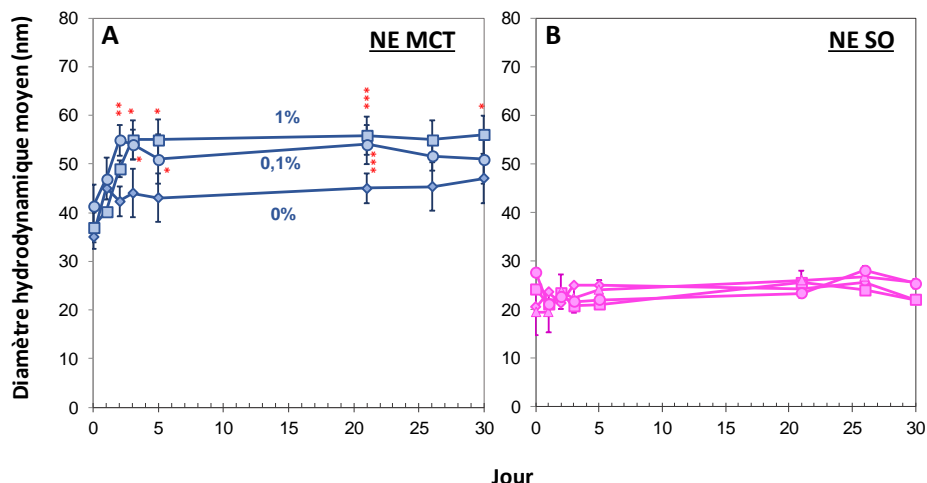
Le potentiel zéta des gouttelettes d'huile des différentes NEs préparées a présenté des valeurs négatives. Ces résultats sont en accord avec la charge globale de la β -lg puisque le pH de la phase aqueuse a été fixé à 7,0. En effet, cette valeur est supérieure au pI de la protéine se situant à $\approx 5,2$, ce qui explique la charge globale négative des globules [101].

Quelle que soit l'huile utilisée, MCT ou SO, l'encapsulation de l'extrait jusqu'à 0,5 % n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur la charge globale des gouttelettes, comparativement avec la NE sans extrait. Toutefois, pour une concentration plus importante (1 %), la charge globale des gouttelettes devient significativement plus élevée en valeur absolue ($p < 0,05$) que celle observée pour la NE sans extrait (0 %). A cette concentration, l'effet de l'adsorption de l'extrait à l'interface H/E semble être significatif pour modifier la charge globale des gouttelettes.

Il est à noter que la charge négative à la surface des gouttelettes pourrait contribuer à l'amélioration de l'activité biologique puisque les particules chargées négativement (nanoparticules greffées au carboxyméthyl chitosane marquées à la rhodamine B) ont été capables d'établir des interactions électrostatiques avec les membranes de macrophages murins conduisant à un effet phagocytaire renforcée, notamment pour les nanoparticules ayant une charge plus importante [102].

III.2.2. Stabilité des nanoémulsions sur 30 jours

La taille des nanogouttelettes ainsi que la stabilité physique des différentes NEs ont été suivies sur un mois (Fig. 3.8, 3.9 et 3.10). L'évolution sur 30 jours de la taille des gouttelettes diffère significativement en fonction du système de NE étudié.



Moyenne \pm écart-type ($n = 3$). L'analyse statistique a été réalisée par Two-way-Anova avec le posttest Bonferroni en comparaison aux NEs sans extrait (NE MCT 0 % ou NE SO 0 %). Les niveaux de significativité représentés par des astérisques sont définis comme suit : (*) : $p < 0,05$; (**) : $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$

Figure 3.8 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des nanoémulsions à différentes concentrations en extrait : (\diamond) 0 (m/m) %, (\square) 0,1 (m/m) % et (\circ) 1 (m/m) % pour le système à base MCT (NE MCT) (Figure 3.8-A) et : (\diamond) 0 (m/m) %, (\square) 0,1 (m/m) %, (Δ) 0,5 (m/m) % et (\circ) 1 (m/m) % pour le système à base d'huile de sésame (NE SO) (Figure 3.8-B)

Pour les NEs à base de MCT, tous les systèmes ont présenté des distributions de la taille des gouttes unimodales et étroites ($PDI < 0,2$) pendant 30 jours. L'évolution temporelle du diamètre hydrodynamique moyen des NEs contenant l'extrait à 0,1 % et 1 % est significativement à très significativement différente à celle de la NE sans extrait sur les 21 premiers jours de l'étude de stabilité (Fig. 3.8-A). La maturation de ces systèmes semble se dérouler sur 3 jours, atteignant en moyenne un diamètre hydrodynamique de 50 nm. Au-delà du 21^{ème} jour et jusqu'au 30^{ème} jour après la formulation, le diamètre hydrodynamique n'est pas significativement différent d'un système à un autre. Quelle que soit la concentration de l'extrait encapsulée, la taille des gouttelettes a augmenté après 30 jours de la formulation d'au moins 7 nm, n'excédant pas 60 nm.

Cependant, pour la NE MCT contenant 0,5% d'extrait, l'évolution temporelle du diamètre des gouttelettes a présenté un profil différent par rapport aux autres systèmes (Fig.3.9). En effet, la distribution des tailles s'est élargie de plus en plus à partir de J1 pour devenir bimodale à partir de J5. A J30 (courbe jaune), deux populations de gouttes sont visibles avec des diamètres hydrodynamiques centrés autour de 40 nm et 280 nm. L'augmentation de la taille des gouttes est probablement due à une coalescence. Cette NE a tendance à être moins stable sur le long terme. Ainsi, à cette concentration d'extrait (0,5%), l'effet de son incorporation dans la phase huileuse de la NE semble être le plus significatif sur la stabilité du système NE MCT. Des études complémentaires de stabilité pourraient être envisagées comme la rhéologie interfaciale afin de comparer les différents systèmes.

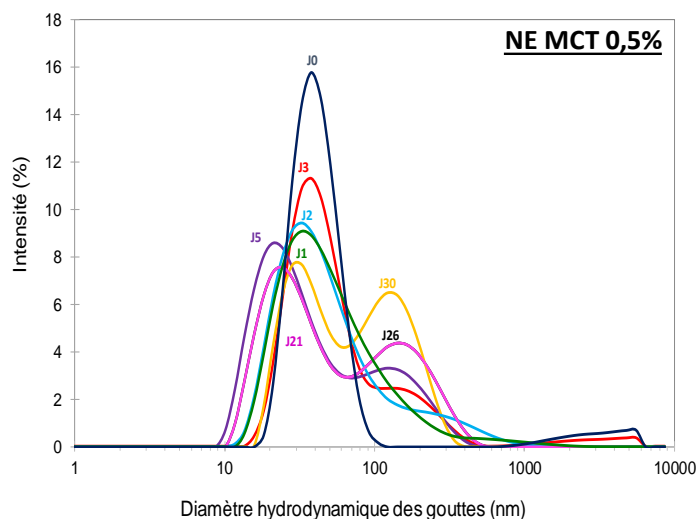


Figure 3.9 : Distribution de la taille des gouttelettes de la NE à base de MCT encapsulant 0,5 (m/m) % d'extrait à J0 (—), J1(—), J2 (—), J3(—), J5 (—), J21(—), J26 (—) et J30 (—). Les valeurs des pics sont indiquées pour chaque distribution.

Par ailleurs, la taille des gouttes des NEs à base d'huile de sésame (NE SO) semble être moins sensible à l'encapsulation de l'extrait, et évoluent moins au cours du temps (Fig. 3.8-B). Les

NEs à différentes concentrations d'extrait n'ont présenté aucune différence significative ($p > 0,05$) du diamètre hydrodynamique moyen des gouttes par rapport à NE SO sans extrait. Par ailleurs, ce diamètre n'a pas considérablement évolué sur 30 jours. Toutes ces NEs ont présenté une taille moyenne de gouttes ne dépassant pas les 30 nm.

Le suivi sur 30 jours de la stabilité physique de toutes les NEs par balayage optique, au Turbiscan[®], a prouvé que le comportement de ces dernières est similaire. Le type d'huile utilisée ainsi que la présence ou non de l'extrait dans la phase dispersée, n'ont aucune influence sur la stabilité physique de la NE. La tendance obtenue est illustrée par des courbes de l'intensité de rétrodiffusion pour l'exemple de la NE SO contenant 0,1 % d'extrait (Fig. 3-10).

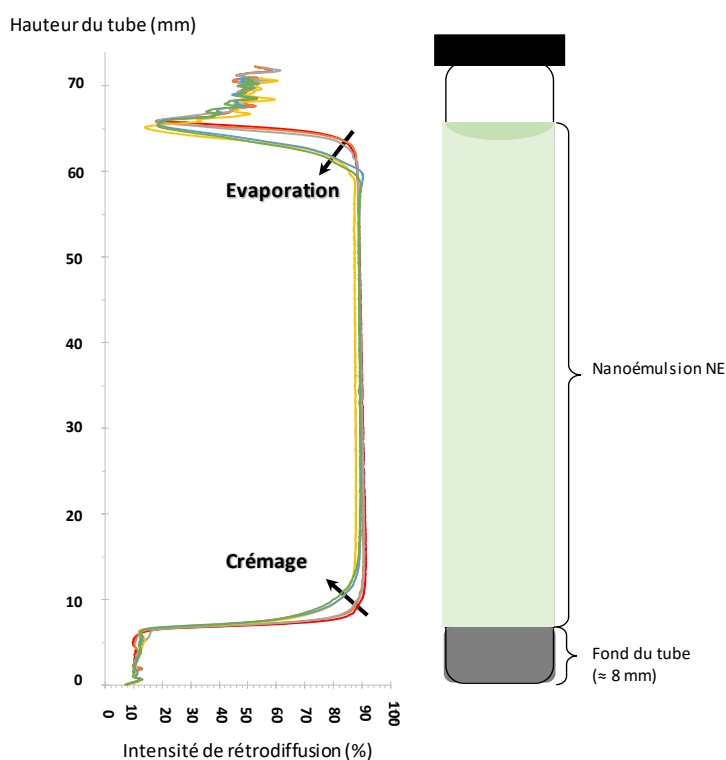


Figure 3.10 : Evolution de l'intensité rétrodiffusée au cours du temps obtenue par analyse au Turbiscan[®] à J0 (—), J1 (—), J3 (—), J5 (—), J7 (—), J21 (—) et J30 (—), pour les nanoémulsions avec ou sans extrait. Exemple représenté : NE SO 0,1%.

Au bout de 5 jours après la formulation (courbe jaune), une diminution de l'intensité rétrodiffusée au fond du tube indique un léger crémage. Ceci est dû à la migration des gouttelettes d'huile par différence de densité. Ce phénomène est réversible et l'état initial de l'émulsion pourrait se rétablir par simple agitation. Le crémage peut être limité, voire inhibé, par l'ajout dans la phase continue d'un épaississant comme la gomme xanthane (XG). En effet, il a été prouvé que cette gomme a la capacité d'inhiber le crémage des NEs par augmentation de la viscosité qui ralentirait la vitesse de migration des gouttelettes vers le haut de l'échantillon (selon la loi de Stokes) [60]. Dans notre cas, l'ajout de 1 (m/m) % XG a permis d'augmenter

la viscosité de la phase aqueuse, ce qui a assuré une viscosité initiale élevée de 23 Pa.s à la NE avec un comportement rhéofluidifiant (donnée non montrées). Ainsi, la contrainte seuil de la XG (τ_0), traduisant la valeur minimale de la limite d'élasticité, nécessaire pour stabiliser les nanogouttelettes et éviter le crémage, peut être calculée à l'aide de l'équation 2.

$$\tau_0 > \frac{4}{3} \Delta P g R \quad \text{Equation 2}$$

Où ΔP est la différence de densité entre les deux phases, g l'accélération gravitationnelle, et R la moyenne du rayon des gouttelettes.

Si nous supposons que la densité est d'environ $1 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ pour la phase aqueuse contenant les biopolymères (XG et β -lg) et de $0,9 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ pour la phase huileuse, $\Delta P \sim 100 \text{ kg/m}^3$. L'accélération gravitationnelle est considérée égale à 10 m/s^2 , et le rayon des gouttelettes est calculée à la base des diamètres moyens mesurés. La contrainte seuil est alors entre 26 et 16 mPa, respectivement pour les systèmes MCT NE et SO NE. Ces valeurs sont nettement inférieures aux valeurs expérimentales qui sont aux alentours de 2 Pa. Par conséquent, les gouttelettes sont immobilisées grâce à l'ajout de XG, ce qui leur confère une bonne stabilité contre le crémage. Une diminution de l'intensité de rétrodiffusion est observée dans la partie supérieure tube à partir du 5^{ème} jour après la formulation. Ceci est probablement dû à une légère évaporation dans le tube du Turbiscan.

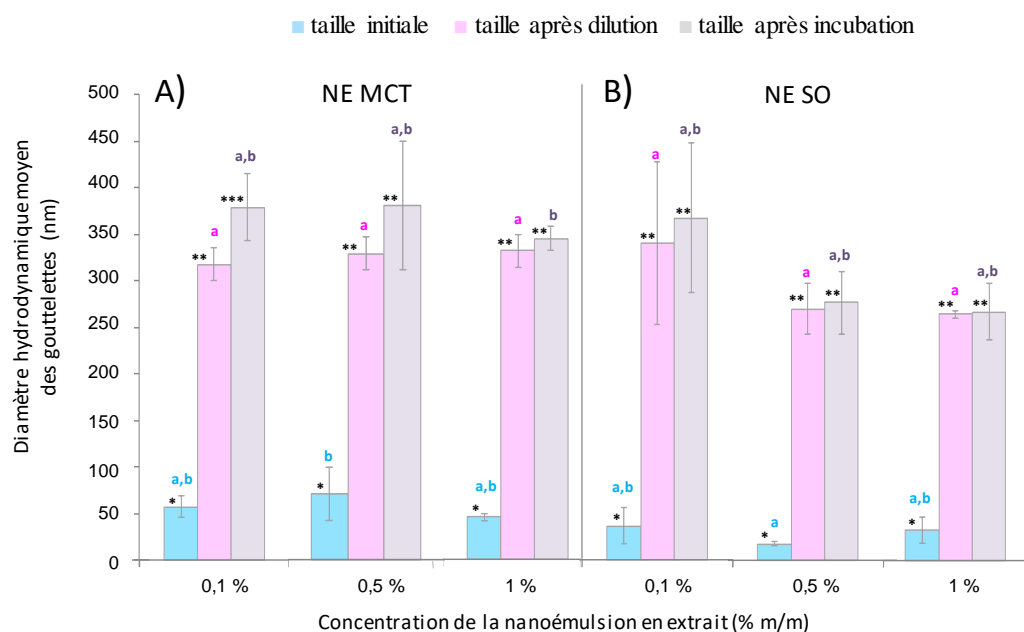
Par ailleurs, aucune variation de l'intensité de rétrodiffusion n'a été remarquée sur la hauteur du tube au cours du temps. Ceci indique qu'aucun autre phénomène de déstabilisation tel que la coalescence ou la floculation n'ont eu lieu.

III.3. Stabilité des nanoémulsions préparées dans le milieu de culture

L'objectif de cette étude était d'une part d'évaluer la stabilité macroscopique des systèmes étudiés dans le milieu de culture cellulaire- une instabilité pourrait biaiser les résultats de l'activité biologique obtenus - et d'autre part, de caractériser les systèmes lorsqu'ils sont en contact avec les cellules infectées. Pour cela, des mesures de tailles des gouttelettes ont été effectuées dans les mêmes conditions opératoires du test antileishmanien, c'est-à-dire d'une part tout de suite après dilution dans le milieu de culture, et d'autre part après dilution puis incubation à 37°C pendant 3 jours. Les résultats sont représentés par les histogrammes ci-après (Fig.3.11).

Les résultats des tailles de gouttelettes indiquent que toutes les NEs, quels que soient leur concentration en extrait ou le type d'huile, évoluent très significativement ($p < 0,001$) lorsqu'elles sont soumises aux conditions du test antiparasitaire. En effet, la taille des gouttelettes des NEs a augmenté très significativement après leur dilution dans le milieu de culture des cellules. Cependant, quel que soit le diamètre initial des gouttes, la distribution de

taille des NEs évolue vers des valeurs moyennes similaires ($p > 0,05$) aux alentours de 300 nm. L'étude de Sabuncu et *al.* a montré un comportement analogue de nanoparticules d'or après leur dilution dans le milieu de culture DMEM complété de SVF dont le diamètre, quelle que soit sa valeur initiale, augmentait considérablement [103]. Ce phénomène est le résultat de l'augmentation de la force ionique du milieu qui engendrerait des interactions entre les nanoparticules et les protéines présentes dans le milieu plus particulièrement le SVF, notamment l'albumine qui y est généralement la plus abondante. Deux hypothèses pourraient être envisagées : des liaisons électrostatiques pourraient avoir lieu entre les résidus de surface chargés des protéines du milieu et les groupes de surfaces chargés des nanoparticules, ou bien la monocouche stabilisante à la surface des nanoparticules serait remplacée par des protéines par phénomène d'adsorption [103].



Moyenne \pm écart-type ($n = 3$). L'analyse des variances a été réalisée en utilisant one-way Anova avec le post-test Tukey à partir d'un niveau de significativité $p < 0,05$. Les résultats des différents tests Anova sont marqués en astérisques ou lettres sur les histogrammes. Les lettres indiquent les résultats de la comparaison entre les histogrammes de même couleur c'est-à-dire la comparaison des NEs à différentes concentrations d'extrait à la même condition. Les astérisques indiquent la comparaison des histogrammes d'une NE à une concentration d'extrait donnée à différentes conditions. Les lettres/astérisques différents révèlent une différence significative ($p < 0,05$: * ou a) ; ($p < 0,005$: ** ou a,b) ; ($p < 0,001$: *** ou b).

Figure 3.11 : Suivi de la taille des gouttelettes des différentes nanoémulsions, préparées à des concentrations de 0,1%, 0,5% et 1% en extrait, (■) avant dilution, (■) après dilution dans les puits de la plaque, et (■) après dilution puis incubation à 37°C pendant 3 jours.

Dans notre cas, les nanogouttelettes d'huile sont stabilisées par un film interfacial de protéine (β -lg). La répulsion électrostatique est le principal mécanisme qui empêche la floculation des gouttelettes. La stabilité de ces systèmes est donc particulièrement sensible à la variation du pH

et de la force ionique [62]. Notons que le pH du DMEM, selon le fournisseur, est compris entre 7,0 et 7,4. Ceci n'a donc pas induit de variation significative du pH des NEs (fixé à 7,0). Ainsi, la dilution dans le milieu de culture n'a pas induit de variation de la charge globale nette des nanogouttelettes qui est négative suite à l'ionisation des groupements carboxyles charge normalement suffisamment importante pour empêcher le rapprochement et la floculation des gouttelettes. Cependant, l'augmentation très significative de la force ionique du milieu présente vraisemblablement le facteur principal à l'augmentation du diamètre des gouttelettes des NEs. En effet, le milieu de culture cellulaire constitué de DMEM supplémenté de 10 (v/v) % de SVF possède une composition très complexe en sucres (forte concentration en glucose), protéines (albumines), acides aminés (dont la L-glutamine), lipides, vitamines, des facteurs de croissance cellulaire, et des ions (provenant du tampon HEPES, acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique). Il s'agit d'un milieu de force ionique très élevée. Ceci entraîne l'écrantage des charges à la surface des gouttelettes et la diminution des interactions électrostatiques [87]. Il en résulterait la floculation et la coalescence des globules d'une part et l'agrégation de la protéine en excès dans la phase continue.

Les histogrammes violets indiquent que l'effet de l'incubation à 37°C des NEs pendant 3 jours n'est pas significatif par rapport aux NEs déjà diluées dans le milieu de culture. Ceci est vrai pour toutes les NEs, quel que soit leur type (à MCT ou à SO) et leur teneur en extrait, sauf pour la NE MCT à 0,1% ($p < 0,001$). La taille des gouttelettes de cette NE a très significativement augmenté après dilution puis incubation à 37°C pour atteindre un diamètre moyen d'environ 450 nm.

Par ailleurs, d'après les résultats de la distribution de la taille des gouttes des systèmes étudiés (données non montrées), la dilution des NEs dans le milieu de culture et leur incubation à 37°C n'a pas induit un élargissement notable de la distribution, ni une augmentation significative du PDI. En effet, pour tous les systèmes étudiés, le PDI a présenté une valeur inférieure ou égale à 0,2. Ceci révèle une distribution étroite de ces systèmes.

Il est important de mentionner que l'observation macroscopique de ces NEs après leur dilution dans le milieu DMEM et après leur incubation à 37°C a montré que, malgré l'augmentation très importante de la taille des gouttelettes, aucun déphasage n'a été visible pour tous ces systèmes. Cette information est fondamentale pour la validation des tests d'activité antiparasitaire. En effet, le déphasage d'une NE résultant en la migration de la phase huileuse en haut du puits défavoriserait les échanges gazeux des cellules et provoquerait la mortalité cellulaire, biaisant ainsi les résultats de l'activité antileishmanienne et de cytotoxicité.

III.4. Activité antileishmanienne et cytotoxicité des différents systèmes

Les concentrations d'inhibition à 50% (IC₅₀) illustrant l'activité des différentes NEs préparées sur la forme intramacrophagique de la souche *Leishmania major* sont représentées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2: Activité antileishmanienne et cytotoxicité des différents systèmes de nanoémulsions à base de MCT (NE MCT) ou d'huile de sésame (NE SO) contenant ou non l'extrait.

Echantillon	Activité antileishmanienne		Cytotoxicité Cellules Raw264.7 CC ₅₀ (µg/mL)	SI CC ₅₀ /IC ₅₀
	Concentration* finale en extrait	<i>L. major</i> Amastigotes intramacrophagiques IC ₅₀ (µg/mL)		
NE MCT	0 %	41,9 ± 16,1 ^{3,4}	38,0 ± 6,3	-
	0,1 %	0,3 ± 0,1 ¹	6,0 ± 0,4	21,4 ± 6,1 ^b
	0,5 %	3,3 ± 0,8 ¹	22,1 ± 2,8	6,8 ± 0,8 ^{a,b}
	1 %	28,4 ± 6,1 ^{3,4}	15,3 ± 4,5	-
NE SO	0 %	42,5 ± 8,9 ⁴	15,3 ± 5,4	-
	0,1 %	0,7 ± 0,1 ¹	3,4 ± 0,4	4,9 ± 0,1 ^{a,b}
	0,5 %	7,1 ± 0,9 ^{1,2}	10,4 ± 1,9	1,5 ± 0,1 ^a
	1 %	23,5 ± 5,4 ^{2,3}	10,2 ± 2,0	-
Extrait brut		4,4 ± 1,1 ¹	30,4 ± 1,7	6,9 ± 2,3 ^{a,b}
HePC		1,3 ± 0,4 ¹	62,1 ± 4,4	47,8 ± 0,3 ^c

*Concentration en (m/m) %

NE MCT : nanoémulsion préparée avec MCT comme phase huileuse et contenant une concentration donnée d'extrait (0% ; 0,1% ; 0,5% ou 1%).

NE SO : nanoémulsion préparée avec l'huile de sésame raffinée comme phase huileuse et contenant une concentration donnée d'extrait (0% ; 0,1% ; 0,5% ou 1%).

Extrait : extrait d'acétone des feuilles de *Citrus limon* ; HePC : miltéfosine, servant de contrôle positif

Moyenne ± écart-type (n = 6). L'analyse des variances a été réalisée en utilisant one-way Anova avec le post-test Tukey à partir d'un niveau de significativité p < 0,05 pour la comparaison des moyennes dans une colonne. Les valeurs de moyenne suivies par des lettres ou des chiffres différents dans la même colonne sont significativement différents (p < 0,05 ; p < 0,005 ou p < 0,001). Les CC₅₀ ainsi que les SI (indices de sélectivité) n'ont pas été calculées pour les échantillons inactifs (IC₅₀ > 20 µg/mL) ; SI = CC₅₀ / IC₅₀ ; IC₅₀ = concentration correspondant à l'inhibition de 50% des amastigotes intramacrophagiques (*Leishmania major*) ; CC₅₀ = concentration correspondant à l'inhibition de 50% des cellules Raw264.7.

Aucune activité (IC₅₀ > 20 µg/mL) n'a été observée pour les NEs ne contenant pas l'extrait, quelle que soit l'huile utilisée. Il est également à noter que l'évaluation *in vitro* de tous les constituants de la NE (PB, azide de sodium, β-Ig, huiles...) aux concentrations dans la formulation a été réalisée et aucun effet antileishmanien notable n'a été obtenu (données non montrées). L'effet antiparasitaire des autres NEs provient donc exclusivement de la présence de l'extrait dans la phase dispersée du système.

L'efficacité antileishmanienne des NEs contenant l'extrait varie très significativement ($p < 0,001$) en fonction de la concentration de l'extrait, mais elle ne dépend pas du type d'huile utilisée ($p > 0,05$).

En effet, pour les deux types de NEs, l'encapsulation d'une concentration plus importante d'extrait a entraîné la diminution de l'efficacité antileishmanienne de la formulation. Les NEs à 0,1% (type MCT ou SO) ont été les plus actives contre les *L. major* intramacrophagiques et ont démontré la meilleure efficacité antileishmanienne avec des IC_{50} variant de 0,2 à 0,8 $\mu\text{g/mL}$. L'encapsulation de l'extrait à 0,5% a entraîné une diminution d'activité de la NE, par rapport à NE 0,1 %. Néanmoins, les IC_{50} des NEs à 0,5 %, ne dépassant pas les 8 $\mu\text{g/mL}$, révèlent une efficacité antileishmanienne très intéressante. L'activité des NEs à 0,1%, quelle que soit leur composition, et celle de la NE MCT à 0,5% sont très significativement proches ($p > 0,05$) de celle du contrôle positif, la miltéfosine. De plus, statistiquement, il n'existe aucune différence significative ($p > 0,05$) entre l'activité antiparasitaire de ces NEs et celle de l'extrait brut. Ceci démontre que l'encapsulation de l'extrait au sein d'une NE, de type MCT ou SO, à des concentrations inférieures ou égales à 0,5% n'altère pas son activité antileishmanienne contre les amastigotes intramacrophagiques du *L. major*. Néanmoins, l'encapsulation d'une concentration plus élevée de l'extrait (1%) dans la NE, à MCT ou à SO, a entraîné une diminution significative de l'activité antileishmanienne, voire son inactivation. Les valeurs d' IC_{50} ont révélé que les deux systèmes à 1% d'extrait n'inhibent pas la prolifération des amastigotes intramacrophagiques de *L. major* ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$). Nous pouvons donc en conclure qu'au-delà de 0,5% dans la NE, l'extrait acétone de *Citrus* perd son efficacité antileishmanienne.

Cette variation considérable de l'activité anti-amastigotes intramacrophagiques en fonction de la quantité d'extrait encapsulé dans un même système a suscité notre intérêt. Dans le paragraphe III.3, il a été démontré que, suite à la dilution des NEs dans le milieu de culture, quel que soit le type d'huile ou la concentration en extrait, le diamètre des gouttes évolue vers une valeur moyenne similaire. Ainsi, la différence très significative d'activité antileishmanienne observée entre les NEs ne serait pas liée à la taille de gouttelettes, qui, d'après la littérature, est un facteur significativement influant sur l'activité biologique des nanosystèmes [104]. L'activité antiparasitaire observée dans notre cas est due au nombre de nanogouttelettes introduites dans les puits de la plaque. En effet, le seul paramètre que nous avons fait varier a été le volume de NEs introduit dans les puits. Par rapport à une NE à 1% d'extrait, ce volume a été deux fois plus important que pour une NE à 0,5% et 10 fois plus important pour une NE à 0,1% (Fig. 3.5). Pour ces différents volumes, nous avons calculé le

nombre de gouttelettes pour chaque système suite à la dilution dans le milieu de culture des cellules (à la concentration fixe en extrait de 100 mg/mL) suivant l'équation 3.

$$N = \frac{V_{\text{huile}}}{V_{\text{goutte}}} = \frac{V_{\text{huile}}}{\frac{4}{3}\pi\left(\frac{d}{2}\right)^3} = \frac{6 V_{\text{huile}}}{\pi d^3} \quad \text{Equation 3}$$

avec : N : nombre de goutte dans un puits ; V_{goutte} : volume d'une goutte ; V_{huile} : volume d'huile introduit dans le puits ; d : diamètre d'une goutte.

Le diamètre moyen des nanogouttelettes utilisé pour chaque système est celui déterminé suite à l'étude de stabilité des NEs dans le milieu de culture des cellules (Fig. 3.11).

Connaissant le nombre de cellules infectées introduites par puits, nous avons ainsi pu calculer le nombre de gouttes de NEs, n, par macrophage à une concentration en extrait donnée. Les résultats révèlent qu'en moyenne, par rapport à un puits contenant une NE à 1%, il existe deux fois plus de nanogouttes (2n gouttes) par macrophage dans un puits contenant une NE à 0,5% et environ six fois plus de nanogouttes par macrophage dans un puits contenant une NE à 0,1% (Fig. 3.12).

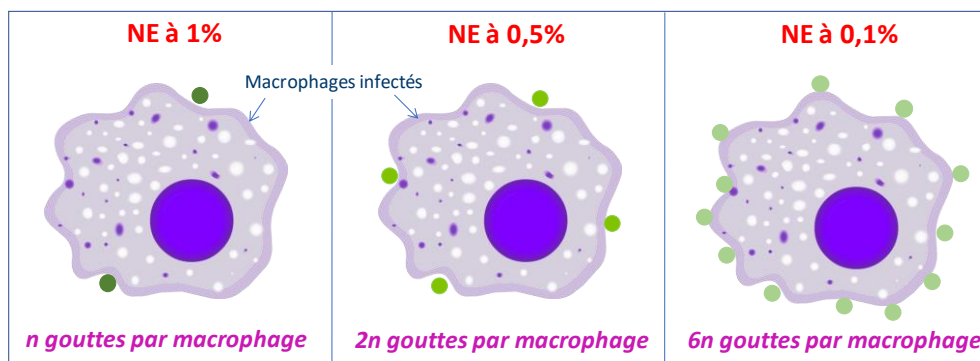


Figure 3.12 : Représentation schématique du nombre de nanogouttelettes (●) par macrophage dans un puits en fonction de la concentration d'extrait

Par conséquent, l'efficacité anti-amastigotes intramacrophagiques semble augmenter avec l'augmentation du nombre de gouttelettes de la NE en contact avec la cellule infectée. En effet, il semble que plus le macrophage infecté est entouré de nanogouttes d'huile plus la probabilité que l'extrait interagisse avec le macrophage est importante. Ceci pourrait expliquer la perte d'activité observée pour les NEs contenant 1 % d'extrait. Ainsi, ces résultats ont permis de déceler un nouveau paramètre qui aurait un effet significatif dans l'étude de l'activité antiparasitaire d'un système d'encapsulation comme les NEs plutôt que la concentration finale de l'extrait. Le nombre de particules par cellule a été largement étudié dans l'évaluation de l'activité biologique plus particulièrement pour le cas des nanoparticules. Par exemple, Gaumet *et al.* se sont basés sur ce paramètre afin d'évaluer la cytotoxicité sur la lignée Caco-2 de nanoparticules préparées à base de polymères de natures et de densités différentes. La concentration des nanoparticules a été donc exprimée en termes de nombre de particules par

cellule plutôt qu'en concentration massique dans les puits afin de tenir compte de la différence de densité des deux polymères utilisés. La méthodologie développée dans cet article a permis de quantifier le nombre de particules capables d'interagir avec une cellule Caco-2 [105]. Par analogie, il serait intéressant de déterminer l'efficacité antileishmanienne ainsi que la cytotoxicité du système en faisant varier le paramètre nombre de gouttelettes par cellule infectée ou non de *Leishmania major*. Néanmoins, pour obtenir des informations pertinentes, il est nécessaire que les systèmes étudiés présentent des tailles bien définies et contrôlées avec une distribution de taille étroite.

La cytotoxicité des différentes NEs testées a été significativement différente ($p < 0,05$) d'un système à un autre, aussi bien en fonction de l'huile utilisée qu'en fonction de la concentration d'extrait dans la formulation. D'après les valeurs de SI, l'encapsulation de l'extrait à une concentration de 0,1 % et 0,5 % dans NE SO et à une concentration de 0,5 % dans NE MCT n'a pas permis d'obtenir des valeurs de SI supérieures à 10, montrant que ces systèmes sont tous cytotoxiques et non sélectifs aux parasites. Par rapport à l'extrait brut, NE SO 0,1 % et NE MCT 0,5 % n'ont pas des valeurs de SI significativement différentes ($p > 0,05$). Ceci prouve que le fait d'encapsuler l'extrait dans la phase dispersée d'une NE ne contribue pas à la diminution de sa toxicité. Par ailleurs, l'encapsulation de l'extrait à 0,5 % dans NE SO a diminué très significativement ($p < 0,005$) sa valeur de SI, ce qui prouve que ce système d'encapsulation a augmenté sa toxicité. Seule la formulation NE MCT 0,1 % a démontré une efficacité très intéressante par l'élimination très significative ($p < 0,001$) de la cytotoxicité de l'extrait (SI ~ 21) : sa sélectivité a été améliorée d'au moins 3 fois, une fois encapsulé, tout en éliminant sa toxicité aux macrophages.

Malgré son activité antileishmanienne considérable, il en découle que le système NE SO (à 0,1 % ou 0,5 %) ne permet pas de diminuer la cytotoxicité de l'extrait. Ainsi, le choix de l'huile à utiliser est un paramètre crucial dans la préparation des NEs à visée pharmaceutique dans la mesure où celle-ci détermine la cytotoxicité de tout le système. La toxicité aux cellules hôtes des NE à base de SO par rapport à celle des NE à base de MCT serait probablement due à la différence de composition en triglycérides de celles-ci. L'huile MCT est principalement composée d'acide caprylique (70% d'acide caprylique (C8) et 30% d'acide caprique (C10)). Il s'agit d'acides gras plus courts que dans l'SO, qui est composée de triglycérides (principalement avec des acides oléique et linoléique). Il a été précédemment démontré que les acides gras à chaînes courtes et moyennes possédaient une activité anti-inflammatoire sur les macrophages Raw264.7 en améliorant l'expression des cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, la suractivation des macrophages était limitée et par conséquent la mort cellulaire [106]. Il a également été démontré que l'acide caprylique supprimait la sécrétion d'IL-8 dans les cellules Caco-2 [107].

Pour l'étude de l'efficacité de l'extrait encapsulé sur le modèle animal expérimental de leishmaniose cutanée à *L. major*, le système NE MCT 0,1% semble donc être le plus prometteur. Cependant, malgré sa cytotoxicité, nous avons aussi retenu le système NE SO 0,1% car le pouvoir cicatrisant et les propriétés inflammatoires de l'huile de sésame [108] pourrait jouer un rôle *in vivo* dans le traitement des lésions antileishmaniennes .

IV. Conclusion

L'objectif de cette étude a été de développer un système d'encapsulation de l'extrait acétonique de citronnier qui permettrait l'amélioration de son efficacité antileishmanienne.

En première étape, une étude préliminaire a été réalisée visant à optimiser les conditions d'obtention d'un système de NE stabilisée par la β -lg pour encapsuler cet extrait. Pour cela, nous avons eu recours à la méthodologie des plans d'expériences pour déterminer les paramètres optimaux de la formulation de NEs, répondant à certains critères qui sont principalement un diamètre hydrodynamique des gouttes moyen minimal et un PDI inférieur à 0,2. Deux NEs ont donc été sélectionnées à base de deux huiles différentes : MCT et SO. Ensuite, nous avons effectué des essais d'encapsulation de l'extrait à différentes concentrations (0,1, 0,5 et 1 %) dans la NE. La sélection du système de NE le plus prometteur a été réalisée par rapport à certains critères qui sont l'activité antileishmanienne *in vitro* contre les amastigotes intramacrophagiques, la cytotoxicité sur les cellules hôtes et la stabilité physicochimique au cours du temps. Le système retenu pour passer à l'évaluation de l'efficacité antileishmanienne *in vivo* est la NE MCT à 0,1 % qui a prouvé une grande sélectivité aux parasites et une toxicité minimale aux cellules hôtes ($SI = 21,4 \pm 6,1$). Par ailleurs, ce système a montré une activité très intéressante, analogue à celle de la miltéfosine.

Par ailleurs, en dépit de sa toxicité, nous avons décidé de sélectionner également le système le plus actif à base d'SO (NE SO 0,1%) car nous estimons que l'huile pourrait avoir un effet anti-inflammatoire et cicatrisant [107] sur le modèle animal de leishmaniose cutanée à *L. major*.

Références bibliographiques

- [1] E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.L. Grossiord, F. Agnely, Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 359–378.
- [2] A. Araiza-Calahorra, M. Akhtar, A. Sarkar, Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility, *Trends Food Sci. Technol.* 71 (2018) 155–169.
- [3] J.P. Ley, Masking bitter taste by molecules. *Chemosens. Percept.*, *Chemosens. Percept.* 1 (2008) 58–77.
- [4] B. Brime, M.A. Moreno, G. Frutos, M.P. Ballesteros, P. Frutos, Amphotericin B in oil–water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation., *J. Pharma. Sci.* 91 (2002) 1178–1185.
- [5] A. Kogan, N. Garti, Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 369–385.
- [6] J.L. Grossiord, M. Stambouli, Potentialities of W/O/W multiple emulsions in drug delivery and detoxification. In: Aserin, A. (Ed.) John Wiley and Sons, Inc, New Jersey, in: *Mult. Emuls. Technol. Appl.*, 2008: pp. 209–234.
- [7] U.M. Musazzi, S. Franzè, P. Minghetti, A. Casiraghi, Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product?, *Drug Deliv. Transl. Res.* 8 (2018) 414–421.
- [8] K. Jain, Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice, *Med. Princ. Pr.* 17 (2005) 89e101.
- [9] M. Goutayer, Nano-émulsions pour la vectorisation d’agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*, 2008.
- [10] D.J. McClements, H. Xiao, Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics, *Food Funct.* 3 (2012) 202–220.
- [11] S. Saraf, Applications of novel drug delivery system for herbal formulations, *Fitoterapia.* 81 (2010) 680–6.
- [12] J. Rutvij, J. Gunjan, P. Bharadia, V. Pandya, D. Modi, Nanoemulsion: An advanced concept of dosage form., *Int. J. Pharm. Cosmetol.* 1 (2011) 122–133.
- [13] S.A. Chime, F.C. Kenechukwu, A.A. Attama, Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery, *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.* (2014).
- [14] R. Saffie-Siebert, J. Ogden, M. Parry-Billings, Nanotechnology approaches to solving the problems of poorly water-soluble drugs, *Drug Discov. World.* 6 (2005) 71–76.
- [15] M. Sharma, R. Sharma, D.K. Jain, Nanotechnology Based Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Antihypertensive Drugs, *Scientifica (Cairo)*. 2016 (2016).
- [16] A.L. Siefert, A. Ehrlich, M.J. Corral, K. Goldsmith-Pestana, D. McMahon-Pratt, T.M. Fahmy, Immunomodulatory nanoparticles ameliorate disease in the *Leishmania* (Viannia) panamensis mouse model, *Biomaterials.* 108 (2016) 168–176.
- [17] E. Coelho, T. Ribeiro, L. Fuscaldi, M. Santos, M. Duarte, P. Lage, V. Martins, L. Costa, S. Diniz, V. Cardoso, R. Castilho, M. Soto, M. Fumagalli, J. Ribeiro, A. Faraco, An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis., *Int. J. Nanomedicine.* 19 (2014) 5341–5353.
- [18] S. Gupta, A. Pal, S.P. Vyas, Drug delivery strategies for therapy of visceral leishmaniasis, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 371–402.

- [19] L.R. Caldeira, F.R. Fernandes, D.F. Costa, F. Frézard, L.C.C. Afonso, L.A.M. Ferreira, Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis, *Eur. J. Pharm. Sci.* 70 (2015) 125–131.
- [20] L. Koester, C. Mattos, D. Argenta, G. Melchiades, M. Cordeiro, M. Tonini, M. Moraes, T. Weber, S. Roman, R. Nunes, H. Teixeira, M. Steindel, Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 5529.
- [21] L.G. Lucca, S.P. de Matos, B.T. Borille, D. de O. Dias, H.F. Teixeira, V.F. Veiga, R.P. Limberger, L.S. Koester, Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 104 (2015) 144–148.
- [22] A.R. de Moraes, G.D. Tavares, F.J. Soares Rocha, E. de Paula, S. Giorgio, Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections, *Exp. Parasitol.* 187 (2018) 12–21.
- [23] É. da Silva Santos, F.P. Garcia, P.M. Outuki, J. Hoscheid, P.R. Nunes de Goes, L. Cardozo-Filho, C.V. Nakamura, M.L. Carvalho Cardoso, Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts, *Exp. Parasitol.* 170 (2016) 252–260.
- [24] T.A. Wani, F.A. Masoodi, S.M. Jafari, D.J. McClements, *Safety of Nanoemulsions and Their Regulatory Status*, Elsevier Inc., 2018.
- [25] R. Batchelder, R. Calder, C. Tomas, C. Heard, In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Camellia sinensis*, *Int. J. Pharm.* 612 (2004) 45–51.
- [26] J.Y. Fang, H.T. Wang, Y. Huang, C. Fang, Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol, *Int. J. Pharm.* 310 (2006) 131–138.
- [27] J. Suppasrivassuth, R.A. Bellantone, F.M. Plakogiannis, G. Stagni, Permeability and retention studies of (-) epicatechin gel formulations in human cadaver skin., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32 (2006) 1007–1017.
- [28] Y.P. Lu, Y.R. Lou, J.G. Xie, Q.Y. Peng, J. Liao, C.S. Yang, M.T. Huang, Topical applications of caffeine or (-)-epicatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumours in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 12455–12460.
- [29] R. Harwansh, P. Mukherjee, S. Bahadur, R. Biswas, Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress, *Life Sci.* 141 (2015) 202–211.
- [30] H. Rachmawati, D.K. Budiputra, R. Mauludin, Curcumin nanoemulsion for transdermal application: formulation and evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41 (2015) 560–6.
- [31] H. Chaudhary, K. Kohli, V. Kumar, A novel nano-carrier transdermal gel against inflammation, *Int. J. Pharm.* 465 (2014) 175–186.
- [32] S. Surbhi, S. Kumkum, Nanoemulsions for cosmetics., *Int. J. Adv. Res. Pharma. Bio. Sci.* 2 (2012) 408–415.
- [33] D. Subhashis, J. Satayanarayana, V. Gampa, Nanoemulsion-a method to improve the solubility of lipophilic drugs., *Int. J. Adv. Pharm. Sci.* 2 (2011) 72–83.
- [34] L. Charles, A. Attama, Current state of nanoemulsions in drug delivery., *J. Biomat. Nanobiotech.* 2 (2011) 626–639.
- [35] M. Prausnitz, S. Mitragotri, R. Langer, Current status and future potential of transdermal drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 115–124.
- [36] S. Abolmaali, A. Tamaddon, F.S. Farvadi, S. Daneshamuz, H. Moghimi, Pharmaceutical nanoemulsions and their potential topical and transdermal applications, *Iran. J. Pharm. Sci.* 7 (2011) 139–150.
- [37] H.A. Benson, Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques, *Curr. Drug Deliv.* 2 (2005) 23–33.

- [38] K. Paudel, M. Milewski, C. Swadley, N. Brogden, P. Ghosh, A. Stinchcomb, Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery, *Ther. Deliv.* 1 (2010) 109–131.
- [39] B.K. Setya, S. Talegaonkar, S. Razdan, Nanoemulsions: Formulation Methods and Stability Aspects, *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2 (2014) 2214–2228.
- [40] D.J. McClements, Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance., *Soft Matter.* 7 (2011) 2297–2316.
- [41] M. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, Nano-emulsions., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 102–110.
- [42] D.J. McClements, J. Rao, Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 (2011) 285–330.
- [43] J. Floury, A. Desrumaux, J. Lardières, Effect of High-pressure Homogenization on Droplet Size Distributions and Rheological Properties of Model Oil-in-water Emulsions, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1 (2000) 127–134.
- [44] www.emulsifyingmixer.com: S. Su, How to Decide Whether a High Press. Homog. or a High Shear Mix. Is Your Best Option? (2017).
- [45] C. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, Formation and stability of nano-emulsions., *Adv. Colloid Interf. Sci.* 108 (2004) 303–318.
- [46] A. Ali, G. Mekhloufi, N. Huang, F. Agnely, β -lactoglobulin stabilized nanemulsions-Formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability, *Int. J. Pharm.* 500 (2016) 291-304.
- [47] D.J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques.*, CRC Press, 2015.
- [48] P. Taylor, Ostwald Ripening in Emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 75 (1998) 107–185.
- [49] J.L. Salager, A. Forgiarini, L. Marquez, *Nanoemulsions.*, Universidad de Los Andes, Venezuela, 2006.
- [50] T.J. Wooster, M. Golding, P. Sanguansri, Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability, *Langmuir.* 24 (2008) 12758–12765.
- [51] B. Deminiere, A. Colin, F. Leal-Calderon, J.F. Muzy, J. Bibette, Cell Growth in a 3d Cellular System Undergoing Coalescence, *Phys. Rev. Lett.* 82 (1999) 229–232.
- [52] E. Nazarzadeh, T. Anthonypillai, S. Sajjadi, On the Growth Mechanisms of Nanoemulsions., *J. Colloid Interface Sci.* 397 (2013) 154–162.
- [53] N. Solans, C., Esquena, J., Forgiarini, A. M., Usón, N., Morales, D., Izquierdo, P., Azemar, *Nano-Emulsions: Formation, Properties, and Applications.*, 2002.
- [54] E. Dickinson, A Model of a Concentrated Dispersion Exhibiting Bridging Flocculation and Depletion Flocculation, *J. Colloid Interface Sci.* 132 (1989) 274–278.
- [55] M. Scherlunda, M. Malmstenb, A. Brodina, Stabilization of a thermosetting emulsion system using ionic and nonionic surfactants., *Int. J. Pharma.* 173 (1998) 103–116.
- [56] G. Cserháti, T., Forgács, E., Oros, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants., *Environ. Int.* 28 (2002) 337–348.
- [57] J. Liwarska-Bizukoje, E., Miksch, K., Malachowska-Jutysz, A., Kalka, Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and non-ionic surfactants., *Chemosphere.* 58 (2005) 1249–1253.
- [58] G. Buggins, T.R., Dickinson, P.A., Taylor, The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1482–1503.
- [59] H.I. Effendy, I., Maibach, Surfactants and experimental irritant contact dermatitis., *Contact Dermat.* 33 (1995) 217–225.
- [60] A. Ali, *Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline*, 2016.
- [61] E.A. Foegeding, J.P. Davis, *Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach.*, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1853–1864.

- [62] D.J. McClements, Protein-stabilized emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9 (2004) 305–313.
- [63] P. Walstra, *Physical Chemistry of Foods*. Marcel, in: Dekker, Ne, 2003.
- [64] B.H.W. Beverung, C. J., Radke, C. J., Protein Adsorption at the Oil/water Interface: Characterization of Adsorption Kinetics by Dynamic Interfacial Tension Measurements., *Biophys. Chem.* 81 (1999) 59–80.
- [65] A. Bos, T. Vliet, Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: a Review., *Adv. Colloid Interface Sci.* 91 (2001) 437–471.
- [66] E. Freer, K. Yim, G. Fuller, C. J. Radke, Interfacial rheology of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface: comparison of shear and dilatation deformation, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 3835–3844.
- [67] H.J. Kim, E.A. Decker, Role of postadsorption conformation changes of β -lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH, *Langmuir.* 18 (2002) 7577–7583.
- [68] H.J. Kim, E.A. Decker, Impact of protein surface denaturation on droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem.* 50. (2002) 7131–7137.
- [69] F.J. Monahan, D.J. McClements, J.E. Kinsella, Polymerization of Whey Proteins in Whey Protein-stabilized Emulsions., *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 1826–1829.
- [70] E. Dickinson, Y. Matsumura, Time-dependent Polymerization of β -lactoglobulin Through Disulfide Bonds at the Oil-water Interface in Emulsions., *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 26–30.
- [71] E. Dickinson, Milk Protein Interfacial Layers and the Relationship to Emulsion Stability and Rheology., *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 20 (2001) 197–210.
- [72] S. Tcholakova, N.D. Denkov, I.B. Ivanov, B. Campbell, Coalescence Stability of Emulsions Containing Globular Milk Proteins., *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 259–293.
- [73] S. Damodaran, *Amino Acids, Peptides and Proteins.*, 1996.
- [74] D. Guzey, D.J. McClements, Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by β -lactoglobulin-pectin Complexes., *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 475–485.
- [75] A.C. Karaca, N. Low, M. Nickerson, Emulsifying Properties of Chickpea, Faba Bean, Lentil and Pea Proteins Produced by Isoelectric Precipitation and Salt Extraction., *Food Res. Int.* 44 (2011) 2742–2750.
- [76] C. Qian, E.A. Decker, H. Xiao, M.D. J., Physical and Chemical Stability of β -carotene-enriched Nanoemulsions: Influence of pH, Ionic Strength, Temperature, and Emulsifier Type., *Food Chem.* 132 (2012) 1221–1229.
- [77] D.J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*, 2nd editio, CRC Press Taylor & Francis Group., 2005.
- [78] J. Kim, M.T. Ochoa, S.R. Krutzik, O. Takeuchi, S. Uematsu, A.J. Legaspi, H.D. Brightbill, D. Holland, W.J. Cncliffe, S. Akira, P.A. Sieling, P.J. Godowski, R.L. Modlin, Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Yriggers Inflammatory Cytokine Responses., *J. Immunol.* 169 (2002) 1535–1541.
- [79] J. Benjamins, *Static and Dynamic Properties of Proteins Adsorbed at Liquid Interfaces.*, University of Wageningen Netherlands., 2000.
- [80] V.B. Fainerman, E.H. Lucassen-Reynders, R. Miller, Description of the Adsorption Behaviour of Proteins at Water/Fluid Interfaces in the Framework of a Two-dimensional Solution Model., *Adv. Colloid Interface Sci.* 106 (2003) 237–259.
- [81] A.R. Mackie, M.J. Ridout, G. Moates, F.A. Husband, P.J. Wilde, Effect of the Interfacial Layer Composition on the Properties of Emulsion Creams., *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5611–5619.

- [82] Kontopidis, G., C. Holt, L. Lawyer, Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding properties, structure, and function., *J Dairy Sci.* 87 (2004) 785–796.
- [83] R. Towend, R.J. Winterbottom, S. Timasheff, Molecular interactions in β -lactoglobulin. Ultracentrifugal and Electrophoretic Studies of the association of B-Lactoglobulin below its Isoelectric Point, 82 (1960) 3161–3168.
- [84] D.G. Dalgleish, The Sizes and Conformations of the Proteins in Adsorbed Layers of Individual Caseins on Lattices and in Oil-in-water Emulsions., *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1 (1993) 1–8.
- [85] M. Paulsson, P. Dejmek, Surface film pressure of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin at the air/water interface studied by Wilhelmy plate and drop volume., *J. Colloid Interface Sci.* 150 (1992) 394–403.
- [86] R. Wüstnek, B. Moser, G. Muschiolik, 1999. Interfacial dilational behaviour of adsorbed β -lactoglobulin layers at the different fluid interfaces., *Colloids Surf. B Biointerf.* (15) 263–273.
- [87] E. Bouyer, G. Mekhloufi, I. Le Potier, T. F. de Kerdaniel, J.L. Grossiord, V. Rosilio, F. Agnely, Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic, *J. Colloid Interface Sci.* 354 (2011) 467–477.
- [88] A. Ali, I. Le Potier, N. Huang, V. Rosilio, M. Cheron, V. Faivre, I. Turbica, F. Agnely, G. Mekhloufi, Effect of high pressure homogenization on the structure and the interfacial and emulsifying properties of β -lactoglobulin, *Int. J. Pharm.* 537 (2018) 111–121.
- [89] Z. Malik, R. Bottomley, B. Austen, Allergenic properties of the genetic variants A and B of Bovine β -Lactoglobulin, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 86 (1988) 245–248.
- [90] K. Kiran, M. Asad, Wound healing activity of *Sesamum indicum* L seed and oil in rats., *Indian J. Exp. Biol.* 46 (2008) 777–82.
- [91] R.H. Müller, *Zeta Potential and Particle Charge in Laboratory Usage*, Stuttgart, 1996.
- [92] Turbiscan 2000, [Http://www.sci-tec-inc.com/TurMapr.html?reload_coolmenus](http://www.sci-tec-inc.com/TurMapr.html?reload_coolmenus),
- [93] O. Mengual, G. Meunier, I. Cayre, K. Puech, P. Snabre, Characterisation of instability of Concentrated Dispersions by a New Optical Analyser: the Turbiscan MA 1000, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 152 (1999) 111–123.
- [94] O. Mengual, G. Meunier, I. Cayré, K. Puech, P. Snabre, Turbiscan MA 2000: Multiple Light Scattering Measurement for Concentrated Emulsion and Suspension Instability Analysis., *Talanta.* 50 (1999) 445–456.
- [95] A. Maali, M.T. Mosavian, Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000-2010), *J. Dispers. Sci. Technol.* 34 (2013) 92–105.
- [96] A.K. Gaonkar, Interfacial tensions of vegetable oil/water systems: Effect of oil purification, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66 (1989) 1090–1092.
- [97] O. Guclu-Ustundag, M. Giuseppe, Saponins: Properties, Applications and Processing, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47 (2007) 231–258.
- [98] J. Penfold, R.K. Thomas, Adsorption properties of plant-based bio-surfactants: Insights from neutron scattering techniques, *Adv. Colloid Interface Sci.* 274 (2019) 102041.
- [99] C. Ezeabara, Determination of Saponin Content of Various Parts of Six Citrus species, *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 4 (2014) 137–143.
- [100] F. Bonté, M. Dumas, C. Chaudagne, A. Meybeck, Asiaticoside and madecassoside activity on human fibroblast type I and III collagen secretion – *Annales Pharmaceutiques française*, 1 (1995) 38-42.
- [101] S. Fredriksson, Scanning Isoelectric Focusing in Small density gradient columns: Microfractionation of column content, valuation of pH course, Isoelectric points of β -lactoglobulins A and B, *Analytical Biochemistry* 50 (1972) 575–585.
- [102] Y.C. He C., Hu Y., Yon L., Tang C., Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles., *Biomaterials.* 31 (2010) 3657–3666.

- [103] A.C. Sabuncu, J. Grubbs, S. Qian, T.M. Abdel-Fattah, M.W. Stacey, A. Beskok, Probing nanoparticle interactions in cell culture media, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 95 (2012) 96–102.
- [104] K. Ginjupalli, T. Shaw, C. Tellapragada, R. Alla, L. Gupta, N.U. Perampalli, Does the size matter? Evaluation of effect of incorporation of silver nanoparticles of varying particle size on the antimicrobial activity and properties of irreversible hydrocolloid impression material, *Dent. Mater.* 34 (2018) e158–e165.
- [105] M. Gaumet, R. Gurny, F. Delie, Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (2009) 465–473.
- [106] J.S. Park, E.J. Lee, J.C. Lee, W.K. Kim, W.S. Kim, Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated Raw264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF- κ B and ERK signaling pathways., *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 70–77.
- [107] D.P. M. Cnop, J. Hannaert, A. Hoorens, D. Eizirik, Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation., *Diabetes*. 50 (2001) 1771–1777.
- [108] M. Reza Sharif, J. Alizargar, A. Sharif, Evaluation of the wound healing activity of sesame oil extract in rats, *World J. Med. Sci.* 9 (2013) 74–78.

Chapitre 4 : Evaluation de l'efficacité antileishmanienne des nanoémulsions encapsulant l'extrait sur le modèle expérimental de leishmaniose cutanée à *L. major*

Introduction – Résumé

Dans ce dernier chapitre, présenté sous forme d'article rédigé en anglais, une étude de l'évaluation de l'activité *in vivo* des NEs encapsulant l'extrait acétonique de citronnier a été effectuée. Dans une première étape, l'encapsulation de l'extrait à la concentration de 0,1 (m/m) % a été réalisée dans les deux systèmes à savoir des NEs à base de MCT et des NEs à base d'huile de sésame (SO). L'évaluation de l'activité *in vitro* sur les amastigotes intramacrophagiques du *L. major* a montré une activité très intéressante pour les deux systèmes. Par ailleurs, par rapport à l'extrait brut, la cytotoxicité a été significativement diminuée grâce à son encapsulation, mais uniquement dans la NE à base de MCT. Ainsi, cette dernière a permis d'améliorer l'efficacité de l'extrait en augmentant sa sélectivité aux parasites et en éliminant complètement sa toxicité aux cellules hôtes. Toutefois, la NE à base de SO s'est avérée encore plus cytotoxique que l'extrait brut. Néanmoins, l'huile de sésame étant connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes nous avons choisi de garder le système NE SO pour l'étude *in vivo*.

L'évaluation de l'efficacité de ces NEs pour le traitement par voie topique des souris BALB/c infectées de *L. major* a nécessité l'ajout d'un agent épaississant. Ainsi, la gomme xanthane (XG) a été ajoutée aux formulations sélectionnées à une concentration de 1 (m/m) %, assurant ainsi un comportement rhéofluidifiant des NEs qui permet une application plus aisée de la formulation sur la peau. L'efficacité du traitement par NE MCT à 0,1 (m/m) % et NE SO à 0,1 (m/m) % a été ensuite évaluée sur le modèle expérimental de Leishmaniose cutanée à *L. major* sur des souris BALB/c. L'application topique quotidienne de la NE à base de MCT

contenant l'extrait de citronnier a démontré une efficacité antileishmanienne révélée par la diminution significative de la charge parasitaire au niveau des plaies, une stabilisation de la taille des lésions et une diminution de l'inflammation au niveau de la base de la queue par rapport aux souris non traitées. La NE à base de MCT ne contenant pas l'extrait a contribué à cette activité moindre mais intéressante contre l'infection à *L. major*, ce qui suppose l'action par synergie de l'extrait avec le système de NE. L'encapsulation de l'extrait a démontré un grand intérêt puisqu'elle a permis de pallier les effets secondaires provoqués par l'application topique de l'extrait dilué dans du MCT directement sur la plaie.

Cependant, il a été démontré que l'encapsulation de l'extrait dans la NE à base de SO a révélé une toxicité neurologique importante chez les souris BALB/c infectées par *L. major*. La NE à base de SO sans extrait n'a présenté aucune action cicatrisante, mais a permis une diminution significative de la charge parasitaire. Néanmoins, l'application topique de l'extrait dilué uniquement dans du SO a démontré une efficacité significative révélée par la diminution de la charge parasitaire ainsi que la réduction de la taille des lésions.

Cette étude a permis de démontrer que la NE à base de MCT chargée à 0,1 (m/m) % en extrait acétonique de citronnier pourrait être un candidat prometteur pour le traitement topique de la LC. En outre, elle a aussi révélé le potentiel thérapeutique d'une formulation lipidique, qui est l'extrait dilué dans le SO, souvent sous-estimé dans la littérature pour le traitement local de la LC.

PUBLICATION 2

***In vitro* and *in vivo* efficacy of *Citrus limon* extract loaded nanoemulsions for the topical treatment of *L. major* infected BALB/c mice**

Zeineb Maaroufi^{a,b}, Sandrine Cojean^c, Philippe M. Loiseau^c, Catherine Cailleau^a, Florence Agnely^a, Manef Abderraba^b, Ghazlene Mekhloufi^{a*}

^a Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296, Châtenay-Malabry, France.

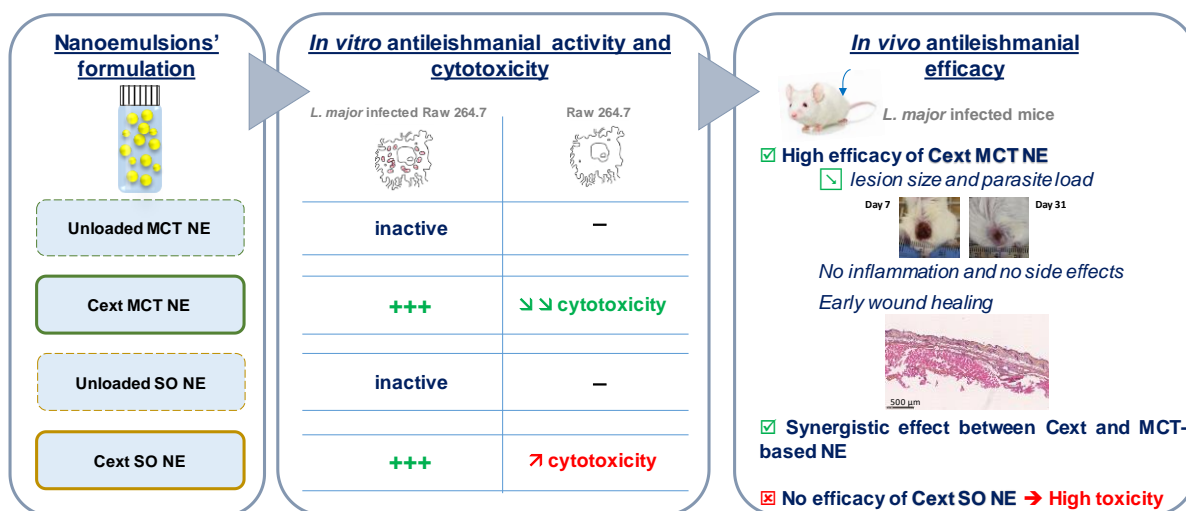
^b Laboratoire Matériaux Molécules et applications, Institut préparatoire des études scientifiques et techniques (IPEST), Univ. de Carthage, La Marsa, Tunisie

^c Université Paris-Saclay, CNRS, BioCIS, 92290, Châtenay-Malabry, France.

* Corresponding author

E-mail: ghazlene.mekhloufi@universite-paris-saclay.fr

Graphical abstract



ABSTRACT

Nanoemulsions (NEs) loaded with *Citrus limon* extract (Cext) were prepared either with medium chain triglycerides (MCT) or sesame oil (SO). *In vitro* evaluation showed an interesting activity for both loaded systems against intracellular *L. major* amastigotes. Moreover, the extract cytotoxicity was significantly reduced once loaded in MCT based NE.

In vivo treatment efficacy was assessed using a Cutaneous Leishmaniasis (CL) model on BALB/c mice. The Cext loaded in MCT NE showed a high efficacy revealed by reducing parasite burden, stabilizing lesion size, and a lack of inflammatory granuloma in skin of the base of mice tail. Unloaded MCT NE contributed to this interesting activity against *L. major* infection suggesting a synergistic effect between the extract and the nanoemulsion. In contrast, Cext encapsulation in SO based NE revealed high neurological toxicity in BALB/c infected mice. Unloaded SO NE did not have any action in reducing the lesion size but allowed a significant decrease in parasite load. Thus, Cext encapsulation in MCT based NEs is of high interest as promising candidate for topical treatment of CL. This feature is particularly interesting since the lipid-based formulations are often underestimated to treat topically the *L. major* induced lesions.

KEYWORDS

Citrus limon extract; Nanoemulsions; Medium chain triglycerides; Sesame oil; Cutaneous leishmaniasis; *In vitro* activity; *In vivo* activity; Topical delivery; Histopathology.

ABBREVIATIONS

API: active pharmaceutical ingredients, β -lg: β -lactoglobulin, Cext: *Citrus limon* extract, CL: cutaneous leishmaniasis, D: day, DMEM: Dulbecco's modified eagles medium, FBS: fetal bovine serum, HePC: hexadecyl phosphocholine, HES: hematoxylin eosin and safranin, MCT: medium chain triglycerides, NE: nanoemulsion, PDI: polydispersity index, SI: selectivity index, SO: sesam oil, XG: xanthan gum

1. Introduction

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by more than 20 species of flagellated protozoa from the genus of *Leishmania* and transmitted to mammals, including humans, by the bite of infected female phlebotomine sandfly. Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form, is considered as a severely neglected tropical and subtropical disease [1]. From 1990 to 2013, the global prevalence shifted of + 174.2 % [2]. In 2017, 85 countries were reported to be endemic for CL in 4 continents with over two thirds of CL cases occurring in 6 countries, namely Afghanistan, Iraq, Brazil, Algeria, Colombia, and Morocco [3]. Currently, an estimated 0.1 to 1.2 million new cases occur worldwide each year. *Leishmania major* and *Leishmania tropica* are both parasite species mainly responsible of most CL cases [4,5]. Classically, CL lesion firstly appears as an erythematous papule at the inoculation site, progressively increasing in size to become a nodule that gradually forms a crust and evolves to ulcer. Characteristic

lesions caused by *L. major* tend to be wet and large, favoring secondary bacterial infections. CL is generally not fatal and heals spontaneously and slowly in less than 8 months leaving indelible disfiguring scars in most cases [6]. Despite being self-curing and not life-limiting, CL is reported to be socially and psychologically damaging notably for women and child since over 50 % of CL lesions are located on the face [7]. Treatments aim to accelerate cure rate, to reduce or remove scarring and to prevent parasite dissemination as well as the development of more complex manifestations like mucocutaneous leishmaniasis [8]. For simple CL (that do not metastasize or progresses to mucosal disease), local treatments, such as cryotherapy, thermotherapy, topical creams/ointments, and intralesional administration, are generally first-line therapy. However, in case of relapsed CL, or of lesions located in cosmetically or functionally important areas, or in cases of a risk of mucosal disease, systemic therapy is used [2]. Since 1940, chemotherapies based on pentavalent antimonials, including meglumine antimoniate (Glucantime®) and sodium stibogluconate (Pentostam®) have been the most commonly used drug for the treatment of leishmaniasis in local or systemic treatment. They remain the first-choice drugs in most part of the world to treat all leishmaniasis forms. However, these drugs are severely toxic to human mainly due to their parenteral administration and the long duration of the therapy. On the other hand, antimony intramuscular injection is painful and associated with systemic undesirable side effects including cardiotoxicity, hepatotoxicity, anemia, nausea, and blood disorders [9]. Moreover, over the last few years, treatment failures and large-scale drug resistance have been reported relegating pentavalent antimonials to second-line choice in many countries [10]. Thus, amphotericin B, paromomycin, or pentamidine appear as alternatives to antimonial resistance. However, severe systemic side effects have been observed, such as nephrotoxicity and hematotoxicity, which contributes to compliance difficulties and eventually treatment failure [11]. In order to reduce its toxicity and increase the therapeutic effectiveness, three different lipid-based formulations of amphotericin B have been developed and even commercially marketed over the last 20 years: amphotericin B lipid complex (Abelcet®, Ampholip®), liposomal amphotericin B (AmBisome®), and amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil®, Amphotec®). They are currently intravenously administered [12]. Despite the high therapeutic efficacy and the reduced toxicity, especially proved for AmBisome®, compared to conventional amphotericin B deoxycholate, the use of lipid-based formulations of amphotericin B remains limited because of its high cost (126–250 US dollars in January 2010), thus, putting it out of patients with limited resources [13]. Over the past decades, development of alternative formulations for topical treatment gained increased interest. In fact, the topical route represents an interesting alternative to the parenteral one, providing several advantages such as lower or no systemic side effect, increased drug concentration in the dermis targeted site [14], easy and painless administration, and

attractive cost-benefit ratio [15]. In this context, formulations based on paromomycin for a topical administration have been largely developed either as ointments or creams with variable results [16]. Clinical trials were achieved for ointments prepared with paromomycin in combination with either urea (10 %) or methylbenzothium chloride (5 – 12 %) associated or not with meglumine antimoniate [17]. Results showed a treatment failure for 73 % of the group receiving topical paromomycin [18]. Other clinical trials emphasize the ineffectiveness of this treatment [19,20]. Otherwise, when combined with a permeation enhancer such as quaternary ammonium surfactants, paromomycin ointment achieved higher cure rates (74 % versus 27 % for placebo). However, side effects appeared like severe irritancy [21].

Increase of drug resistance, toxicity of currently administered drugs, high cost of most effective drugs, and deficiency of new antileishmanial agents highlight the urgent need to search newer and affordable active molecules. In recent years, identification of bioactive molecules extracted from medicinal plants became an emerging alternative therapeutic strategy for the search of new antiprotozoal drugs [22,23]. In this context, our work focused on an extract prepared from *Citrus limon* leaves which had proved a very good *in vitro* activity against both the free and intracellular forms of *Leishmania major* that cause Old World CL. However, in order to obtain the desired topical efficacy, nanoemulsions (NEs) were chosen as a drug carrier since this system had proved its efficiency in improving skin delivery of hydrophobic drugs [24]. Besides being easy to formulate, NEs increase drug solubility and consequently enhance its bioavailability, stability, and permeation, its controlled release, and its protection from enzymatic and chemical degradations [24]. In a previous study, our team developed a promising NE system using the major whey protein, β -lactoglobulin (β -lg), as emulsifier. This NE showed a great stability owing to the formation of β -lg viscoelastic film surrounding the nanodroplets [25].

The present study aims to assess the *in vitro* and *in vivo* therapeutic potential of *Citrus* extract encapsulated in different β -lg-stabilized NEs for the treatment of *L. major* infected BALB/c mice. The *in vivo* antileishmanial activity of *Citrus limon* extract NEs encapsulated system was investigated for the first time.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β -lactoglobulin (β -lg) from bovine milk (Batch SLBC2933V, ≥ 90 % purity grade) was purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Medium chain triglycerides 70/30 (MCT) (Batch 5020511), a commercially made oil derived from palm and coconut, was a gift from Stéarinerie Dubois (Boulogne-Billancourt, France). Pharmaceutical

grade refined sesame oil (Batch 232-370-6) was supplied by Cooper (Melun, France). Sodium azide (Batch K305.2) was obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Miltefosine was supplied by Zentaris Aeterna (Frankfurt, Germany). Xanthan gum (XG) (Satiaxane TM CX 910, batch 20060134) was kindly provided by Degussa (Paris, France). Ultra-purified water from a Millipore Synergy 185 apparatus coupled to a RiOs5™ with resistivity of 18.2 MΩ.cm was used for the preparation of all solutions. Potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) solution (Batch SLBC5939V) and potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄) solution (Lot 068K8600) were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used in this study were of analytical grade.

Citrus extract (Cext) was prepared from a cold maceration of *Citrus limon* leaves, harvested from Beja (North-West of Tunisia), in acetone (10 wt %) for 24 hours under gentle stirring. The solvent/plant mixture was filtrated, then, the filtrate was concentrated using a rotary evaporator (IKA RV 10 digital type) to obtain an extract concentrate.

2.2. Preparation and characterization of nanoemulsions with or without *Citrus* extract

2.2.1. Preparation of aqueous phase

The protein solution was prepared by dispersing β-Ig powder in 10 mM potassium phosphate buffer solution (PB, pH 7.0). The solution was kept under gentle magnetic stirring during at least 2 hours. Then, 0.05 wt% of sodium azide, an antimicrobial agent, was added. The solution was stored at 4°C overnight in order to ensure complete protein hydration. β-Ig solution was then filtered through 0.22 μm syringe filter (Durapore®, Carrigtwohill, Ireland) to remove insoluble protein aggregates. V530 UV/vis spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan) was used to check β-Ig concentration by measuring absorbance at 278 nm. Protein concentration was calculated using the specific extinction coefficient of 9.6 dl/cm.g [26]. β-Ig solution was prepared at total final concentrations of 1.2 wt%.

2.2.2. Preparation of oily phase

Two different oily phases were selected: medium chain of triglycerides 70/30 (MCT) and sesame oil (SO). This latter was chosen for its wound healing properties already proven in literature [27]. 0.1 wt% Cext was dispersed in either MCT or SO (Cext MCT or Cext SO). Oily phases were shaken and kept in an ultrasonic bath for 30 min in order to ensure total solubilization of the extract. Note that mixtures of Cext MCT and Cext SO were used as control systems for the corresponding nanoemulsions.

2.2.3. Nanoemulsions preparation

Oil-in-water NEs were prepared by high pressure homogenization according to the method previously described by Ali and co-workers with slight modifications [25]. To prepare 10 mL of coarse emulsions, 20 wt% oily phase was progressively added to 80 wt% aqueous phase while mixing using a high shear-mixer (Ultra Turraxrotor T10, IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) at 20 500 rpm for 3 min at room temperature. NEs were obtained by immediately passing coarse emulsions through a high pressure homogenizer STANST ED (Stansted Fluid Power, Harlow, U.K.) for 4 cycles operating at a pressure of 120 MPa and a temperature of 40 °C. NEs prepared without Cext, either with MCT (MCT NE) or sesame oil (SO NE), were used as controls for respectively MCT loaded nanoemulsion (Cext MCT NE) and SO loaded NE (Cext SO NE). In order to obtain a creamy consistency to ease the topical application, 1 wt% of xanthan gum was added to all the emulsified systems only for the *in vivo* study, one day before mice treatment. All NEs were stored in the dark at 25 ±1°C.

2.2.4. Nanoemulsions characterization

NEs stability was assessed by visual observations and by droplet size and zeta potential measurements. The z-average diameter, size distribution, and polydispersity index (PDI) were determined using a dynamic light scattering instrument (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments) operating with 4 mW He-Ne laser (633 nm). Measurements were set up at 25 °C at a scattering angle of 90°. The ζ -potential of NEs was measured by laser Doppler electrophoresis on the same apparatus at 25 °C. The ζ -potential was related to the electrophoretic mobility by Henry's equation. For particle size and ζ -potential measurements, NEs were diluted 20-fold prior to analysis using buffer solution (10 mM phosphate, pH 7.0) to avoid the effects of multiple scattering. Measurements were carried out in triplicate 3 days after NEs preparation.

2.3. *In vitro* evaluation of the effect of nanoemulsions with and without *Citrus limon* extract on *L. major* intramacrophage amastigote form

For *in vitro* evaluation of antileishmanial activity, five systems were tested: unloaded NEs prepared with MCT or SO (MCT NE and SO NE, respectively), Cext loaded NEs with MCT or SO (Cext MCT NE and Cext SO NE, respectively), and non-encapsulated Cext (Cext MCT and Cext SO).

2.3.1. Parasite cultures

Leishmania major (MHOM/PT/92/CRE26) promastigotes were cultured in M-199 medium (Sigma) supplemented with 40 mM HEPES, 100 mM adenosine, 0.5 mg/L haemin, 10 % fetal bovine serum (FBS) at 25 °C in a dark environment. Parasites in stationary phase of growth that corresponded to day 5 of culture were used in both *in vitro* and *in vivo* infections.

Differentiation of promastigotes into axenic amastigotes was produced after 24 h-growth at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. The treatment of differentiation was achieved by dilution of 1 × 10⁶ promastigotes suspension in stationary phase of growth in 5 mL of axenic amastigote medium (promastigote medium supplemented with 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) and the pH was adjusted to 5.5. Axenic amastigotes were grown at 37 °C in 5 % CO₂.

2.3.2. *In vitro antileishmanial activity in intramacrophage amastigote and cytotoxicity*

The mouse monocyte/macrophage cell line Raw264.7 (mouse leukemic monocyte macrophage cells) was maintained in DMEM (Applied Biosystems, France) supplemented with 10 % heat-inactivated FBS. Raw264.7 cells were seeded into a 96-well microtiter plate at a density of 20 000 cells/well in a final volume of 100 µL. After incubation in a 5 % CO₂ incubator at 37 °C for 2 h, the culture medium was replaced with 100 µL of fresh DMEM containing a suspension of 320 000 promastigotes in 100 µL (corresponding to 16 parasites-to-cell ratio) and supplemented with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂. After an overnight incubation in a 5 % CO₂ incubator at 37 °C, culture medium was removed then macrophage morphology and infection were checked using an inverted microscope. In a separate plate, dilutions of different NEs in fresh cell medium (DMEM supplemented with 10 % FBS) were realized under gentle shaking during at least 30 min. All samples were initially prepared at 10 mg/mL of Cext. Final concentrations of Cext tested were obtained by serial dilution in culture medium of either Cext in ethanol or the NEs containing Cext. The concentration of the latter ranged between 100 µg/mL and 10⁻⁴ µg/mL. For unloaded NEs, NEs concentration into the 96-well plate was adjusted in order to obtain the same NEs serial dilution than for loaded NEs. Triplicates were used for each concentration. After that, diluted NEs were transferred in plates containing infected macrophages and incubated at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere in the dark during 72 h. Miltefosine (HePC), was considered as a positive control. Infected and non-infected cells incubated only with cell medium were both used as negative controls. Each experiment was carried out at least thrice 3 days after the preparation of NEs. In addition, NEs activity on intra macrophage amastigote was evaluated 45 days after NEs preparation to assess the effect of the storage time.

Cytotoxicity of NEs was evaluated in parallel using the same protocol in the absence of parasites during an incubation time of 48 h.

2.3.3. *Cell viability assessment*

The viability of the intramacrophage amastigotes was evaluated using the SYBR®-Green I (Invitrogen, France) incorporation method. After incubation, cells were visualized using an inverted microscope to check their morphology, the presence of parasites outside and to compare different wells with non-infected/treated macrophages. The medium was subsequently

removed and replaced with the lysis buffer. Then, plates were subjected to 3 freeze thaw cycles. Parasite growth was determined using SYBR® Green I, a dye with marked fluorescence enhancement upon contact with parasite DNA. Cells suspensions were diluted 1:1 in lysis buffer (10 mM NaCl, 1 mM Tris HCl pH 8, 2.5 mM EDTA pH 8, 0.05 % SDS, 0.01 mg/mL proteinase K, and 10X SYBR® Green I) in qPCR plates. Fluorescence was measured with Mastercycler® realplex (Eppendorf, France) according to the following program to increase the SYBR®-Green incorporation: 90 °C for 1 min, decrease in temperature from 90 °C to 10 °C during 5 min with fluorescence reading. Antileishmanial activity was expressed as 50 % inhibitory concentration of drug (IC₅₀), corresponding to the growth cell inhibition and calculated using ICEstimator® [28].

The macrophage cytotoxicity was also evaluated by the previously described SYBR®-Green I incorporation method. 50 % effective concentration (CC₅₀) was estimated using ICEstimator. In addition, selectivity index (SI) was defined as the ratio of cytotoxic activity to antileishmanial activity (CC₅₀/IC₅₀).

2.4. In vivo evaluation of *Citrus limon* extract loaded nanoemulsions effect in *L. major* infected BALB/c mice

2.4.1. Ethical considerations

Animal care and experiment protocols were carried out according to ethical standards approved by the Animal Ethics Committee of University Paris-Sud in strict pursuant to the *EU directive 2010/63/EU for animal experiments* (Agreement N°2150/2015092416587554).

2.4.2. Animal infection

BALB/c female mice 6 weeks aged and weighing between 20 – 25 g were used in order to establish a murine model of cutaneous leishmaniasis and ensure efficacy assays. Mice were kept under room temperature of 25 ± 1 °C under light/dark cycle of 12 h. A subcutaneous inoculation of 10⁷ *L. major* promastigotes was carried out in the base of mouse tail to induce a lesion. After 4 weeks, mice were classified in different groups of 8 animals, each group containing the same number of small, large or very large lesions (see **Table 1**).

Each group was treated topically by covering lesions daily, over 13 to 31 days, with 100 µL of one of the following formulations: for MCT batch: unloaded MCT NE, Cext MCT NE, and Cext MCT (Cext diluted in MCT); for SO batch: unloaded SO NE, Cext SO NE, and Cext SO (Cext diluted in SO). Both for oils and for NEs, circular movements were performed until complete penetration of the formulation. For each experiment batch, a supplementary group of untreated infected mice was considered as a negative control.

Table 1. Distribution of mice groups for the *in vivo* study

Group	Treatment
MCT NE	Mice infected and treated with an unloaded MCT-based nanoemulsion
Cext MCT NE	Mice infected and treated with an MCT-based NE containing Cext (0.1 wt%)
Cext MCT	Mice infected and treated with the Cext diluted in MCT oil (0.1 wt%)
SO NE	Mice infected and treated with an unloaded Sesame oil-based nanoemulsion
Cext SO NE	Mice infected and treated with a Sesame-based NE containing Cext (0.1 wt%)
Cext SO	Mice infected and treated with the Cext diluted in Sesame oil (0.1 wt%)
Untreated	Mice infected and untreated

All groups contained 8 mice. Nanoemulsions and oil were daily applied topically with circular movements until complete skin penetration.

2.4.3. Evaluation of *in vivo* treatment efficacy

a) Clinical aspects

Mice were monitored daily. Observations were noted describing the general state of each mouse (movement, aspect of the hair, grooming etc.), and the clinical aspect of the lesion (bloodstained, purulent, painful, presence of secondary infections, emergence of metastases, wound healing, etc.). In addition, mice were weighed every other day.

b) Lesion size

For each animal, a photo of lesion was taken every other day before treatment application. Lesion areas were calculated from photos using Image J 1.52a software[®]. Statistical analyses were made by two-way repeated measures ANOVA followed by a Bonferroni post-test.

c) Parasite load

After 13 (for SO batch) or 31 (for MCT batch) days of treatment, mice were euthanized by cervical dislocation. The lesion was excised as well as its periphery to determine the skin parasite load. In addition, liver and spleen were removed in order to detect possible visceralization of leishmaniasis.

d) DNA extraction

Organs and tissues removed after mice euthanasia were weighed and soaked with sterile PB (pH 7.0). Organs were grinded using a glass tissue grinder then 200 μ L of the “juice” was removed and lysed with 200 μ L of lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, and 0.5 % SDS, pH 8.0) containing 20 (v/v)% proteinase K. The mixture was incubated under 56 °C for 2 hours. Skin samples in PB solution were cut into small parts then centrifuged. Supernatant was removed and tissue was re-suspended in 200 μ L of lysis buffer containing

20 (v/v) % proteinase K. Samples were mixed by vortexing and incubated under 56 °C overnight. DNA was extracted from lysed samples using DNeasy® Blood & Tissue Kit of Qiagen® according to the manufacturer's instructions. After different steps of purification, DNA was eluted in Nuclease RNase free water at 72 °C. DNA was quantified using Nanodrop Tecan at 260 nm and stored at 4 °C for further studies [29].

e) qPCR

Samples were run in duplicate where 10 ng of total DNA was added to 15 µL to reaction mixture containing SYBR®-Green. Primers used were sense (forward, 5'-CCTATTTTACACCAACCCCAAGT-3'), and antisense (reverse, 5'-GGGTAGGGGCGTTC TGCGAAA-3'), constructed for amplification of the mini-circle region present in the kinetoplast DNA (kDNA) of approximately 120 bp. Cycling protocol was set up as follows: an initial incubation step at 95 °C during 20 seconds to 3 minutes (1 cycle) for enzyme activation, followed by 40 cycles of denaturing at 95 °C during 1 to 3 seconds, and of annealing/extending/acquiring at 60 °C for ≥ 20 sec. The dissociation kinetic analyses were performed according to the instrument guidelines.

Purified DNA from *L. major* parasites and mice were used to calibrate standard curves. PCR reaction efficiency and specificity were assessed using parasite DNA serial dilutions and melt curves analysis. Quantification of parasite DNA in different samples were determined using *Realplex Mastercycler* software by interpolating threshold cycle (C_t) value in standard curve [30].

f) Histological analysis

After euthanasia, skin lesions removed from mice were immediately fixed in 4 % paraformaldehyde then embedded in paraffin. Additionally, skins were cut into sections of 5 µm that were hydrated and stained with Hematoxylin Eosin and Safranin (HES). Slides were scanned by the digital slide scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Japan), which allowed an overall view of the samples. Images were digitally captured from the scan slides using the NDP.view2 software® (Hamamatsu).

2.5. Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for statistical analysis. Non-parametric or Anova tests were performed, and statistical analysis was carried out using two-way or one-way analysis of variance (Anova), with a Bonferroni post-test or a Tukey post-test, or using Kuskal-Wallis test. A p value < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Nanoemulsions characterization

Two different types of NEs encapsulating *Citrus limon* extract were successfully prepared in this study using β -lactoglobulin as the emulsifying agent. One of them was prepared with SO and the other based on MCT. In addition, unloaded NEs, prepared either with MCT or SO and formulated in the same process conditions, were used as controls.

Data in **Table 2** present NEs characteristics, namely mean droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential. All obtained NEs exhibited nano-sized droplets with an average hydrodynamic diameter of 55 to 58 nm and 21 to 25 nm, respectively for MCT NEs and SO NEs.

Table 2. Physicochemical properties of unloaded and *Citrus limon* extract loaded emulsions.

NE composition	Mean hydrodynamic droplet diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
Unloaded MCT NE	55 ± 1 ^{**}	0.186 ± 0.033 ^a	-23 ± 2 ¹
Cext MCT NE	58 ± 4 ^{**}	0.179 ± 0.036 ^a	-28 ± 1 ²
Unloaded SO NE	25 ± 1 [*]	0.200 ± 0.009 ^a	-22 ± 3 ¹
Cext SO NE	21 ± 4 [*]	0.192 ± 0.019 ^a	-21 ± 1 ¹

Mean ± SD (n = 3). Statistical analysis was performed using one-way-ANOVA with Tukey post-test (p < 0.05) for comparison of means within a column. The means values followed by different symbols, letters or numbers in the same column are significantly different.

Mean hydrodynamic droplet diameter varied significantly (p < 0.05) from an oily phase to another. However, the encapsulation of *Citrus limon* extract did not exhibit any significant effect on the mean droplet diameter. Moreover, all samples were characterized by a narrow size distribution with a PDI lower than 0.2 attesting the uniformity of droplet size distributions in each sample. These results show that the mean droplet diameter is thus governed by the oily phase nature as it decreases significantly from MCT NEs to SO NEs. Measurements of interfacial tension of these oils showed that SO presented a lower interfacial tension than MCT (see **Appendix, Table A**). Actually, it is largely described in the literature that low interfacial tension is strongly correlated with small droplet size [25]. Low interfacial tension of SO could be due to the vegetal origin of this oil that may contain surface active impurities generated during production process likely to induce the decrease of the interfacial tension [25,31,32].

Zeta potential of oil droplets was negative for all tested samples. These results are in agreement with the global charge of β -lg as the pH of the aqueous phase (pH = 7) was higher than the isoelectric point of the protein ($pI \approx 5.2$) [33]. No significant difference ($p < 0.05$) was noticed between the different zeta potential values except for Cext MCT NE that exhibited a slight but significant higher magnitude of -28 ± 1 mV. The negative surface charges of loaded and unloaded NEs could play a positive role in cell uptake as surface charged particles are more attractive to macrophages. They can establish electrostatic interactions between droplet surface and macrophage membrane, favoring a phagocytic effect [34].

Given that different formulations were applied on mice for 2 – 4 weeks to determine the antileishmanial efficiency *in vivo*, macroscopic and microscopic stabilities of NEs were checked over a period of 45 days. Loaded and unloaded NEs maintained a homogenous optically opaque appearance (no visual creaming or phase demixing) during at least 45 days of storage at room temperature (data not shown). Thus, all obtained NEs were stable to macroscopic gravitational phase separation. **Fig. 1-A** shows that unloaded and loaded SO NE seemed to be stable over time as size distribution did not change significantly with a main peak around 25 nm. However, a significant size distribution evolution was noticed at day 45 for Cext MCT NE and unloaded MCT NE as they became bimodal with the appearance of larger droplets diameter with a peak centered at 140 nm and 100 nm, respectively (**Fig. 1-B**). This mean droplet size increase is probably due to droplet flocculation or coalescence.

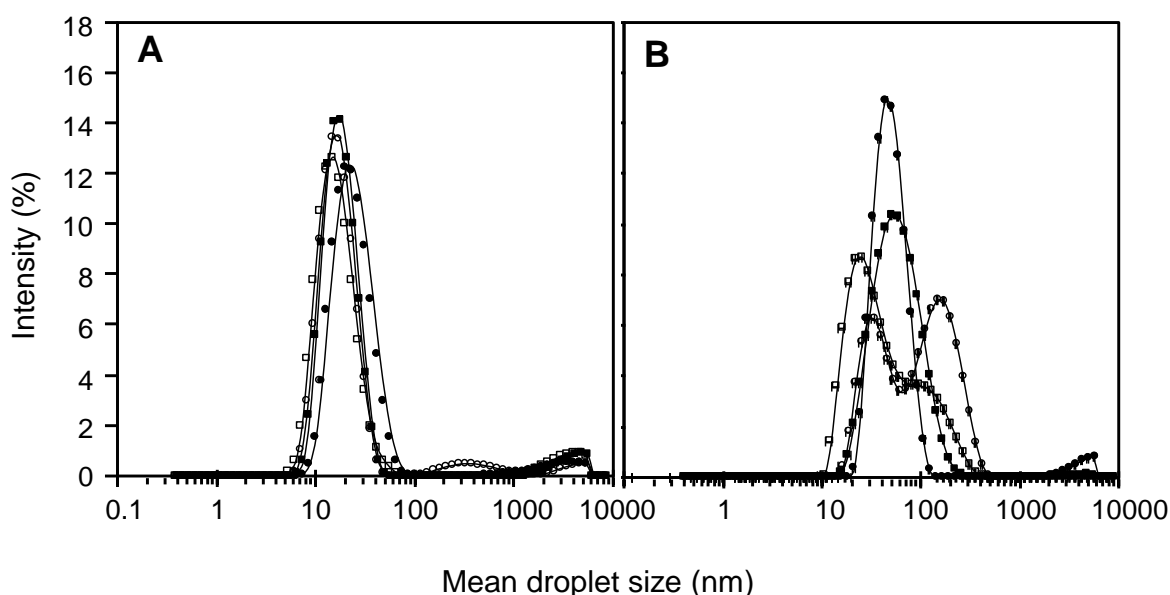


Fig. 1. Droplet size distributions of unloaded and loaded NEs with *Citrus limon* extract at day 3 (D3) (solid symbols) and day 45 (D45) (empty symbols) after preparation of SO-based NEs (**Fig. 1-A**) and MCT-based NEs (**Fig. 1-B**).

MCT: Medium Chain Triglycerides
 SO: sesame oil

3.2. *In vitro* evaluation of the effect of nanoemulsions with and without *Citrus limon* extract in *L. major* intramacrophage amastigote form

Prior the evaluation of treatment efficacy, the antileishmanial activity and cytotoxicity were assessed *in vitro* for Cext alone, unloaded NEs, and NEs encapsulating Cext. Note that Cext was diluted in ethanol because of its very limited aqueous solubility. Miltefosine was used as antileishmanial reference-drug. Antileishmanial activity on *L. major* and cytotoxicity on Raw264.7 cells were tested 3 days after NEs preparation, and were expressed as IC₅₀ and CC₅₀, respectively (Table 3). Compounds with IC₅₀ value higher than 20 µg/mL were considered inactive against intracellular amastigote form of *L. major* [35].

Table 3. *In vitro* activity and cytotoxicity of *Citrus limon* extract and unloaded or loaded nanoemulsions with the extract.

Sample	Antileishmanial activity	Cytotoxicity	Selectivity
	<i>L. major</i> intramacrophage amastigotes IC ₅₀ (µg/mL)	Raw264.7 cells CC ₅₀ (µg/mL)	index = CC ₅₀ /IC ₅₀
Unloaded MCT NE	41.9 ± 16.1*	-	-
Cext MCT NE	0.3 ± 0.1**	6.0 ± 0.4 ^a	21.4 ± 6.1 ³
Unloaded SO NE	42.5 ± 8.9*	-	-
Cext SO NE	0.7 ± 0.1**	3.4 ± 0.4 ^d	4.9 ± 0.1 ¹
Citrus crude extract	4.4 ± 1.1**	30.4 ± 1.7 ^b	6.9 ± 2.3 ²
Miltefosine	1.3 ± 0.4**	62.1 ± 4.4 ^c	47.8 ± 0.3 ⁴

Mean ± SD (n = 6). Statistical analysis was performed using one-way-ANOVA with Tukey post-test (p < 0.05) for comparison of means within a column. The means values followed by different symbols, letters or numbers in the same column are significantly different. CC₅₀ and selectivity index were not calculated for inactive compounds.

Selectivity index = CC₅₀ macrophages/IC₅₀ intramacrophage amastigotes.

IC₅₀ = concentration producing 50 % inhibition of *L. major* amastigotes.

CC₅₀ = concentration producing 50 % inhibition of Raw264.7 cells.

Cext, whether solubilized in ethanol solution or loaded in NEs (Cext MCT NE or Cext SO NE), exhibited a high antileishmanial activity against intracellular amastigotes with no statistically significant difference (p < 0.05) between these samples, and even with Miltefosine used as positive control. Therefore, neither the encapsulation of *Citrus limon* extract nor the use of

different oily phase seemed to modify the potential antileishmanial activity of the extract. Otherwise, both unloaded NEs (with MCT and SO) exhibited values of IC_{50} higher than $20 \mu\text{g/mL}$, which indicated that unloaded NEs were inactive against the intramacrophage parasite. Consequently, it could be assumed that the observed activity was exclusively due to the *Citrus limon* extract potential against *L. major* intramacrophage amastigotes. Active formulations and Miltefosine were selected for cytotoxicity evaluation against Raw264.7 cells. CC_{50} values for all tested samples are significantly different from each other. Selectivity index expresses the selective effect of a formulation against parasite. A satisfactory SI for products to be employed as effective antileishmanial agents is recommended to be higher than 10.0 [35]. Thus, compounds exhibiting SI lower than 10.0 were considered as toxic to macrophage cells. Miltefosine, the reference compound, had the highest SI value as expected. In spite of having a good antileishmanial activity, *Citrus limon* extract solubilized in ethanol solution showed some toxicity with a SI value of 6.9 and CC_{50} value of $30.4 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$. Among all tested NEs and *Citrus limon* extract, the best SI value was observed for Cext MCT NE which was considered non-toxic since $SI > 10.0$. When the extract was encapsulated in the dispersed phase of NE, the cytotoxicity differed from one system to another. The CC_{50} values decreased for both loaded NEs compared to unencapsulated extract. However, Cext SO NE was less selective against the parasite and more cytotoxic as SI decreased (4.9 ± 0.1) compared to the *Citrus* extract in ethanol (6.9 ± 2.3). On the other hand, Cext MCT NE exhibited the highest SI value (21.4 ± 6.1) among the tested formulations indicating that this NE is more selective against *L. major* parasites than the other formulations. Thus, the cytotoxicity of *Citrus limon* extract decreased significantly and its selectivity effect to *L. major* parasites increased when encapsulating it in MCT-based NE. The difference noted between Cext MCT NE and Cext SO NE may be explained by the difference of the mean droplet size that could impact the cellular uptake efficiency. Smaller droplets could be more efficiently uptaken by macrophages, thus the cytotoxicity of *Citrus limon* extract was enhanced when it was encapsulated in SO NE. Indeed, many studies showed that the cellular uptake and transport of encapsulated compound or particles depend on droplet/particle size, among others [36,37]. Furthermore, the oily phase composition could explain the difference between the two systems (MCT and SO). Indeed, MCT is an oil that contains abundant caprylic acid (70 % of caprylic acid (C8) and 30 % of capric acid (C10)), shorter fatty acids than in sesame oil. According to the supplier, this latter contains mostly triacylglycerides (mainly with oleic and linoleic acids). It was previously shown that short medium chain owned an anti-inflammatory effect in Raw264.7 macrophage cells by enhancing the expression of the anti-inflammatory cytokine. Thus, the overactivation of macrophages was limited and consequently cell death too [38]. It was also demonstrated that caprylic acid suppressed IL-8 secretion in Caco-2 cells. Note that fatty acids concentration is important on

cell viability. Millimolar concentrations are needed to lyse the cells [39]. However, the cytotoxicity of fatty acids is highly reduced in the presence of proteins as they bind strongly [40].

Note that the *in vitro* antileishmanial and cytotoxicity of NEs constituents, namely the protein, sodium azide, PB, SO, and MCT, were tested. Neither inhibitory effect, nor cytotoxicity was noticed. Despite the toxicity found for Cext SO NE system ($SI < 10$), we decided to thrust this formulation forward the pipeline and to evaluate *in vivo* efficacy because wound healing and anti-inflammatory properties of SO might be of interest for treating cutaneous lesions [41]. Otherwise, it can be concluded that encapsulation of the extract in a suitable NE system improved its therapeutic efficacy as it allowed reaching the recommended selectivity values. Actually, similarly to *Citrus limon* extract, over 90 % of antileishmanial compounds, including those in discovering pipeline, have very limited aqueous solubility [42]. Thus, encapsulation is an alternative and promising approach to overcome the problem of aqueous solubility that remains a determinant criterion for antileishmanial drugs therapeutic efficacy [43,44]. Furthermore, nanoencapsulation is an promising strategy for targeting and releasing antileishmanial substances in macrophage-rich organs [45]. For instance, NEs used as topical administration vehicles have largely been considered as permeation enhancers with droplet size diameters (5 – 500 nm) that are appropriate to penetrate the skin pores and reach the dermis layer where infected macrophages are located [45,46]. Thanks to phagocytosis, which allows droplets with a size range of 5 – 500 nm to be engulfed, an increase of intracellular drug concentration and a modified drug release can be achieved [47]. Nanoencapsulation is likely to direct antileishmanial substances for intracellular localization in its site of action, enhancing the efficacy and decreasing the toxic side effects due to the drug accumulation in non-targeted areas [46,48,49].

As the NEs were intended to be applied on lesions for at least 4 weeks, the antileishmanial activity of NEs was checked 45 days (D45) after their preparation. Indeed, NEs should retain good activity until the last day of treatment. Antileishmanial activities of *Citrus limon* extract loaded NEs at day 3 (D3) and day 45 (D45) is given in **Table 4**.

Cext MCT NE exhibited a significant ($p < 0.05$) 6-fold decrease in antileishmanial activity as IC_{50} values shifted from $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ to $1.9 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ respectively from D3 to D45 after preparation. However, no significant ($p < 0.05$) change in antileishmanial activity was noticed for Cext SO NE.

NEs are known to be thermodynamically unstable and kinetically stable systems. They evolve towards phase demixing while passing by an increase of the droplets size [24]. Elsewhere, the

biological activity is strongly dependent on NEs' physicochemical properties notably the particle size, which was recorded at D45.

Table 4. *In vitro* antileishmanial activity of *Citrus limon* extract loaded NEs at day 3 and day 45 after preparation.

NE composition	Antileishmanial activity	
	<i>L. major</i>	
	intramacrophage amastigotes	
	IC ₅₀ (µg/mL)	
	D3	D45
Cext MCT NE	0.3 ± 0.1*	1.9 ± 0.3**
Cext SO NE	0.7 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*

D3 and D45: 3 and 45 days after nanoemulsions' preparation
 Mean ± SD (n = 6). Statistical analysis was performed using one-way-ANOVA with Tukey post-test (p < 0.05) for comparison of means within a column. The means followed by different symbols in the same column are significantly different.

As seen in section 3.1., SO NE seemed to be more stable over time, whereas, a significant change in size distribution was noticed for MCT NE with the presence of larger droplet at D45. Thus, there is a positive correlation between a ~ 3-fold increase of droplet diameter and a ~ 6-fold decrease of the antileishmanial activity of MCT NE against infected peritoneal macrophages. This means that the apparition of droplets population with larger diameter provided smaller global specific surface area of droplets that would alter their cellular uptake efficiency by macrophages and would modify the biological activity. Moreover, active substance penetration profile into targeted cells would be reduced by the droplet size increase, resulting in weaker antiparasitic activity [45,50].

It is worth noting that, despite a significant decrease of activity over 45 days, Cext MCT NE still had an interesting antileishmanial potential since IC₅₀ value at D45 (1.9 ± 0.3 µg/mL), that allowed to classify it as highly active against *L. major* intramacrophage amastigote. Additionally, no statistically significant difference was observed between IC₅₀ values of Cext MCT NE and the positive control with Miltefosine (IC₅₀ = 1.3 ± 0.4 µg/mL as seen in **Table 3**).

3.3. *In vivo* evaluation of *Citrus limon* extract nanoemulsions in *L. major* infected mice

In this study, the development of lesions in BALB/c mice caused by *L. major* followed the prognosis largely described in literature. After 3 – 4 weeks of infection, first disease symptom was an apparition of a thick and hard callus at the inoculum site. Few days later, a reddish papule was formed at the callus center. 28 to 30 days after infection, several mice developed a nodule that, in most cases, progressively evolved with the appearance of a well-defined ulcer with curved edges. Lesions progressively increased in size with a formation of a thick layer of crust over the ulcer.

Animal experiment was carried out with two different NEs, prepared either with MCT or with SO. Obtained results are presented in two separate sections.

3.3.1 Topical treatment with MCT-based formulations

Groups of mice were randomly divided in 4 groups according to the treatment applied as previously described in **Table 1**. An additional group treated with MCT oil alone was used as a control. Results of this latter did not significantly vary compared to the untreated group, meaning that MCT had no effect on *L. major* infected mice (data not shown).

a) Clinical aspects

Mice treated with MCT based formulations exhibited different clinical manifestations depending on applied treatment (**Fig. 2**). Untreated mice showed thick crust over ulcers that progressively broke away. Lesion became deep, exudative, and moist favoring secondary bacterial infections. Ulcerative lesions gradually became painful and bloody. Mice cured daily with topical application of Cext MCT NE exhibited different lesion characteristics: crust formation was scarce, lesion borders were pinkish, the center was dry, and no particular swelling was noticed. Mice hair was shiny until the last day of treatment. No lesion evolved to painful and bloody ulcer. Moreover, wound healing was noticed for one mouse from the group. Visual observations noted for mice treated with unloaded MCT NE were not significantly different from the Cext MCT NE treated mice. However, no wound healing case was noticed. For all these groups, no significant weight loss was observed.

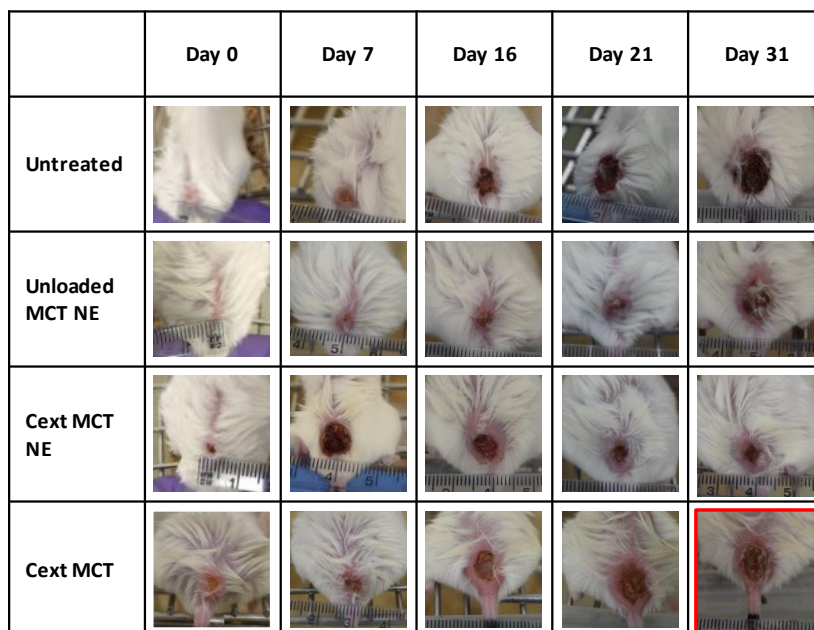


Fig. 2. Time evolution of clinical observations of lesions on the base of mice tail for different groups (from top to bottom): Untreated mice, treated mice with unloaded MCT NE, treated mice with loaded NE with *Citrus limon* extract (Cext MCT NE), and treated mice with *Citrus limon* extract solubilized in MCT (Cext MCT). The framed photo in red was taken on day 24.

MCT: Medium Chain Triglycerides

Finally, mice treated topically with *Citrus limon* extract solubilized in MCT (Cext MCT) exhibited ulcers with thick crust formation. Since the first week of treatment, mice had shown spiky grayish hair revealing a lack of grooming. From the ninth day of the treatment, a significant localized hair loss was noticed for 7 mice out of 8. Consequently, we chose to treat mice every other day. However, the latter clinical manifestations persisted. Moreover, significant weight losses were noticed. All lesions were ulcerative with red raised borders and remarkable swelling. Therefore, mice were euthanized on 24th day of treatment. It is worth mentioning that the group of mice treated with MCT only (data not shown) did not exhibit any clinical manifestation cited for Cext MCT. Thus, the induced toxicity is related to the topical application of *Citrus limon* extract contained in oily phase. However, as mentioned previously, no side effect was observed for Cext MCT NE. Consequently, the encapsulation of the extract within the oily phase of NE enabled to overcome the problem of its toxicity. This finding is in accordance with previous studies concerning tretinoin that had limited skin tolerability and then caused local side effect [51]. The encapsulation of tretinoin in solid lipid nanoparticles led to considerably reduced side effects [52,53].

b) Lesion size

In vivo efficacy of different formulations was firstly assessed by monitoring lesion area in the base of mice tails. Comparisons of lesion area were realized between treated groups and the

negative control group that was infected but untreated. **Fig. 3-A** shows the evolution of lesion area recorded every two- or three-days during treatment duration (31 days for the four studied groups) except for mice treated with Cext MCT who were euthanized on day 24.

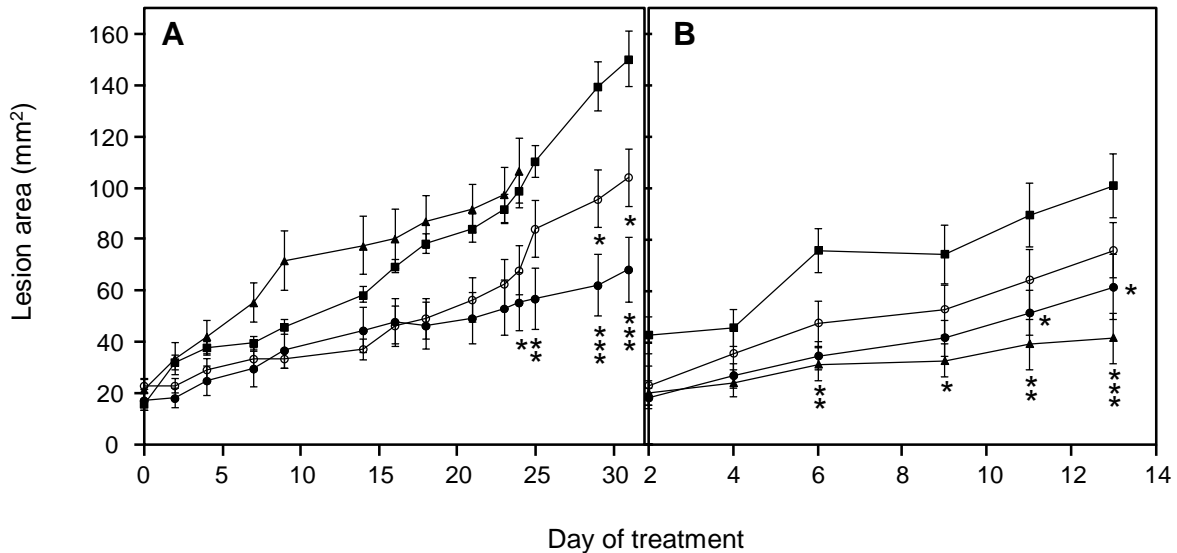


Figure 3. Time evolution of lesion area in *L. major* infected BALB/c mice: (■) untreated mice; (●) treated mice with loaded nanoemulsion with *Citrus limon* extract; (○) treated mice with unloaded nanoemulsion; (▲) treated mice with *Citrus limon* extract diluted in the oil, of either MCT-based system (**Fig. 3-A**) or SO-based system (**Fig. 3-B**). Each point represents the mean \pm SEM (n = 8 per group). Statistical analysis was performed using two-way repeated measures ANOVA and Bonferroni post-test and compared to untreated groups used as a reference strain. (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, and (***) p < 0.001.

MCT: Medium Chain Triglycerides
SO: sesame oil

Lesions area ranged between 20 mm² and 160 mm². Mice treated with Cext MCT NE had a mean lesion area that did not exceed 80 mm² at the last day of the treatment. When topically daily applied, Cext MCT NE promoted a significant (p < 0.05) decrease in the mice lesions size compared to the untreated mice. Indeed, this positive effect was observed at the 24th day (D24) of the treatment (p < 0.05) was even more marked at D25 and became very highly significant (p < 0.001) at D29.

The equivalent concentration of *Citrus limon* extract diluted in MCT (Cext MCT) had no effect in lesion area evolution since it was comparable to the untreated group. At D24, mean lesions area was of 117 \pm 15 mm² versus 100 \pm 9 mm² for the untreated mice. Thus, the extract encapsulation within a NE had a very significant effect on its biological efficacy. In this context, studies reported by Bocxlaer and co-workers suggested that lipophilic drugs had very reduced skin permeation. Indeed, limited water solubility meant a low drug concentration in the donor

compartment of the Franz diffusion cell, thus, a low concentration gradient across the skin [54]. NEs are suitable and safe drug delivery system for efficient delivery of active pharmaceutical ingredients (API) through the skin [50,55], as they promote API skin penetration and thus increase their concentration locally [56,57]. Indeed, thanks to NEs nano-sized droplets, a high surface area is provided to effectively deliver the API to the skin [58]. Moreover, used for the encapsulation of various natural products, NEs could reduce side effects (by reducing systemic absorption) and protect extracts or oils from medicinal plants from heat/light degradation [59–61].

The unloaded MCT NE exhibited a slight but significant ($p < 0.05$) effect in the reduction of lesions size compared to the untreated group. This was observable since D29. At D31, mean lesion area was $104 \pm 11 \text{ mm}^2$. However, mean lesion area of untreated group exceeded 150 mm^2 . Thus, unloaded MCT NE seemed to play a role in the stabilization of lesions area noticeable in the group of mice treated with Cext MCT NE. These results suggested that there was probably a synergetic effect when *Citrus limon* extract was loaded into NE that enhanced the extract performance in stabilizing lesion size. Kaur and co-workers proved this synergistic effect between APIs and drug delivery systems in skin damage treatments by incorporating *C. longa* extract in ethosomal, transferosomal, and liposomal cream formulations [62]. Despite the inefficacy of unloaded MCT NE *in vitro*, this NE seemed to have its own bioactive effect *in vivo* in reducing *L. major* lesion size. NEs are able to promote skin hydration either by forming an occlusive film at the stratum corneum surface limiting water evaporation, or by reinforcing the skin lipid film barrier by the adhesion of lipid nanoparticles to the stratum corneum [63,64]. Thus, reducing the trans-epidermal water loss may strengthen the barrier function of the skin [50].

c) Parasite load

Results of parasite burden in animals' lesions revealed a significant difference between the untreated mice and other groups. Data are represented in term of number of parasites per 10 ng of mice DNA (**Fig. 4-A**).

Either unloaded NEs or *Citrus limon* extract loaded NEs exhibited a very significant ($p < 0.001$) reduction in parasite burden after 31-day period of topical treatment in comparison with the control untreated group. Mice treated with Cext MCT NE and unloaded MCT NE showed median parasite burden of 1688 and 3131 parasites per 10 ng of mice DNA, respectively.

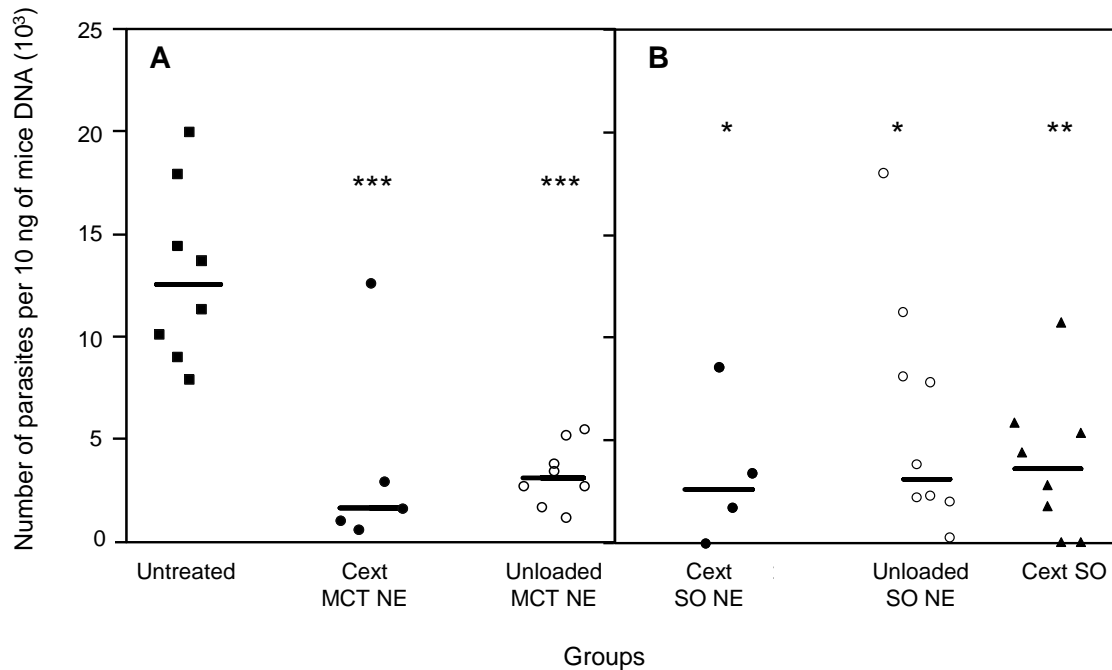


Fig. 4. Skin parasite burden (median) of different groups: (■) untreated mice; (●) treated mice with loaded nanoemulsion with *Citrus limon* extract; (○) treated mice with unloaded nanoemulsion, for either MCT-based system (**Fig. 4-A**) or SO-based system (**Fig. 4-B**); (▲) treated mice with *Citrus limon* extract diluted in SO. Statistical analysis was performed using Kuskall-Wallis test (non-parametric test) and compared to untreated groups used as a reference strain. (***) $p < 0.001$.

MCT: Medium Chain Triglycerides
SO: sesame oil

Hence, *Citrus limon* loaded MCT NE was 1.85-fold more effective in promoting reduction of parasite burden than the unloaded NE. Thus, when topically applied, Cext MCT NE seemed to be able to diffuse into the skin and overcome the epidermal layer to reach the infected macrophages in deep dermal layer, as previously observed by Jaafari *et al.* [65]. Further investigations are needed to confirm this hypothesis. However, these results are not in accordance with the *in vitro* evaluation against intracellular *L. major* that attested the inefficacy of unloaded MCT NE (see **Table 2**). Activity revealed by the *in vivo* test may be explained by a potential antimicrobial activity of β -lactoglobulin used as an emulsifier in NEs formulation. Indeed, it was shown that β -Ig possesses antibacterial activity *in vitro* toward *Staphylococcus aureus* [66], the most prevalent pathogen in the secondary bacterial infection that is one of the complications of the CL [67]. Secondary bacterial infection can increase the tissue destruction and the resulting scar. Thus, limiting bacterial growth can help lesions healing. Note that xanthan gum (used as emulsion thickener) has no antibacterial activity [68].

On the other hand, mice cured topically with Cext MCT for 24 days exhibited a very high parasite burden in skin estimated at 17 546 parasites per 10 ng of mice DNA, which is higher than parasite burden found in the untreated mice (i.e. 12 565 parasites / 10 ng DNA). This result

suggested that additionally to toxicity revealed by mice hair loss, Cext MCT formulation provoked a deficit of the immune response resulting in higher rate of parasites multiplication.

It should be noted that the parasite load of the spleen and liver was determined for all the mice (data not shown). For all groups, no high parasite load was detected in these organs, which revealed that the parasites remained in the skin of the animal and consequently the disease has not evolved to the visceral form.

As widely described in literature [46,65], we markedly found in our study a correlation between parasite burden and lesion size evolution. MCT NE loaded with *Citrus limon* extract (Cext MCT NE) exhibited the highest efficacy in both stabilizing lesion size and reducing parasite burden. This formulation could be an alternative drug candidate for the topical treatment of *L. major* lesions. Interestingly, unloaded MCT NE exhibited slight but significant effect in reducing lesion area associated with a considerable reduction of parasite burden. Finally, treatment failure observed with *Citrus limon* solubilized in MCT (Cext MCT) was firstly revealed by the apparition of toxicity signs, such as mice hair loss. Afterwards, there was no significant reduction in lesion size accompanied by a significant increase of parasite burden compared to untreated mice. This could be due to an immune toxicity provoked by this topical formulation.

3.3.2. Topical treatment with SO-based formulations

The second system investigated in our study was the SO-based formulations. For the *in vivo* efficacy assessment, mice were also divided in 4 groups as previously described in **Table 1**. A group treated with only SO was used as control in order to see if there was a wound healing effect caused by SO alone, as demonstrated by Sharif *et al.* [27]. Owing that, no significant effect of this latter was noticed compared to the untreated animals, we chose not to show these data.

a) Clinical aspects

Clinical manifestations were significantly different from one group to the other (**Fig. 5**). For the untreated group, the same clinical manifestations were observed as with the untreated group of MCT-based formulations (see section 3.3.1). All lesions were ulcerative, and often painful and bloody.

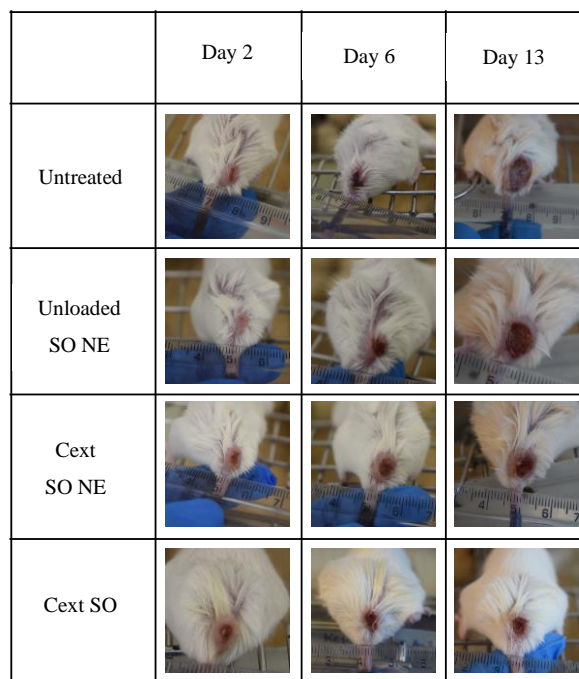


Fig. 5. Time evolution of clinical observations of lesions on the base of mice tail for different groups (from top to bottom): Untreated mice, treated mice with unloaded SO NE, treated mice with loaded sesame oil-NE with *Citrus limon* extract (Cext SO NE), and treated mice with *Citrus limon* extract solubilized in sesame oil (Cext SO).

Mice daily treated with topical unloaded SO NE exhibited ulcerative lesions that progressively became deeper and larger with raised borders. No change in mice hair appearance was noticed. No observable side effects were reported.

Mice treated with Cext SO NE exhibited crusty lesions with reddish raised inflammatory borders. From the second week of treatment, we observed paralyzed mice from the hind legs, walking with difficulty. Some of them had nose and mouth bleeding. These clinical features were not particularly noticeable for mice with the largest lesions. Afterwards, a high mortality rate was observed in this group (about 50 %). This led us to stop the experiment on D13 after the beginning of treatment. Actually, neurologic clinical manifestations caused by *Leishmania* parasites are not uncommon but underreported. Frequently associated with the visceral form, only several studies investigated CL neurological sequelae [69]. A report described patients with inflammatory cell invasion of the nerves (neuritis), and in one of them, the inflammation was granulomatous and associated with nerve destruction. Moreover, in some cases, amastigotes were detected inside the perineural sheath [70]. In our study, these clinical features were not seen in other infected treated or untreated mice and was exclusively characteristic of the Cext SO NE treated group. The encapsulation of *Citrus limon* extract in SO-based NE might cause an important inflammatory reaction that might involve nerve destruction and even promote the *L. major* migration to the perineural sheath. The neurological incidence noticed in

this group might also be due to a neurotoxicity caused by the association of *Citrus limon* extract and SO based NE. Actually, previous studies demonstrated NEs capacity to deliver active substances from the skin to the systemic circulation [71]. Moreover, drug release is related to droplet size. Indeed, the smaller the droplet size, the higher are the specific surface area and the solubility pressure of droplets, and consequently the higher is the API release [72]. Hence, observed toxicity could also be caused by the enhancement of transdermal absorption and release of *Citrus limon* extract once loaded in NE.

Finally, mice treated daily with the *Citrus limon* extract solubilized in sesame oil (Cext SO) were significantly different from untreated mice. Indeed, lesion appearance did not significantly change over time. Ulcerative lesion formed a deep crust over ulcer. However small and medium lesions did not significantly evolve and seemed stabilized by daily applications of the treatment. No change was noticed concerning mice well-being. Treatments side effects seemed to be absent.

For all treated groups, no significant weight loss was observed.

b) Lesion size

Lesions size was recorded every other day for the different groups during a period of 13 days. Time evolution of lesion area for studied groups is shown in **Fig. 3-B**. Overall, lesions areas ranged between 20 mm² and 40 mm² at the 2nd treatment day (D2) and exceeded 110 mm² for untreated mice on the last day of treatment. Topically daily-applied unloaded SO NE showed no effect in decreasing or stabilizing lesion areas. Indeed, mice treated with this formulation had no different lesion size evolution compared to untreated mice during the treatment duration. Regarding the group treated with Cext SO NE, lesion size was significantly different ($p < 0.05$) from day 6 compared to untreated mice. On the last day of treatment, mean lesion area did not exceed 70 mm². However, as described in "clinical aspects" section, because of toxicity side effects, 50 % of mice died after one week of treatment. Thus, for this group the decrease of lesions size is not considered meaningful.

Interestingly, Cext SO treated mice presented a very high significant ($p < 0.001$) different lesion size at D13 compared to the untreated mice. Time evolution of lesion size was slowed down. Lesions area seemed to be stabilized over time and did not exceed 50 mm². This positive effect was observed from D6 of topical treatment and was even more marked on the last treatment days. Giving that the SO alone had no efficacy in lesions healing (data not shown), the pronounced efficacy of Cext SO in stabilizing lesion size could be related to the combination of *Citrus limon* extract and SO. As previously described, lipophilic molecules have limited skin permeation compared to hydrophilic ones. Sesame oil is a thick viscous oil that

may increase permeation of extract *via* an occlusive effect. Then, due to its high lipophilicity, the drug could be quickly partition into the lipid layer of the *stratum corneum* and remain there preferentially [54,72]. Lesion size reduction would then be related to increased residence time of *Citrus limon* extract solubilized in SO and accumulated in the upper layer of the skin. This result would favor skin permeation and improve wound healing properties.

This effect was not observed for *Citrus limon* extract solubilized in MCT probably because of the lower viscosity of MCT, compared to SO (22 mPa.s vs 58 mPa.s), which would disadvantage an oil occlusive effect and decrease the extract residence time in the upper skin layer.

c) Parasite load

After 13 days of daily topical treatments, parasite burden in skin of infected mice was assessed (**Fig. 4-B**). Treated and untreated mice pointed out significant differences in skin parasite burdens. The parasite burden in skin of untreated mice was estimated at 10 135 parasites per 10 ng mice DNA. For the group of mice treated with unloaded SO NE, reduction parasite load seemed to be significant as the topically applied treatment allowed to diminish mean *L. major* skin load to 3 860 parasites per 10 ng of mice DNA. Despite its ineffectiveness in reducing or stabilizing lesion size (paragraph 3.3.2.b), unloaded SO NE did not exhibit a great antileishmanial potential. Actually, the correlation between lesions size evolution and parasite load has been consistently demonstrated in literature [73]. However, it was suggested that, for CL experimental models, lesion size did not only depend on parasite burden but also on the mice inflammatory response. Moreover, for the assessment of a treatment efficacy, the determination of parasite burden would rather be more sensitive and quantitative than the lesion size measurement [74,75]. Hence, a topical application of unloaded SO NE could be considered as an alternative candidate for the topical treatment of *L. major* infected mice.

Cext SO NE treated mice exhibited a significant decrease in *L. major* skin load compared to untreated mice with mean values of 3 435 parasites / 10 ng mice DNA. Considering the reported toxicity and the high mortality seen during the experiment, we assumed that these results were highly statistically biased.

Regarding treated mice with Cext solubilized in SO, skin parasite load was shown to be highly significantly decreased ($p < 0.001$) when compared to those of the untreated mice. Estimated number of *L. major* parasites was of 3 610 in 10 ng of mice DNA. This means that, daily topically applied, Cext SO allowed to reduce *L. major* in skin by more 2.8-folds. Thus, the stabilization of lesion size and the reduction of skin parasite load are evidence of the good antileishmanial potential of the *Citrus limon* extract diluted in SO.

3.3.2. Comparison of the two topical treatments

Encapsulation of *Citrus limon* extract in SO-based NE revealed high toxicity in BALB/c with the apparition of neurological manifestations of CL. Thus, Cext SO NE could be neurotoxic to infected mice. Unloaded SO NE did not have any action in reducing lesion size, however, it allowed a significant decrease in parasite load. Finally, the topical administration of *Citrus limon* extract solubilized in SO was able not only to stabilize the lesion size but also to significantly reduce parasite burden.

All these findings throw into questions the lipophilic formulation capacity to permeate into skin. Indeed, *Citrus limon* extract diluted in sesame oil seemed to be able to reach *L. major* parasites located in the phagolysosomes of infected macrophages in dermal layer. The significant reduction of parasite burden attested that the antileishmanial components might not only target macrophages but might also cross the phagolysosomal vacuole membrane [65]. As previously reported for the MCT-based formulation, *Citrus limon* extract had a very different effect on the *L. major* lesions, especially for the hydrophobic formulation (Cext MCT). This proved that *Citrus limon* extract efficacy strongly depended on the oil in which it was diluted (SO or MCT). Toxicity caused by *Citrus limon* extract diluted in MCT was previously explained by a lack of permeation through the skin causing the extract accumulation in epidermis. Conversely, the SO based formulation seemed to enhance the skin penetration of *Citrus limon* extract. Cizinauskas and co-workers highlighted the existence of a correlation between oils composition in fatty acids and their ability to permeate through the skin. This feature is particularly interesting as the permeation profile was demonstrated to be proportional to the unsaturated fatty acids content [76]. Indeed, this was achieved thanks to the potential of their double bonds to form a “kink” structure and to disrupt the ordered skin lipids resulting in penetration enhancement [77]. In our work, sesame oil, rich in mono and polyunsaturated fatty acids such as linoleic and oleic acids, was likely to overcome skin lipid barrier by increasing its fluidity [78]. Conversely, MCT oil, which was only composed of saturated medium chain fatty acids, had limited ability to penetrate skin due to the straight chain structure and high melting point [79,80].

Our findings should allow thinking over the required physicochemical properties to design a suitable topical treatment of CL lesions induced by *L. major*. Yet, further investigations are needed to correlate these physicochemical properties to the corresponding pharmacokinetics of the formulations.

3.4. Histopathology analysis of skin sections

The histopathological investigation is a complementary study that aims to assess the aspect of the different layers of the skin, the effect of different treatments, and to confirm the previous findings (lesion size and parasite load). Parameters considered in our analysis include the

general skin architecture, inflammatory granuloma and necrosis extent, fibrosis or involvement of muscular layer.

Skin samples collected after euthanasia of different mice revealed significant histological changes of infected mice skins compared to the non-infected ones in which we clearly distinguished the three layers of the skin, namely the epidermis, the dermis and the hypodermis (**Fig. 6-a**). This difference was even more noticeable for the infected but untreated mice. The high-resolution scan of untreated mice skin showed a deep alteration in skin architecture (**Fig. 6-b**). Additionally, various necrotic areas were recognizable. Diffuse inflammatory granuloma with an ulcerative surface invaded the dermis. The epidermal layer was completely damaged. Striated muscular fibers were infiltrated by the inflammatory granuloma. Adipocytes, normally present in hypodermis, were absent due to the infiltration of granuloma cells. Diffuse granuloma in hypodermis attested the severity of the inflammation. This feature was confirmed by a skin section away from the site of the lesion that demonstrated a hypodermis that separated from the dermis with recognizable necrotic parts (**Fig. 6-c**). This was an evidence of a serious inflammation.

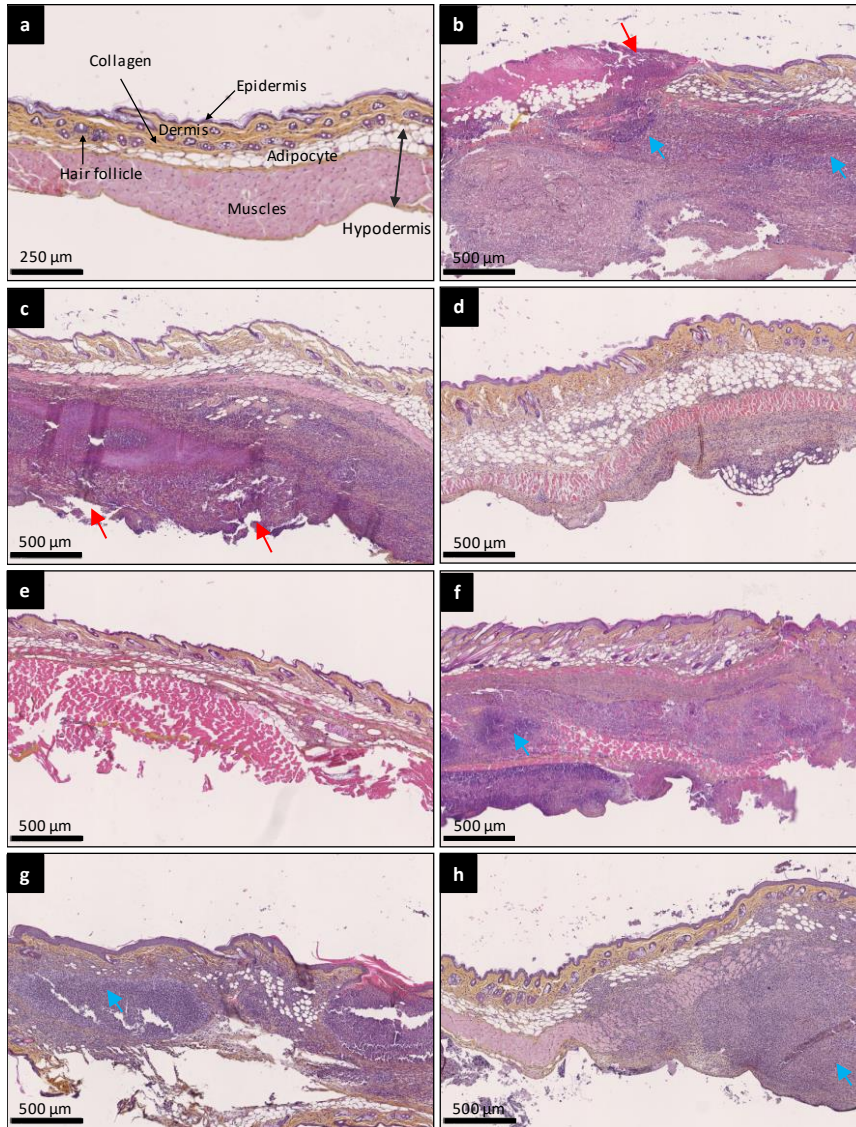


Fig. 6. Histological sections (Hematoxylin-Eosin-Saffranin stain) of the tail base skin of female BALB/c infected with *Leishmania major* (or not) and treated (or not) differently: **(a)** Non-infected skin showing normal architecture; **(b)** Infected and untreated mouse near the lesion site; **(c)** Same infected and untreated mouse away from the lesion site; **(d)** Infected mouse treated daily with topical unloaded nanoemulsion formulated with MCT oil; **(e)** Infected mouse treated daily with topical *Citrus limon* extract loaded in MCT based nanoemulsion; **(f)** Infected mouse treated daily with topical *Citrus limon* extract diluted in MCT oil; **(g)** Infected mouse treated daily with topical *Citrus limon* extract loaded in SO based nanoemulsion; **(h)** Infected mouse treated daily with topical *Citrus limon* extract diluted in SO. Red arrow: necrotic area. Blue arrow: inflammatory granuloma.

MCT: Medium Chain Triglycerides
 SO: sesame oil

Treatment with unloaded NE MCT did not cure the lesion (**Fig. 6-d**), but lesions appearance attested to a healing tendency revealed by the skin architecture that was not damaged. Different skin layers were perfectly recognizable with a continuous epidermis layer. Compared to non-infected mice skin section (**Fig. 6-a**), an increase in epidermal layer revealing hyperplasia was observable. The extent of the inflammatory granuloma was far more limited compared to the

infected and non-treated mice. Additionally, significant decrease of inflammatory cells density in dermis and hypodermis was noticeable. Muscular fibers involvement was almost absent. Adipocytes were preserved. Adnexal structures such as hair follicles and glands were regularly seen. A thick layer of collagen was visible under the epidermis (orange layer). All these observations demonstrated an eventual healing process.

Treatment with topical Cext MCT NE allowed curing or stabilizing lesions. Histological study of skin sections from this group confirmed the treatment efficacy. Indeed, skin histology was not significantly different from normal skin. The skin architecture was perfectly preserved (**Fig. 6-e**). Different skin layers were recognizable. Additionally, muscular fibers and adipocytes layer were present. Adnexal structures such as hair follicles and glands were regularly visible. Compared to normal skin, a very slight increase in epidermis layer was noticed. Granulomatous infiltration was absent. Collagen, stained in orange, was often present in appreciable amount in both dermis and hypodermis layers. All these features confirmed the wound healing process already observed in this group.

Mice treated with Cext MCT exhibited alopecia and lesions did not cure. Histological study revealed that the skin architecture was partially damaged (**Fig. 6-f**). Epidermal changes were visible such as hyperplasia and papillomatosis. Muscular fibers were infiltrated by granulomatous cells and adipocytes were also involved. High density of granuloma was localized in deep hypodermis layer that attested the severity of the inflammation. Several vessels were visible which was due to the infiltration of inflammatory cells by the blood circulation. Under the epidermis layer, edema was shown in white; this confirmed the important swelling previously reported in clinical manifestations. Thus, histology features validated our findings.

Regarding the Cext SO NE, no healing was observed. Skin histology revealed a high increase in epidermis layer resulting in hyperplasia (**Fig. 6-g**). Multiple necrotic areas were visible. Adnexal structures were scarce. Muscle fibers were deeply infiltrated by granuloma. Adipocytes were destroyed by granulomatous involvement. Granuloma was localized in both dermis and hypodermis. Inflammatory cells infiltration density was as important as for untreated mice. These observations were evidence of the failure of the treatment.

Mice treated with Cext SO did not cure. Histological study showed skin architecture preservation (**Fig. 6-h**). Epidermis, dermis and hypodermis were recognizable. However, a significant thickening of the epidermis indicating hyperplasia was observable. The extent of granuloma was important and reached the hypodermis layer. However, away from the skin lesion, these features were different. Indeed, adnexal structures became regularly present. Rare involvement of muscle fibers was noticed. Additionally, adipocytes were preserved. Underneath the epidermis, a collagen rich layer, colored in orange, could be observed. Several

vessels were visible indicating a revascularization of the lesion. All these features could be indicative of an eventual healing process.

4. Conclusion

NEs encapsulating *Citrus limon* extract were successfully prepared either with MCT or SO. *In vitro* evaluation of their antileishmanial activity showed a great potential against intracellular *L. major* amastigotes for both MCT and SO based NEs. Cext MCT NE formulation was more selective against *L. major* parasites. Besides, cytotoxicity of *Citrus limon* extract decreased by encapsulating it in MCT NE, compared to non-encapsulated *Citrus limon* extract. The *in vivo* study showed a significant difference in treatment efficacy depending on the oil used for NE preparation. Cext MCT NE had the highest topical efficacy since lesion size was stabilized over time and parasite burden decreased. Conversely, a high neurological toxicity was exhibited by Cext SO NE and no treatment efficacy was shown. Thus, topical treatment of Cext MCT NE could be considered as a potential candidate formulation in the treatment of *L. major* CL.

On the other hand, when diluted in MCT, *Citrus limon* extract applied topically caused alopecia accompanied with high inflammatory reaction and very high parasite burden. However, when diluted in SO, the *Citrus limon* extract revealed a great efficacy both in reduction of lesion size and the parasite load. All these features could be due to different penetration profiles of these formulations through the skin because of the difference of fatty acids composition of oils. Although our histological study was in accordance with this hypothesis, a further *ex-vivo* study using Franz diffusion cells would be very informative. Finally, our study highlighted the potential of lipid formulations to treat topically CL lesions.

Acknowledgements

Mrs Zeineb Maaroufi would like to thank University Paris-Saclay, University of Carthage (Tunisia), and the Laboratory of Materials Molecules and Applications (IPEST, Tunisia) for the funding granted to carry out this research work. We thank Mrs Françoise Gaudin, responsible of Histopathology Platform of Clamart (PHIC) (UMR 996/IPSIT, France) for the histopathology experiments.

Appendix A

References

- [1] WHO | Leishmaniasis Factsheets, WHO (2017).
- [2] N.E. Aronson, C.A. Joya, Cutaneous leishmaniasis updates in diagnosis and management, *Infect. Dis. Clin. NA.* 33 (2019) 101–117.
- [3] WHO |, Global Health Observatory (GHO) data, Leishmaniasis. (2017).
- [4] J. Alvar, I.D. Vélez, B. Caryn, H. Mercé, D. Philippe, C. Jorge, J. Jean, de Boer Margrieten, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One.* 7 (2012).
- [5] M. Karami, M. Douidi, M. Setorki, Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran, (2013) 30–37.
- [6] K. Aoun, A. Bouratbine, Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite.* 21 (2014) 14.
- [7] F. Bailey, K. Mondragon-Shem, P. Hotez, J.A. Ruiz-Postigo, W. Al-Salem, Á. Acosta-Serrano, D.H. Molyneux, A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017)
- [8] G. Tracy, L.C. Simon, Topical treatment of cutaneous leishmaniasis, *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 3 (2002) 1472–4472.
- [9] M. Akbari, A. Oryan, G. Hatam, Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review, *Acta Trop.* 172 (2017) 86–90.
- [10] T.S. Tiunan, A.O. Santos, T. Ueda-Nakamura, B.P.D. Filho, C. V. Nakamura, Recent advances in leishmaniasis treatment, *Int. J. Infect. Dis.* 15 (2011).
- [11] J. Chakravarty, S. Sundar, Drug resistance in leishmaniasis, 2 (2019) 167–176.
- [12] R.J. Hamill, Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity, *Drugs.* 73 (2013) 919–934.
- [13] B. Stella, L. Giraudo, C. Della Pepa, D. Gastaldi, Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 5289–5311.
- [14] I.M. Pinheiro, I.P. Carvalho, C. Ernanda, S. De Carvalho, L.M. Brito, A. Braga, A. Mendes, C. Júnior, F. Aécio, A. De Carvalho, A. Luis, M. Carvalho, Evaluation of the *in vivo* leishmanicidal activity of amphotericin B emulgel: an alternative for the treatment of skin leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* (2016).
- [15] M.G. Aguiar, D.L. Silva, F.A. Nunan, E.A. Nunan, A.P. Fernandes, L.A.M. Ferreira, Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens, *J. Antimicrob. Chemother.* 64 (2009) 1234–1240.
- [16] J. El-On, G.P. Jacobs, E. Witztum, C.L. Greenblatt, Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals, *Antimicrob. Agents Chemother.* 26 (1984) 745–751.
- [17] B.A. Arana, C.E. Mendoza, N.R. Rizzo, A. Kroeger, Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methymbenzothonium chloride ointment in Guatemala, 65 (2001) 466–470.
- [18] G. Faghihi, Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate, (2003) 13–16.
- [19] J.A.G. Whitworth, T. Jalayer, R.L. Ghasemi, P. Olliaro, M. Nilforooshzadeh, A. Asilian, A Randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of Aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53 (1995) 648–651.
- [20] A. Ben Salah, H. Zakraoui, A. Zaatour, A. Ftaiti, B. Zaafouri, A. Garraoui, P. L. Olliaro, K. Dellagi, A Randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment, *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 53 (1999) 162–166.

- [21] J. Ei-on, S. Halevy, M.H. Grunwald, L. Weinrauch, M.B. Sheva, Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: A double-blind control study, *J. Am. Acad. Dermatol.* 27 (1992) 227–231.
- [22] H. Iqbal, M. Ishfaq, A. Wahab, M.N. Abbas, I. Ahmad, A. Rehman, M. Zakir, Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review, *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6 (2016) 1–5.
- [23] J.M Da Silva, A.A.P Hagea, E.O Silva, Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review., *J. Integr. Med.* 16 (2018) 211–222.
- [24] S. Kotta, A.W. Khan, K. Pramod, S.H. Ansari, R.K. Sharma, J. Ali, Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 585–598.
- [25] A. Ali, G. Mekhloufi, N. Huang, F. Agnely, β -lactoglobulin stabilized nanemulsions - Formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability, *Int. J. Pharm.* 500 (2016) 291-304.
- [26] R. Townend, R.J. Winterbottom, S. Timasheff, Molecular interactions in β -lactoglobulin. Ultracentrifugal and electrophoretic studies of the association of β -lactoglobulin below its isoelectric point, 82 (1960) 3161–3168.
- [27] M. Reza Sharif, J. Alizargar, A. Sharif, Evaluation of the wound healing activity of sesame oil extract in rats, *World J. Med. Sci.* 9 (2013) 74–78.
- [28] Gratuiciel : ICEstimator, <http://www.antimalarial-icestimator.net/>,(2018).
- [29] M.R. Santin, A.O. Dos Santos, C.V. Nakamura, B.P. Dias Filho, I.C.P. Ferreira, T. Ueda-Nakamura, *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*, *Parasitol. Res.* 105 (2009) 1489–1496.
- [30] J.L.P. Godinho, C. Simas-Rodrigues, R. Silva, T.P. Ürmenyi, W. De Souza, J.C.F. Rodrigues, Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39 (2012) 326–331.
- [31] E. Bouyer, G. Mekhloufi, I. Le Potier, T. du F. de Kerdaniel, J.L. Grossiord, V. Rosilio, F. Agnely, Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic, *J. Colloid Interface Sci.* 354 (2011) 467–477.
- [32] D.J. McClements, H. Xiao, Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics, *Food Funct.* 3 (2012) 202–220.
- [33] S. Fredriksson, Scanning isoelectric focusing in small density gradient column, *Analytical biochemistry.* 50 (1972) 575-585.
- [34] Y.C. He C., Hu Y., Yon L., Tang C., Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles., *Biomaterials.* 31 (2010) 3657–3666.
- [35] T.B. Le, C. Beaufay, D.T. Nghiem, M.P. Mingeot-Leclercq, J. Quetin-Leclercq, *In vitro* anti-leishmanial activity of essential oils extracted from Vietnamese plants, *Molecules.* 22 (2017) 1–12.
- [36] Y.J. Fan Y., Zhang Y., Yokoyama W., Endocytosis of corn oil-caseinate emulsions *in vitro*: Impacts of droplet sizes., *Nanomaterials.* 7 (2017) 349.
- [37] X.H. Zheng J., Li Y., Song M., Fang X., Cao Y., McClements D.J., Improving intracellular uptake of 5-demethyltangeretin by food grade nanoemulsions., *Food Res. Int.* 62 (2014) 98–103.
- [38] J.S. Park, E.J. Lee, J.C. LEE, W.K. Kim, Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated Raw264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF- κ B and ERK signaling pathways., *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 70–77.
- [39] Y.S. Hoshimoto, Y. Suzuki, T. Katsuno, H. Nakajima, Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A., *Br. J. Pharmacol.* 136 (2002) 280 – 286.

- [40] D.P. Cnop, J. Hannaert, A. Hoorens, D. Eizirik, Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation., *Diabetes*. 50 (2001) 1771–1777.
- [41] K. Kiran, M. Asad, Wound healing activity of *Sesamum indicum* L seed and oil in rats., *Indian J. Exp. Biol.* 46 (2008) 777–82.
- [42] S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B*. 5 (2015) 442–453.
- [43] M. Sharma, R. Sharma, D.K. Jain, Nanotechnology based approaches for enhancing oral bioavailability of poorly water-soluble antihypertensive drugs, *Scientifica (Cairo)*. 2016 (2016), 11 pages.
- [44] R. Saffie-Siebert, J. Ogden, M. Parry-Billings, Nanotechnology approaches to solving the problems of poorly water-soluble drugs, *Drug Discov. World*. 6 (2005) 71–76.
- [45] A. de Souza, D.S.S. Marins, S.L. Mathias, L.M. Monteiro, M.N. Yukuyama, C.B. Scarim, R. Löbenberg, N.A. Bou-Chacra, Promising nanotherapy in treating leishmaniasis, *Int. J. Pharm.* 547 (2018) 421–431.
- [46] J. Schwartz, E. Moreno, C. Fernández, I. Navarro-Blasco, P.A. Nguewa, J.A. Palop, J.M. Irache, C. Sanmartín, S. Espuelas, Topical treatment of *L. major* infected BALB/c mice with a novel diselenide chitosan hydrogel formulation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 62 (2014) 309–316.
- [47] A.L. Siefert, A. Ehrlich, M.J. Corral, K. Goldsmith-Pestana, D. McMahon-Pratt, T.M. Fahmy, Immunomodulatory nanoparticles ameliorate disease in the *Leishmania (Viannia) panamensis* mouse model, *Biomaterials*. 108 (2016) 168–176.
- [48] S. Gupta, A. Pal, S.P. Vyas, Drug delivery strategies for therapy of visceral leishmaniasis, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 371–402.
- [49] Mojtaba Salouti and Azam Ahangari Additional, Nanoparticle based drug delivery systems for treatment of infectious diseases, in: *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.*, 2017: pp. 11–17.
- [50] S.A. Chime, F.C. Kenechukwu, A.A. Attama, Nanoemulsions — Advances in formulation, characterization and applications in drug delivery, *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.* (2014), 76–127.
- [51] D. Amidouche, P. Montassier, M.C. Poelman, D. Duchêne, Evaluation by laser doppler velocimetry of the attenuation of tretinoin induced skin irritation by β -cyclodextrin complexation, *Int. J. Pharm.* 111 (1994) 111–116.
- [52] S.A. Nasrollahi, A.R. Abbasian, E.S. Farboud, *In vitro* comparison of simple tretinoin-cream and cream loaded with tretinoin-SLN, *J. Pharm. Technol. Drug Res.* 2 (2013) 13.
- [53] K.A. Shah, A.A. Date, M.D. Joshi, V.B. Patravale, Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery, *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 163–171.
- [54] K. Van Bocxlaer, V. Yardley, S. Murdan, S.L. Croft, Drug permeation and barrier damage in *Leishmania*-infected mouse skin, *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016) 1578–1585.
- [55] T.A. Wani, F.A. Masoodi, S.M. Jafari, D.J. McClements, Safety of nanoemulsions and their regulatory status, Elsevier Inc., 2018.
- [56] U.M. Musazzi, S. Franzè, P. Minghetti, A. Casiraghi, Emulsion *versus* nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product?, *Drug Deliv. Transl. Res.* 8 (2018) 414–421.
- [57] G. Guglielmini, Nanostructured novel carrier for topical application, *Clin. Dermatol.* 26 (2008) 341–346.
- [58] L.M. Katz, K. Dewan, R.L. Bronaugh, Nanotechnology in cosmetics, *Food Chem. Toxicol.* 85 (2015) 127–137.
- [59] L.S. Raquel Costa, Delivery systems for cosmetics- from manufacturing to the skin of natural antioxidants, *Powder Technol.* (2017) 402–416.
- [60] K. Ahmed, Y. Li, D.J. McClements, H. Xiao, Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties, *Food Chem.* 132 (2012) 799–807.

- [61] V. Ryu, D.J. McClements, M.G. Corradini, J.S. Yang, L. McLandsborough, Natural antimicrobial delivery systems: Formulation, antimicrobial activity, and mechanism of action of quillaja saponin-stabilized carvacrol nanoemulsions, *Food Hydrocoll.* 82 (2018) 442–450.
- [62] C.D. Kaur, S. Saraf, Topical vesicular formulations of *Curcuma longa* extract on recuperating the ultraviolet radiation-damaged skin, *J. Cosmet. Dermatol.* 10 (2011) 260–265.
- [63] S.G. Rainer H. Müller, Karsten Mäder, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 161–177.
- [64] R. H. Muller, R. Shegokar, C. M. Keck, 20 Years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): Present state of development & industrial applications, *Curr. Drug Discov. Technol.* 8 (2011) 207–227.
- [65] M.R. Jaafari, N. Bavarsad, B.S.F. Bazzaz, A. Samiei, D. Soroush, S. Ghorbani, M.M.L. Heravi, A. Khamesipour, Effect of topical liposomes containing paromomycin sulfate in the course of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 2259–2265.
- [66] L. Chaneton, J.M. Pérez Sàez, Antimicrobial activity of bovine β -lactoglobulin against mastitis-causing bacteria, *J. Dairy Sci.* 94 (2011) 138–145.
- [67] G. Sardeghian, H.Ziaie, Isolation of Bacteria causing secondary bacterial infection in the cutaneous leishmaniasis, *Indian J Dermatol.* 53 (2008) 129–131.
- [68] M.H. Abu Elella, R.R. Mohamed, E. Abd ElHafeez, M.W. Sabaa, Synthesis of novel biodegradable antibacterial grafted xanthan gum., *Carbohydr. Polym.* 173 (2017) 305–311.
- [69] C.A. Petersen, M.H.W. Greenlee, Neurologic manifestations of *Leishmania* spp. infection, *J. Neuroparasitology.* 2 (2011) 1–9.
- [70] R. Kubba, A.M. El-Hassan, Y. Al-Gindan, A.H.S. Omer, M. Bushra, M.K. Kutty, Peripheral nerve involvement in cutaneous leishmaniasis (Old World), *Int. J. Dermatol.* 26 (1987) 527–531.
- [71] T.P. T.P.U Ravi, Nanoemulsions for drug delivery through different routes., *Res. Biotechnol.* 2 (2011) 1–13.
- [72] Baspinar Y and Borchert H-H, Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions-Is there a benefit of the positive charge?, *Int.J. Pharm.*, 430 (2012), 247-252
- [73] S. Khandavilli, B. Health, R. Panchagnula, Studies of the skin permeation of lipophilic drugs: Paclitaxel, *Pharmazie* 62 (2015) 471–473.
- [74] R. Lira, M. Doherty, G. Modi, D. Sacks, Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*., *Infect. Immun.* 68 (2000) 5176–82.
- [75] J.S. Lanza, F.R. Fernandes, J.D. Corrêa-Júnior, J.M.C. Vilela, R. Magalhães-Paniago, L.A.M. Ferreira, M.S. Andrade, C. Demicheli, M.N. Melo, F. Frézard, Polarity-sensitive nanocarrier for oral delivery of Sb^V and treatment of cutaneous leishmaniasis, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 2305–2318.
- [76] C. Demicheli, R. Ochoa, J.B. Da Silva, C.A. Falcão, B. Rossi-Bergmann, A.L. De Melo, R.D. Sinisterra, F. Frézard, Oral delivery of meglumine antimoniate- β -cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 100–103.
- [77] V. Čizinauskas, N. Elie, A. Brunelle, V. Briedis, Skin penetration enhancement by natural oils for dihydroquercetin delivery, *Molecules.* 22 (2017) 1–16.
- [78] B.W. Barry, Mode of action of penetration enhancers in human skin, *J. Control. Release.* 6 (1987) 85–97.
- [79] A. Asghar, M.N. Majeed, Chemical characterization and fatty acid profile of different sesame varieties in Pakistan, *Am. J. Sci. Ind. Res.* 4 (2013) 540–545.
- [80] S.A. Ibrahim, S.K. Li, Efficiency of fatty acids as chemical penetration enhancers: Mechanisms and structure enhancement relationship, *Pharm. Res.* 27 (2010) 115–125.
- [81] N.D. Shah, Berkeley N. Limketkai, The use of medium-chain triglycerides in gastrointestinal disorders, *Pract. Gastroenterol.* 160 (2017) 20–28.

Appendix A

Table A: Results of different systems interfacial rheology

Interface	Tension γ (mN.m⁻¹)
PB/SO	8.1 \pm 0.1
β -lg/SO	4.5 \pm 0.2
PB/MCT	13.5 \pm 0.2
β -lg/MCT	7.7 \pm 0.3

Mean \pm SD (n = 3)

MCT (70:30): medium chain of triglycerides

SO: sesame oil

PB: phosphate buffered solution (pH=7.0)

β -lg: β -lactoglobulin

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons démontré le potentiel antileishmanien des NEs encapsulant l'extrait de *Citrus limon* (à la concentration de 0,1 (m/m) %). A cette concentration d'extrait, selon l'étude *in vitro*, la sélectivité vis-à-vis du parasite *L. major* a été significativement différente en fonction de l'huile utilisée (MCT ou SO). En effet, la sélectivité de l'extrait vis-à-vis du parasite a été nettement améliorée lorsque l'extrait a été encapsulé dans le système NE MCT. A l'opposé, l'extrait n'est plus sélectif et est plus cytotoxique lorsqu'il est encapsulé dans le système NE SO. Malgré cette toxicité importante aux cellules du macrophage, le système NE SO contenant 0,1 % d'extrait a été testé sur le modèle de leishmaniose cutanée expérimentale sur souris BALB/c.

L'étude *in vivo* a également montré une différence significative de l'efficacité antileishmanienne selon le type d'huile utilisée. Le traitement par voie topique à la NE MCT encapsulant l'extrait a révélé la meilleure efficacité du traitement par la stabilisation de la taille des lésions et aussi par la diminution de la charge parasitaire au niveau de la lésion par rapport au groupe de souris infectées et non traitées. Inversement, le traitement des lésions par la NE SO encapsulant l'extrait n'a révélé aucune efficacité antileishmanienne et a même engendré une toxicité neurologique élevée chez le groupe de souris traitées avec ce système. Ainsi, la NE à base de MCT pourrait être considérée comme un traitement prometteur pour le traitement topique des lésions dues à *L. major*.

D'autre part, l'application locale de l'extrait dilué dans du MCT a provoqué une alopécie accompagnée d'une forte réaction inflammatoire et une charge parasitaire très élevée. Cependant, le traitement topique par l'extrait dilué dans l'huile de sésame a révélé une efficacité considérable aussi bien dans la diminution de la taille des lésions que dans la réduction de la charge parasitaire. La différence d'efficacité entre les deux préparations pourrait être expliquée par des profils de pénétration différents de ces formulations à travers la peau qui serait due à la différence de composition en acides gras des huiles MCT et huile de sésame. L'étude histologique des peaux de souris a confirmé ces hypothèses. Cette étude a également permis de démontrer le potentiel des formulations lipidiques dans le traitement local des lésions de leishmaniose cutanée, souvent sous-estimé dans la littérature. Des travaux complémentaires sont nécessaires afin de valider les conclusions. Dans ce contexte, une étude *ex vivo* utilisant des cellules de diffusion (cellules de Franz) pourrait être envisagée afin de mettre en évidence les différents profils de pénétration des formulations étudiées.

Conclusions et perspectives

Ce projet de thèse a visé le développement d'une nanoémulsion (NE), encapsulant un extrait de plante issue de la flore tunisienne, dont l'efficacité pour le traitement topique des lésions de leishmaniose cutanée (LC) à *L. major* a été prouvée sur un modèle animal. Ce projet a permis de conforter l'intérêt de la phytothérapie qui représente une approche très attrayante exploitant la diversité de molécules bioactives issue des plantes. Ainsi, cette alternative pourrait pallier les problèmes de coût élevé et de toxicité que représentent les traitements conventionnels de la LC.

Dans un premier temps, la sélection de l'extrait a été réalisée grâce à un criblage des huiles essentielles (HE) et des extraits (organiques et aqueux) issus de plantes locales de la flore tunisienne *in vitro* vis-à-vis de leur activité antileishmanienne sur deux formes du parasite (amastigote axénique et amastigote intramacrophagique) et de leur cytotoxicité sur les cellules hôtes, à savoir les macrophages (Chapitre 2). Le but était de sélectionner l'extrait le plus intéressant présentant à la fois une activité antileishmanienne marquée et une toxicité faible voire absente vis-à-vis des cellules hôtes. La variation des techniques et des solvants d'extraction ainsi que les régions de récolte des plantes sélectionnées (*Artemisia herba-alba*, *Pistacia lentiscus* ou *Citrus limon*) visaient à extraire le plus large panel de molécules bioactives. L'étude de l'activité antiparasitaire ainsi que la cytotoxicité *in vitro* des différents extraits a démontré que celles-ci sont étroitement liées à la forme du parasite (amastigote axénique ou amastigote intramacrophagique), à la nature de l'espèce végétale étudiée, aux caractéristiques de la région de récolte et au protocole d'extraction des molécules bioactives (technique et/ou solvant d'extraction).

Les différences significatives d'activité *in vitro* d'un même extrait ou HE entre les formes amastigote axénique et intramacrophagique du parasite indiquent le pouvoir des substances actives à franchir les barrières cellulaires et à résister aux conditions des différents compartiments (température, pH, présence d'ions ...). Dans la littérature, les extraits ou HE actifs sur la forme intramacrophagique sont largement privilégiés puisque ce modèle *in vitro* de la leishmaniose offre une meilleure prédictibilité. Cependant, pour les molécules plutôt actives sur la forme libre du parasite, l'encapsulation et la vectorisation peuvent présenter des stratégies prometteuses permettant aux principes actifs d'atteindre le parasite à l'intérieur de la vacuole parasitophore. En outre, il est important que cette activité antileishmanienne soit consolidée par une bonne sélectivité vis-à-vis des parasites induisant une toxicité minimale aux cellules hôtes.

D'autre part, la variation de l'activité antiparasitaire en fonction de l'espèce de la plante et de sa région de récolte a été largement reportée dans la littérature puisque toutes les plantes présentent des différences qualitatives et quantitatives au niveau de leur composition phytochimique, en fonction de leur espèce, leur emplacement géographique (altitude, orientation, voisinage...), la qualité du sol, le climat, la saison et l'année de récolte, des conditions d'extraction ...[1–3]. A l'issue de cette étude, un seul extrait a été sélectionné afin de l'encapsuler et de poursuivre l'étude de son efficacité antileishmanienne *in vitro* et *in vivo* sous la forme d'un système vecteur de type nanoémulsion. Notre choix s'est orienté vers la plante du *Citrus limon* (plus précisément l'extrait acétone) puisque son activité antileishmanienne n'avait jamais été décrite auparavant. Il convient de noter que malgré leur efficacité remarquable sur le parasite *L. major*, plusieurs extraits ou HEs ont été écartés soit pour leur toxicité vis-à-vis des macrophages (les extraits et HEs issus du Pistachier lentisque) ou pour leur rendement faible d'extraction (cas de toutes les HEs qui peut constituer un frein à l'étape de formulation. Néanmoins, malgré cette limite, les huiles essentielles peuvent présenter l'avantage d'être facilement caractérisables par GC-FID et GC-MS et notamment en raison de la disponibilité des molécules standards (terpènes). Ceci n'est pas le cas pour les extraits organiques/aqueux qui sont composés d'un mélange très complexe de molécules ayant des propriétés très différentes, difficilement caractérisables par une seule méthode. Ainsi, une étude de caractérisation préliminaire de l'extrait acétone du *Citrus limon* a été réalisée en utilisant un dispositif de microextraction par SPME couplé à la GC-MS. Mais, seule une composition qualitative et non exhaustive a été dégagée. Certains composés identifiés, comme le caryophyllène et le bergamotène, ont déjà été décrits pour leur efficacité contre la LC. Cependant, ces données ne sont pas suffisantes pour interpréter les résultats observés et identifier plus précisément les molécules responsables de l'inhibition des leishmanies. Des expériences complémentaires seront donc nécessaires.

Dans un second temps, nous avons développé un système d'encapsulation pour l'extrait choisi dans l'objectif d'améliorer son efficacité thérapeutique, tout en diminuant sa cytotoxicité. A la suite d'une étape d'optimisation d'une NE stabilisée par une protéine laitière, la β -lactoglobuline (β -lg), l'extrait a été dispersé à différentes concentrations dans deux types d'huile MCT (triglycérides à chaînes moyennes) et SO (huile de sésame). Ainsi, deux types de NEs ont été obtenus : NE MCT et NE SO. La caractérisation physicochimique de ces NEs a montré que les conditions de formulation choisies ont permis d'avoir des systèmes stables physiquement et des diamètres hydrodynamiques de gouttelettes ne dépassant pas les 50 nm sur une période de stockage de 30 jours. L'activité antileishmanienne et la cytotoxicité *in vitro* des différentes NEs ont été significativement différentes en fonction de la concentration de l'extrait et de la nature d'huile utilisée. Une activité d'inhibition des formes *L. major* intracellulaires très

intéressante a été observées avec les NEs encapsulant jusqu'à 0,5% d'extrait acétone du *Citrus*, comparable à celle de l'extrait brut. Au-delà, la NE perd son activité. Cette différence significative d'activité a été expliquée par la différence du nombre de nanogouttelettes potentiellement en contact avec un macrophage infecté. Il serait donc intéressant d'étudier l'efficacité antiparasitaire en fonction de ce paramètre. La toxicité vis-à-vis des macrophages, apparait pour sa part plutôt liée à la nature d'huile utilisée. Les systèmes à base d'SO ont été nettement plus toxiques que ceux à base de MCT. Ceci serait probablement dû à la différence de composition de ces deux huiles, notamment à la longueur des chaînes de triglycérides. Il serait alors intéressant d'étudier l'impact de ce paramètre sur la toxicité des systèmes émulsionnés sur différents types cellulaires.

Cette deuxième partie du projet nous a permis de sélectionner le système NE MCT à 0,1% qui a présenté aussi bien une activité antileishmanienne très intéressante, comparable à celle du contrôle positif (la miltéfosine) qu'une toxicité minimale aux macrophages. Par ailleurs, en dépit de sa toxicité, nous avons également sélectionné le système le plus actif à base d'SO (NE SO 0,1%) puisque cette huile possède un effet anti-inflammatoire et cicatrisant, pouvant jouer un rôle dans le traitement des lésions de LC.

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons démontré l'efficacité *in vivo* des deux systèmes sélectionnés et encapsulant l'extrait acétone de *Citrus limon* comme traitement topique sur le modèle expérimental de LC à *L. major* sur des souris BALB/c. Cette étude sur ce modèle animal a montré des résultats analogues à ceux de l'étude *in vitro*. En effet, une différence significative de l'efficacité antileishmanienne a été constatée selon le type d'huile utilisée. Le traitement par voie topique à la NE à base de MCT encapsulant l'extrait a révélé la meilleure activité en stabilisant la taille des lésions, en diminuant la charge parasitaire et en limitant l'inflammation de la peau. L'application topique de NE MCT a aussi permis de s'affranchir du problème de toxicité de l'extrait brut observé lorsqu'il est dissout dans l'huile et directement appliqué sur la peau (alopécie, réaction inflammatoire...). D'autre part, l'étude histologique de la peau traitée par NE MCT encapsulant l'extrait (Cext NE MCT) a démontré que ce dernier a initié la cicatrisation des plaies durant la période d'étude. Ainsi, la NE à base de MCT encapsulant l'extrait acétone des feuilles de citronnier pourrait être considérée comme un traitement prometteur pour le traitement topique des lésions dues à *L. major*.

En revanche, le système NE à base d'SO encapsulant l'extrait (Cext NE SO) a engendré une toxicité neurologique élevée et aucune efficacité antiparasitaire. Curieusement, l'application locale de l'extrait brut dilué dans l'SO a révélé une efficacité antileishmanienne aussi bien par la diminution de la taille des lésions que dans la réduction de la charge parasitaire. La différence d'efficacité de l'extrait non encapsulé dépend donc fortement de la nature d'huile dans laquelle

il est dilué. Ceci serait le résultat d'un profil de pénétration significativement différent corrélé avec la composition des huiles en acides gras. Ces résultats ont permis de prouver le potentiel des formulations lipidiques dans le traitement topique des lésions de leishmaniose cutanée à *L. major*.

En perspectives à ce projet, plusieurs investigations peuvent être envisagées afin d'étayer et approfondir les hypothèses avancées tout au long du manuscrit.

La variation de la composition phytochimique en fonction des conditions environnementales a déjà été largement discutée dans littérature. Souvent, il en résulte parallèlement une variation significative de l'activité biologique recherchée, et par conséquent un problème de reproductibilité des résultats. Pour cela, il est nécessaire d'emprunter une démarche d'assurance qualité des substances naturelles. A cet effet, certaines exigences ont été définies [4,5], dont la plus importante est l'authentification, sans équivoque, du matériel végétal. Pour cela, des méthodes, basées sur l'analyse de l'ADN, ont été développées. Des « codes à barres » pourraient être générés visant à constituer une base de données relative aux identités des plantes médicinales. D'autre part, l'analyse de l'extrait et ses principaux composants, ainsi que l'identification de(s) molécule(s) active(s) sont également des étapes primordiales pour l'assurance qualité, mais qui représentent des enjeux permanents dans le domaine de la phytomédecine. Une investigation approfondie de la composition peut s'avérer très complexe car elle nécessite plusieurs techniques de séparation, de caractérisation et d'analyse de données, généralement très longues et fastidieuses. Dans ce contexte, la métabolomique représente une étude dynamique permettant de mesurer qualitativement et quantitativement les métabolites secondaires [6]. Celle-ci suggère certains protocoles à adapter (exemple : l'approche axée sur un composé, un marqueur, un modèle, etc.) afin d'établir « une empreinte » caractérisant l'extrait (Fingerprinting) [7]. Ceci exige la mise en œuvre de plusieurs outils analytiques comme les techniques chromatographiques (la chromatographie sur couche mince (CCM), ou encore la chromatographie liquide sous vide (VLC) permettant une séparation grossière des constituants de l'extrait suivant leur polarité. Ainsi, nous pourrions séparer les composés lipophiles (exemple : la chlorophylle) des composés amphiphiles (exemple : les saponosides), et des composés polaires (exemples : les polyphénols, les tanins ou les sucres ...). Des méthodes plus fines et plus performantes pourraient être ensuite mises en œuvre afin d'affiner les résultats comme l'UPLC-MS (chromatographie en phase liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse) ou dérivatisation par silylation puis GC-MS, etc. La résonance nucléaire magnétique (RMN) pourrait donner des informations complémentaires. Une banque de données doit également être à disposition telle que les indices de rétention Kovats en GC,

les banques de données spectrales (exemple : NIST), les banques de formules brutes pour les données fournies en MS.

Dans le même contexte, plusieurs chercheurs optent pour le fractionnement bioguidé qui peut constituer une piste très attractive pour la recherche des molécules actives sur une pathologie donnée. Le fractionnement peut aussi bien conduire à l'isolement de fractions ou d'un seul composé actif biologiquement actifs à partir d'une matrice complexe [8]. A cet effet, diverses méthodes sont utilisées comme l'extraction liquide-liquide ou des techniques chromatographiques (CCM, CPC,...) [8,9]. Ceci pourrait simplifier significativement la composition de l'extrait et donc faciliter sa caractérisation. Cependant, dans la pratique, l'isolement bioguidé d'une fraction conduit souvent à une activité biologique différente de celle de l'extrait de départ, ce qui soulève la question des interactions additives, synergiques ou antagonistes entre ses composants [10]. Dans la plupart des cas, il est question d'effets de synergies entre les différents métabolites secondaires de la plante et ceci a été très largement démontré dans la littérature. Par exemple, des extraits de racines de *Harpagophytum procumbens* et son dérivé harpagoside, qui serait le principe actif provenant de cette plante, ont été testés pour leur activité contre les maladies rénales inflammatoires [11]. Il a été démontré que l'harpagoside pur n'était inhibiteur qu'à des concentrations beaucoup plus élevées que sa teneur présente à une concentration efficace des extraits. Ceci prouve l'existence évidente d'un effet de synergie entre les différentes molécules des extraits. Un autre exemple est celui de la « St. John's wort » ou *Hypericum perforatum* (Millepertuis perforé) pour lequel, à la suite d'un fractionnement, aucun composé actif n'a expliqué l'activité clinique prouvée contre les troubles dépressifs majeurs [4,12]. C'est donc l'ensemble des composants de l'extrait qui permet de manifester son activité biologique optimale. Plusieurs arguments, ayant pour but de dissuader le fractionnement, ont été identifiés par Williamson, comme la présence dans les extraits bruts d'agents antioxydants qui pourraient « protéger » le(s) principe(s) actif(s) contre leur dégradation [13].

Rappelons que le but de notre projet de thèse a été de contourner la résistance aux médicaments, qui constitue une barrière à l'usage des traitements conventionnels contre la leishmaniose [14]. Garder un « totum » constitue une stratégie très prometteuse afin de pallier les problèmes de résistances aux traitements [10]. Pour cela, les herboristes utilisent des préparations et des mélanges de molécules bioactives qui ne visent pas nécessairement à cibler un organe, un tissu cellulaire ou des systèmes biochimiques particuliers [13]. Cette approche a été décrite comme étant l'approche du « fusil de chasse » ou « herbal shotgun » en anglais, par opposition à la méthode du « remède miracle » de la médecine conventionnelle [15] afin de distinguer l'approche multi-ciblée des plantes médicinales et l'enzyme ou le récepteur spécifique d'un

principe actif de synthèse. En outre, cette stratégie a été adoptée notamment pour les troubles cutanés tels que l'eczéma où le traitement à la médecine traditionnelle chinoise à base de plusieurs plantes (exemples : *Ledebouriella seseloides*, *Potentilla chinensis*, *Rehmannia glutinosa*, ...) présente une efficacité sensiblement supérieure à celle des corticostéroïdes topiques [16].

D'autre part, le fractionnement pourrait conduire à une seule molécule biologiquement active. Dans ce cas, celle-ci est purifiée puis des essais de resynthèse ou d'hémisynthèse sont effectués. Ainsi, depuis 1940, ce processus a permis la découverte à partir des substances naturelles de 80% des principes actifs dans le domaine de l'oncologie [17,18]. Nous citons l'exemple de la nor-anhydrovinblastine et son dérivé fluoré (Navelbine[®] et Javlor[®], Pierre Fabre) qui proviennent de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), le paclitaxel (Taxol[®], Bristol Myers Squibb) et le docétaxel (Taxotere[®], Sanofi) issus de l'If commun (*Taxus baccata*). L'hémisynthèse est une stratégie permettant le développement de médicaments, mais est surtout conçue pour contourner les problèmes d'approvisionnement en matières premières et de contrôle qualité. Tel a été le cas pour le Taxol et les alcaloïdes de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). Cependant, la synthèse de ces molécules, souvent complexes, n'est pas toujours évidente vu la présence de plusieurs carbones asymétriques, et donc la synthèse chimiquement possible de différents isomères, qui présentent des activités biologiques parfois antagonistes [19].

Pour conclure, il serait intéressant d'étudier la possibilité de fractionner l'extrait de *Citrus l.* afin de pouvoir le caractériser plus facilement mais ceci ne doit pas jouer en défaveur de son efficacité biologique identifiée dans notre étude. Pour cela, une comparaison d'efficacité thérapeutique entre l'extrait brut et ses molécules actives pourrait être réalisée afin de prouver un effet synergique ou non entre les différentes molécules. Dans le cas où nous démontrerions qu'une seule molécule serait responsable de l'activité antiparasitaire, il serait intéressant de purifier celle-ci. D'autre part, l'extrait brut sera à tester sur d'autres souches *leishmania* provoquant la leishmaniose cutanée dans l'Ancien Monde (*infantum* et *tropica*).

La caractérisation de l'extrait offre également la possibilité de réaliser une étude de libération et de pénétration de l'extrait *ex vivo* sur des explants de peau d'oreille de porc ou humaine avec les cellules de Franz. Un modèle de peau lésée (par tape stripping) pourrait ainsi être mis en place afin de mimer la lésion de LC. Le profil de diffusion à travers ces explants de peau pourra apporter des explications quant à l'efficacité des différentes formulations réalisées. Ceci aura également pour objectif de démontrer l'importance du choix du système d'encapsulation et le rôle du type d'huile choisie dans l'amélioration des propriétés thérapeutiques d'une substance active.

Il serait également intéressant de réaliser une étude de stabilité physicochimique de l'extrait brut. Une comparaison pourrait être réalisée par rapport à la stabilité de l'extrait encapsulé dans les deux types de formulations. Pareillement, une étude comparative de l'efficacité antileishmanienne de l'extrait et ses produits de dégradation pourrait être réalisée.

Les NEs sont formulées à partir de composés naturels et biocompatibles, à l'exception d'une très faible teneur en agent conservateur (l'azoture de sodium dans notre cas). L'ajout de ce conservateur a eu pour but de protéger la formulation contre la prolifération bactérienne [20]. Bien que nous n'ayons pas constaté d'effet toxique sur la souche de macrophages Raw 264.7, ce conservateur est potentiellement sensibilisant, irritant et/ou allergisant pour la voie topique [20]. Pour ces raisons, nous pouvons envisager de le remplacer par un conservateur couramment utilisé dans le domaine pharmaceutique, comme les parabènes associés au phénoxyéthanol. Toutefois, ceux-ci peuvent également devenir toxiques à forte dose. De plus, le phénoxyéthanol est un allergène reconnu [20]. Idéalement, ces conservateurs devraient être éliminés des formulations pharmaceutiques. Pour cela, il serait intéressant de tester le pouvoir bactériostatique de l'extrait de citronnier, afin de vérifier si celui-ci pourrait faire office de conservateur naturel et protéger la formulation de la prolifération bactérienne. D'un autre côté, la β -lg a été utilisée pour émulsifier et stabiliser les nanogouttelettes en raison de ses propriétés interfaciales très intéressantes déjà démontrées dans des études ultérieures au sein de notre équipe. Cependant, cette protéine est très souvent impliquée dans les réactions allergiques alimentaires causées par les produits laitiers. Des travaux sont actuellement menés dans le cadre de la thèse en cours de Candice Aravya au sein de l'équipe Physique Pharmaceutique pour évaluer *in vitro* l'immunogénicité de cette protéine sur des kératinocytes. Si cette protéine s'avère immunogène par voie topique, il sera nécessaire de la remplacer par d'autres agents émulsifiants tels qu'une protéine d'origine végétale, moins sujette à provoquer des allergies, par exemple les protéines de pois. Autrement, nous pouvons également envisager l'usage des lécithines pour leur innocuité.

Les résultats de l'étude de l'efficacité antileishmanienne *in vivo* mettent en évidence l'importance du choix des NEs stabilisées par la β -lg aussi bien pour améliorer l'efficacité antileishmanienne que pour pallier les problèmes de toxicité de l'extrait sur la peau. Il serait donc judicieux d'étudier le mode d'action des formulations sur le parasite *L. major* en réalisant une analyse de l'ultrastructure du parasite après le traitement à la NE par microscopie électronique à balayage couplée à la microscopie confocale par marquage de certains composants de la NE. Un marquage de la phase huileuse à une sonde fluorescente sélective (par exemple le rouge de Nile) pourrait être envisagé afin de visualiser par microscopie confocale le comportement des nanogouttelettes en *in vitro* (forme et taille dans le milieu de culture,

localisation, internalisation ou non par le macrophage, ...) ou en *in vivo* (observation de leur distribution dans les différentes couches de la peau). Ces marquages pourraient donc contribuer à la compréhension du mode d'action de l'extrait. La β -lg pourrait être également marquée par des actifs fluorescents comme la rhodamine B isothiocyanate et le fluorescéine isothiocyanate [21], afin d'apporter des explications quant à l'évolution des NEs dans le milieu de culture.

Références bibliographiques

- [1] S. Salido, L. R. Valenzuela, J. Altarejos, M. Nogueras, A. Sanchez, Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain., *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004) 265–277.
- [2] S.A. Said, C. Fernandez, S. Greff, F. Torre, A. Derridj, T. Gauquelin, J.-P. Mevy, S.A. Said, C. Fernandez, S. Greff, F. Torre, A. Derridj, T. Gauquelin, J.-P. Mevy, Inter-Population Variability of Terpenoid Composition in Leaves of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria: A Chemoecological Approach, *Molecules.* 16 (2011) 2646–2657.
- [3] J.S. Singh, P.S. Yadava, Seasonal Variation in Composition, Plant Biomass, and Net Primary Productivity of a Tropical Grassland at Kurukshetra, India, *Ecol. Monogr.* 44 (1974) 351–376.
- [4] G. Ulrich-Merzenicha, D. Panek, H. Zeitlerb, H. Wagnerc, H. Vetter, Review (Part II) New perspectives for synergy research with the “-omic”-technologies, *Phytomedicine.* 16 (2009) 495–508.
- [5] G. Ulrich-Merzenich, H. Zeitler, D. Jobst, D. Panek, H. Vetter, H. Wagner, Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine, *Phytomedicine.* 14 (2007) 70–82.
- [6] J. Delecolle, Approche métabolomique pour une caractérisation plus fine d’extraits de plantes d’intérêts pour la santé humaine, Thèse de doctorat de l’Université de Strasbourg, 2017.
- [7] Z. Zeng, F.T. Chau, H.Y. Chan, C.Y. Cheung, T.Y. Lau, S. Wei, D.K.W. Mok, C.O. Chan, Y. Liang, Recent advances in the compound-oriented and pattern-oriented approaches to the quality control of herbal medicines, *Chin. Med.*, 3 (2 008) 9.
- [8] T. Michel, Nouvelles méthodologies d’extraction, de fractionnement et d’identification : application aux molécules bioactives de l’argousier (*Hippophaerhamnoides*), 2012.
- [9] J. Hadj Salem, Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitrariaretusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique, 2009.
- [10] G. Ulrich-Merzenich, Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products- Potential and challenges for drug development, *Synergy.* 1 (2014) 59–69.
- [11] M. Kaszkin, K.F. Beck, E. Koch, C. Erdelmeier, S. Kusch, J. Pfeilschifter, D. Loew, Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside-dependent and independent effects, *Phytomedicine.* 11 (2004) 585–595.
- [12] R. Verpoorte, Y.H. Choi, H.K. Kim, Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005) 53–56.
- [13] E. Williamson, Synergy and other interactions in phytomedicines, *Phytomedicine.* 8 (2001) 401–409.
- [14] P. Shivam, S. Kumari, F. Jamal, V. Kumar, M. Kumar, S. Bimal, S. Narayan, V.N. Das, K. Pandey, A.K. Gupta, P. Das, S.K. Singh, *Leishmania donovani* resistant to Ambisome or Miltefosine exacerbates CD58 expression on NK cells and promotes trans-membrane migration in association with CD2, *Cytokine.* 96 (2017) 54–58.
- [15] J.A. Duke, M.J. Bodenschutz-Godwin, The synergy principle at in plants, pathogens, insects, herbivores and humans., in: *Nat. Prod. from Plants.*, Eds. Kaufm, CRC Press, New York, 1999: pp. 183–205.
- [16] D.J. Sheehan, M.P., Atherton, A controlled trial of traditional Chinese plants in widespread non-exhudative atopic eczema., *Br. J. Dermatol.* 126 (1992) 179–184.
- [17] G.M. Newman, D.J., Cragg, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461–477.

- [18] D. Newman, C. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J Nat Prod.* 75 (2012) 311–335.
- [19] P. Da Silva, L. Meijer, Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique Pierre Potier (1934-2006), *Med Sci.* (2012) 534–542.
- [20] L. Maitre, Brevet européen EP 2 505 192 A1 : Utilisation d'excipients en tant que conservateurs et composition pharmaceutique les comprenant. (2012).
- [21] C. Schmitt, Etude de la coacervation complexe entre la β -lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine : Nancy, France. (2000).

ANNEXE

Optimisation de la formulation d'une nanoémulsion stabilisée par la β -lactoglobuline par la méthodologie des plans d'expériences

1. Introduction

Habituellement, pour les formulations complexes, l'expérimentation nécessite beaucoup d'effort, de temps et d'argent. En effet, classiquement, les formulations pharmaceutiques sont développées sur plusieurs étapes en modifiant à chaque fois un paramètre de la formulation ou de procédé, et ce afin de comprendre son effet sur une des caractéristiques du système obtenu. Par ailleurs, l'autre inconvénient des méthodes d'optimisation de formulation classiques est la difficulté d'élaborer une formulation idéale en tenant compte de chaque paramètre indépendamment des autres, sans se rendre compte des effets combinés des différentes variables qui pourraient avoir un effet sur les caractéristiques étudiées. Il est donc intéressant d'aborder la complexité des formulations des émulsions en utilisant des outils statistiques tels que la méthodologie des plans d'expériences [1]. En effet, les plans d'expériences aident à organiser au mieux les expériences qui accompagnent la recherche scientifique ou les projets industriels. Ils sont appliqués à de nombreux domaines industriels et disciplines à partir du moment où l'objectif est de chercher un lien qui relie une grandeur d'intérêt à des variables. La méthode de la conception factorielle permet de se rendre compte de l'effet ou la significativité des variables, qu'on appellera dans la suite facteurs, et leur interaction sur une grandeur d'intérêt, qu'on notera réponse. La méthodologie des plans d'expériences permet dans ce cas d'obtenir le maximum d'informations sur le système avec le minimum d'expériences tout en adoptant des modèles et règles mathématiques ainsi qu'une démarche rigoureuse [2]. En outre, la méthode de surface de réponse qui a été décrite pour la première fois par Box et Wilson [3], a été largement exploitée par de nombreuses équipes de recherche afin de concevoir différentes formes galéniques pour divers types de médicaments [1,4–7].

Dans cette étude, nous nous sommes basés sur cette approche pour, d'une part comprendre les différents paramètres (facteurs) qui influencent les grandeurs étudiées, et d'autre part chercher les conditions optimales de formulation de la NE.

2. Choix des différents paramètres de l'étude

2.1. Cahier des charges

Dans une première étape, nous avons défini le cahier des charges de cette étude. Rappelons que le but de ce travail consiste à préparer un système de NE avec une taille de gouttes nanométrique pour assurer les propriétés physicochimiques, notamment la stabilité, ainsi que l'activité biologique. La taille des gouttelettes ainsi la distribution étroite de la NE constituent donc des paramètres clés.

Les caractéristiques de la NE cible ont été définies comme suit :

- Diamètre de gouttes : dans ce travail nous adopté la définition de Solans et *al.* (2005) qui considère qu'une NE possède un intervalle de diamètre de gouttes compris entre 20 et 200 nm [8].
- Une distribution de taille étroite, c'est-à-dire l'indice de polydispersité, PDI, doit avoir une valeur inférieure à 0,2.
- Le système doit être stable à court terme (au moins 3 jours après sa préparation).
- Une viscosité suffisante pour une administration aisée de la NE par voie topique serait un plus.

La β -Ig est la protéine choisie pour stabiliser ces NEs car cette protéine a déjà été très étudiées et a montré son intérêt de part ses propriétés émulsifiante et stabilisantes.

Pour atteindre ces objectifs nous nous sommes intéressés aux critères suivants :

- La concentration de l'émulsifiant : les plus petites concentrations sont à favoriser, afin d'éviter les effets de toxicité et réduire le coût de la formulation.
- La proportion de la phase huileuse : augmenter la teneur en phase dispersée permet de solubiliser une quantité plus importante d'extrait. Pour cela, les grandes fractions en phase huileuse sont à privilégier.

2.2. Choix des facteurs et réponses à étudier

Par définition, les facteurs sont les paramètres contrôlables qui ont une influence directe sur la variation de la réponse [2]. Il est important de définir au préalable les réponses à étudier.

En se basant sur le cahier des charges défini, les réponses choisies ont été :

- Le diamètre des gouttelettes NEs.
- L'indice de polydispersité (PDI).
- Le potentiel zéta : un paramètre révélant aussi la stabilité du système (ζ).
- La viscosité de la NE.

Tous ces facteurs ont été mesurés 3 jours après la formulation suivant les protocoles détaillés dans la section II.3 du chapitre 3.

Nous avons donc estimé que les facteurs ayant une action directe sur la variation de ces réponses sont les suivants :

- Le type d'huile utilisée (MCT et huile de sésame)
- La fraction huileuse dans la NE.
- La concentration de β -lg dans la NE (dispersée dans le milieu tampon PB à pH 7,0).

2.2.1. Choix des niveaux de chaque facteur

Les facteurs peuvent être représentés dans un axe gradué et orienté (Figure A.1).

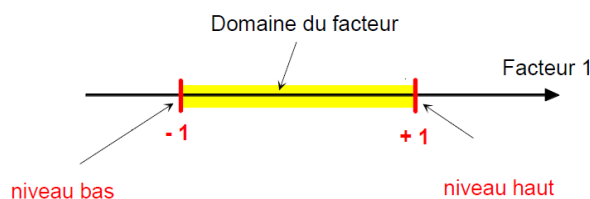


Figure A.1 : Représentation du domaine de variation d'un facteur imaginée par Goupy [2]

La valeur attribuée au facteur dans l'expérience, qu'elle soit qualitative ou quantitative, est appelée niveau. Lors de l'étude de l'influence du facteur sur une réponse donnée, il faut limiter les variations des valeurs attribuées à deux limites ou niveaux: un niveau inférieur et un niveau supérieur [2]. Ces valeurs sont généralement définies à la suite d'essais préliminaires combinés à des recherches bibliographiques. Le Tableau A.1 représente les différents niveaux des facteurs de notre étude. Il est à noter que tous les facteurs choisis sont quantitatifs. Le type d'huile représente un mélange entre les deux huiles choisies à savoir MCT 70/30 et l'huile de sésame (SO)

Tableau A.1 : Le niveau inférieur et niveau supérieur des différents facteurs

Facteur	Niveau inférieur (-1)	Niveau supérieur (+1)
A : Type d'huile (m/m) %	100% MCT	100% SO
B : Fraction huileuse (m/m) %	5	20
C : Fraction de β -lg (m/m) %	0,8	2

2.2.2. Type de plan à exécuter

Cette étude vise à comprendre l'effet de la composition de la NE sur ses caractéristiques physicochimiques. Il s'agit d'une étude exploratoire qui vise à comprendre au mieux le système étudié. Pour cela, en première étape, notre choix s'est porté sur le plan d'expériences le plus simple et complet à exécuter ; il s'agit du plan factoriel complet. En outre, c'est un modèle très utilisé dans les travaux d'optimisation des formulations pharmaceutiques [1,4–7]. Le nombre d'expériences requises pour le plan factoriel complet à deux niveaux est :

$$(\text{Nombre de niveau})^{\text{nombre de facteurs}} = 2^3 = 8 \text{ expériences}$$

Dans notre étude, la méthodologie des plans d'expériences adoptée a conduit à l'exécution du plan factoriel complet décrit dans le Tableau A.2.

Les paramètres que nous avons fixés pour la formulation des NEs ont été les suivants : une étape préalable de pré-émulsification à l'Ultraturax[®] (Ultra Turraxrotor T10, IKA[®]- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) pendant 2 min à une vitesse de 20500 tpm à température ambiante, suivie de 4 passages (cycles) consécutifs dans l'HHP sous une pression de 110 MPa et à une température de 40°C.

Tableau A.2 : Plan factoriel complet type 2³ exécuté dans notre étude

Expérience n°	A : Type d'huile (m/m) %	B : Fraction huileuse (m/m) %	C : Fraction de β -lg(m/m) %
1	100% SO	20	2
2	100% SO	20	0,8
3	100% SO	5	2
4	100% SO	5	0,8
5	100% MCT	20	2
6	100% MCT	20	0,8
7	100% MCT	5	2
8	100% MCT	5	0,8

2.3. Analyse statistique

Les données générées par le plan d'expériences exécuté ont été analysées à l'aide du logiciel statistique Design Expert[®] 11.1.2.0 (Stat-Ease, Inc, USA). Les outils analytiques de ce logiciel nous ont permis de calculer les valeurs de p afin d'évaluer la significativité des facteurs ainsi que leurs interactions, et d'élaborer les surfaces d'iso-réponse qui ont permis d'illustrer les meilleures conditions qui répondent aux critères de l'étude.

3. Résultats

Le tableau A.3 détaille des résultats obtenus après exécution du plan factoriel complet. Les diamètres hydrodynamiques moyens des gouttes des différentes NEs varient de 24 à 303 nm, avec une distribution variable selon la composition de la formulation ($0,2 \leq \text{PDI} \leq 0,4$).

Le potentiel zéta mesuré n'est pas très significativement différent pour toutes les NEs et varie de -44,36 à -60,7 mV. Les gouttelettes d'huiles, pour toutes les formulations, possèdent des charges globales négatives portées par la protéine β -lg. Ceci est en accord avec le pH des solutions, fixé à 7,0, supérieur au point pI de la β -lg ce qui engendre une charge globale négative à la surface des globules.

Tableau A.3 : Résultats des réponses étudiées

Expérience n°	Diamètre hydrodynamique moyen des gouttes (nm)	PDI	Potentiel zéta (mV)	Viscosité mPa.s
1	26	0,3	-54,6	1,7
2	14	0,2	-56,7	27,3
3	303	0,4	-55,3	29,3
4	297	0,3	-44,4	1,4
5	24	0,4	-54,6	2,2
6	45	0,3	-60,7	17,5
7	245	0,2	-51,1	11,7
8	259	0,2	-50,6	2,2

Les viscosités mesurées pour ces NEs présentent des valeurs variables en fonction de la composition, mais restent très faibles pour une application topique (de l'ordre de 10^1 Pa.s). Certaines NEs possèdent des viscosités très proches de celles de l'eau (entre 1,7 et 2,2 mPa.s).

3.1. La significativité des facteurs sur les différentes réponses

La significativité des facteurs sur les réponses a été évaluée grâce aux valeurs de p obtenue par le test Anova (Tableau A.4).

Les résultats montrent que la fraction de l'huile utilisée (facteur B) a eu une très grande significativité ($p < 0,01$) sur la taille des gouttelettes de la NE. Plus cette fraction augmente, plus la diminution de la taille observée est très significativement grande. Cet effet antagoniste est révélé par le coefficient du facteur estimé à -124,375. Ceci prouve que, dans les mêmes conditions opératoires, la taille des gouttelettes produites, pour toutes les concentrations de β -lg utilisées, ne dépend que de la fraction de la phase dispersée. En revanche, ceci est contraire à l'hypothèse habituelle retrouvée en littérature [10–15]. L'augmentation de la fraction huileuse ou du ratio phase dispersée/fraction d'émulsionnant est souvent reliée à la diminution du temps de rencontre des gouttelettes qui entraîne leur fusion (coalescence) [16]. En fait, il est important de savoir que la rupture d'une gouttelette, et donc sa taille, est déterminée par un équilibre entre deux phénomènes : les forces interfaciales qui ont tendance à maintenir les gouttelettes ensemble et les forces disruptives, produites par l'homogénéisateur, qui tendent à les disperser [17]. Dans le cas de notre étude, l'émulsionnant, c'est-à-dire la protéine, est en excès dans la phase continue, ce qui pourrait expliquer la différence observée par rapport à la littérature. En effet, dans les travaux précédents de l'équipe, il a été prouvé qu'à une concentration de 0,8 (m/m)% la β -lg, se trouve déjà en excès dans la phase continue [9]. Par conséquent, étant donné qu'il existe suffisamment d'émulsionnant pour recouvrir toutes les gouttelettes, et que la β -lg est un émulsionnant difficile à désorber, la coalescence des gouttelettes est fortement limitée. Ceci empêcherait l'augmentation du diamètre de gouttelettes suite à l'augmentation de la fraction d'huile

L'augmentation de la fraction huileuse entraîne l'augmentation de la viscosité globale de l'émulsion. Ceci est dû à l'augmentation du nombre d'objet formé qui entraîne l'augmentation de la viscosité de la NE. Par ailleurs, la dispersion d'un nombre plus grand de gouttes augmente la fréquence de contact entre les gouttelettes par collision, ceci favorise donc la formation de gouttelettes plus grosses par re-coalescence [15].

Tableau A.4 : Significativité des facteurs et leur interaction sur les réponses étudiées

Réponse \ Facteur	A	B	C	AB	AC	BC
Viscosité	0,386	3,156	-0,763	2,446	-1,803	0,246
Valeur de p	0,717	0,1606	0,520	0,204	0,269	0,812
Potentiel zéta	1,045	-0,989	1,033	-1,469	-0,322	-0,867
Valeur de p	0,641	0,6573	0,645	0,538	0,877	0,693
Taille des gouttes	8,375	-124,375	-2,125	-15,625	6,625	-0,125
Valeur de p	0,122	0,008***	0,415	0,066*	0,153	0,951
PDI	0,009	0,013	0,039	-0,050	0,008	0,008
Valeur de p	0,675	0,584	0,258	0,207	0,697	0,712

A : Type d'huile ; B : Fraction huileuse ; C : Fraction de β -lg ; AB, AC, BC : interactions entre les différents facteurs ; valeur de p : significativité estimée des facteurs ou leur interaction par test ANOVA ; * : degré de significativité ; si $p > 0,1$: le facteur/interaction n'est pas considéré comme significatif ; si $0,05 \leq p < 0,1$: le facteur/interaction a une significativité faible (*) ; si $0,01 \leq p < 0,05$: le facteur/interaction a une grande significativité (**) ; si $p < 0,01$: le facteur a une très grande significativité (***)

Dans notre cas, étant donné que la protéine est en excès, le phénomène de re-coalescence est limité [19–21]. La collision des gouttes favorise alors le cisaillement entre celles-ci ce qui contribue à la diminution de la taille. Nos résultats sont en accord avec les résultats d'une étude qui s'est intéressée à l'influence du type de tensioactif (anionique, cationique ou non ionique) et les conditions opératoires de l'HHP sur les caractéristiques de la NE H/E, notamment la taille des gouttes. Pour le cas du tensioactif non ionique (Tween 20), l'augmentation de la teneur de la phase huileuse (MCT 55 :44) a conduit à des valeurs de tailles de gouttes plus petites [22]. Notre étude a également révélé que l'interaction entre le facteur « fraction huileuse » et le facteur « type d'huile » a également un effet faible mais significatif ($0,05 \leq p < 0,1$) sur la taille des gouttelettes produites. Il est à noter que bien que le diamètre des gouttelettes soit variable, le potentiel zéta n'a pas été influencé significativement par aucun des facteurs étudiés. La viscosité des NEs semble également indépendante des facteurs étudiés. Par ailleurs, puisqu'elle est en excès quelle que soit la concentration testée [9], la concentration de la β -lg n'a eu aucun effet significatif ni sur la taille des gouttelettes ni sur le PDI.

3.2. Exemple de surfaces d'iso réponse

Les surfaces d'iso réponse est une représentation graphique qui nous permet d'avoir une illustration du domaine dans lequel nous pouvons travailler selon les critères fixés. Il s'agit donc d'une méthode par laquelle nous pouvons fixer les conditions optimales de la formulation de la NE.

Dans notre cas, la taille des gouttelettes est l'unique réponse qui a démontré une variation significative en fonction des facteurs choisis. Pour cette raison, notre choix des conditions optimales a été fait en fonction de cette réponse.

La Figure A.2 représente la variation du diamètre des gouttelettes en fonction du type d'huile utilisée ainsi que de la fraction de β -lg.

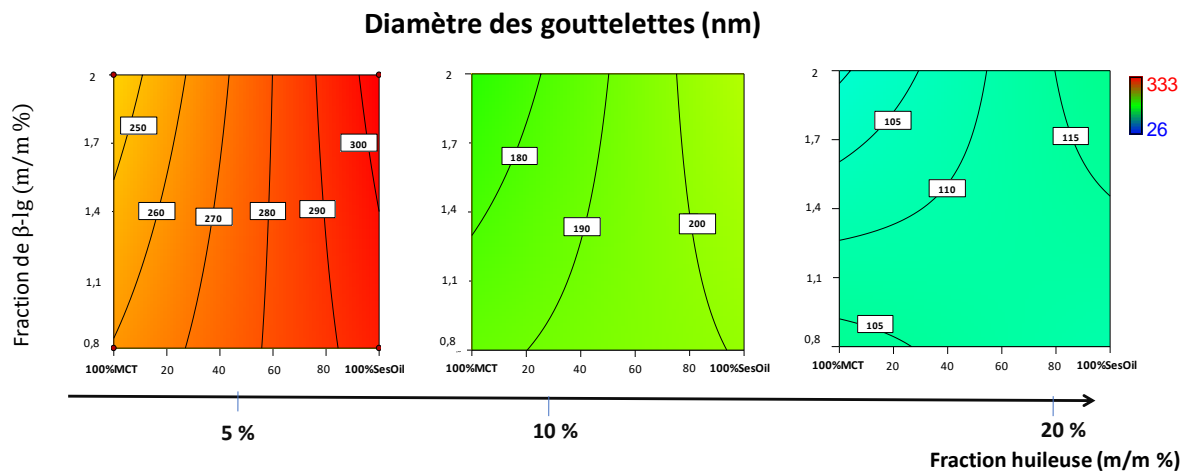


Figure A.2 : Exemple de surfaces d'isoréponse représentant le diamètre des gouttelettes en fonction du type d'huile et la fraction de β -lg

Ces surfaces d'iso réponse montrent que, pour une fraction huileuse de 5 (m/m) %, la taille des gouttelettes a varié plutôt en fonction du type d'huile utilisée. La fraction de la protéine n'a eu pratiquement pas d'effet sur la taille des gouttes. Le diamètre des gouttes a varié de 250 nm à 300 nm et a augmenté avec l'augmentation du rapport (huile de sésame / MCT). Il en découle que pour notre système, la fraction huileuse de 5% n'a pas permis d'obtenir un diamètre de gouttes approprié (< 200 nm).

L'augmentation de la fraction huileuse à 10 % a donné des diamètres de gouttes se situant entre 180 nm et 200 nm. Lorsque l'huile utilisée était MCT pur, la taille des gouttes obtenue dépendait de la fraction de β -lg. En effet, lorsque la fraction de la protéine était supérieure à 1,35 (m/m) %, le diamètre des gouttes était inférieur à 180 nm. Pour une fraction en protéine moins importante, la taille des gouttes obtenue se situait entre 180 nm et 200 nm. Cependant, lorsque l'huile de sésame était utilisée, quelle que soit la fraction de protéine, la taille des gouttelettes dépassait 200 nm. Par conséquent, 10 % de fraction huileuse n'ont pas permis d'obtenir la taille de gouttes appropriée, notamment pour l'huile de sésame.

Enfin, l'augmentation de la fraction huileuse à 20 %, a entraîné la production de tailles de gouttelettes inférieure à 200 nm, quelle que soit la fraction de la protéine et le type d'huile utilisée. Le diamètre de gouttes obtenu variait entre 110 et 115 nm. Dans ces conditions, la fraction huileuse est maximale, ce qui permet d'encapsuler une quantité importante d'extrait dans la NE.

4. Conclusion

Le choix du système s'est appuyé sur le cahier des charges fixé au début de l'étude. Parmi les réponses étudiées, nous avons privilégié le diamètre moyen des nanogouttelettes que nous avons considéré indispensable à l'obtention des caractéristiques désirées de la NE, telle que la stabilité, ainsi que la possibilité d'être capté par les cellules hôtes du parasite. En outre, notre choix a été réalisé en ayant pris en considération que la taille des gouttes pourrait augmenter après l'incorporation de la substance active (l'extrait sélectionné) dans la formulation.

A la suite des essais supplémentaires où nous avons fait varier la pression appliquée de ± 10 MPa, nous avons retenu un système composé de 1,2 (m/m) % β -lg et 20 (m/m) % huile préparé après 4 passages à l'HHP à 120MPa à 40°C. Ce système nous a permis d'obtenir des tailles de gouttes

aux alentours de 50 nm pour une NE à base de MCT et de 25 nm pour une NE à base d'SO. Ces NEs ont présenté des distributions de taille étroites avec un PDI qui n'a pas dépassé 0,2. Les viscosités mesurées étaient faibles (~ 30 mPa.s), ne permettant pas une bonne maniabilité de la NE lors d'une application topique. Pour pallier ce problème, l'ajout d'un agent épaississant a été envisagé.

Références bibliographiques

- [1] N.D. Cekić, S.M. Đorđević, S.R. Savić, S.D. Savić, a Full factorial design in the formulation of Diazepam parenteral nanoemulsions: Physicochemical characterization and stability evaluation, 4 (2015) 69–77.
- [2] J. Goupy, Les Plans D'Experiences, Rev. Modul. 34 (2006) 74–116.
- [3] G.E. Box, K. Wilson, On the experimental attainment of optimum condition, J.R. Stat. Soc. Ser. B. 13 (1951) 1–45.
- [4] M.D. Bhavsar, S.B. Tiwari, M.M. Amiji, Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design, J. Control. Release. 110 (2006) 422–430.
- [5] D.M. Patel, N.M. Patel, V.F. Patel, D.A. Bhatt, Floating granules of ranitidine hydrochloride-gelucire 43/01: Formulation optimization using factorial design, AAPS PharmSciTech. 8 (2007) E25–E31.
- [6] M.C. Gohel, A.F. Amin, Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design, J. Control. Release. 51 (1998) 115–122.
- [7] M. Shah, K. Pathak, Development and Statistical Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Simvastatin by Using 23 Full-Factorial Design, AAPS PharmSciTech. 11 (2010) 489–496.
- [8] M. Solans, C. Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, Nano-emulsions., Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 10 (2005) 102–110.
- [9] A. Ali, Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline, Thèse de doctorat, 2016.
- [10] B. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification., Food Hydrocoll. 22 (2008) 1191–1202.
- [11] J. Li, M., Ma, Y., Cui, Whey-protein-stabilized nanoemulsions as a potential delivery system for water-insoluble curcumin., LWT-Food Sci. Technol. 59 (2014) 49–58.
- [12] Q. Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhong, F., Huang, Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions., Agric. Food Chem. 60 (2012) 7548–7555.
- [13] D.J. McClements, Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, FL., 1999.
- [14] G. Mohan, S., Narsimhan, Coalescence of protein-stabilized emulsions in a highpressure homogenizer., J. Colloid Interface Sci. 192 (1997) 1–15.
- [15] S. Tcholakova, N.D. Denkov, T. Danner, Role of surfactant type and concentration for the mean drop size during emulsification in turbulent flow., Langmuir. 20 (2004) 7444–7458.
- [16] D.J. Wedlock, Controlled Particle, Droplet and Bubble Formation - - Google Livres, Butterwort, British Library Cataloguing in Publication Data, 1994.
- [17] P. Walstra, Principles of emulsion formation., Chem. Eng. Sci. 48 (1993) 333–349.
- [18] C. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, Formation and stability of nano-emulsions., Adv. Colloid Interf. Sci. 108 (2004) 303–318.
- [19] D.J. McClements, Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques., CRC Press, 2015.
- [20] T.F. Tadros, Emulsion Formation, Stability, and Rheology, in: Emuls. Form. Stab., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013: pp. 1–75.
- [21] L.L. Schramm, Dispersion and dispersed species characterization. Emulsions, Foams, and Suspensions. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [22] H.D. Silva, M.A. Cerqueira, A.A. Vicente, Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions, (2015).

Titre : Valorisation des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de Tunisie en tant que nouvelles substances antileishmaniennes.

Mots clés : Activité antileishmanienne, *Artemisia herba-alba*, *Citrus limon*, *Leishmania major*, *Pistacia lentiscus*

Résumé : La valorisation des molécules bioactives issues des plantes médicinales est une stratégie prometteuse dans la recherche de principes actifs pour le traitement de la leishmaniose permettant de s'affranchir des problèmes de toxicité et de résistance provoqués par les traitements conventionnels. Trois plantes ont été choisies à savoir *Artemisia herba-alba*, *Citrus limon* et *Pistacia lentiscus*. Les extraits et les huiles essentielles de ces plantes ont prouvé un potentiel antileishmanien qui dépendait aussi bien de la nature de l'extrait (technique d'extraction et/ou la région de récolte de la plante) que de le stade du parasite. En raison de l'originalité des résultats, nous avons sélectionné l'extrait acétone du *Citrus limon* (Cext) pour être encapsulé une nanoémulsion (NE) stabilisée par la β -lactoglobuline (β -lg) et composée de 80 % de phase aqueuse (solution de β -lg à 1,2 (m/m) %) et de 20 % de phase huileuse (huile de sésame (SO) ou Medium Chain Triglycerides (MCT)).

L'encapsulation de Cext à une concentration de 0,1 (m/m) % a permis d'avoir la meilleure activité vis-à-vis des amastigotes intramacrophagiques, une cytotoxicité moindre. L'encapsulation n'a pas interféré dans la stabilité des NEs au cours du temps. Ainsi, la NE à base de MCT (Cext NE MCT) a montré une cytotoxicité minimale (Indice de Sélectivité = $21,4 \pm 6,1$). Malgré sa toxicité, la NE à base d'SO (Cext NE SO) a été également sélectionnée pour les propriétés cicatrisantes décrites pour l'SO. Enfin, l'évaluation de l'efficacité antileishmanienne *in vivo* a été réalisée par application

topique des NEs sur des lésions de leishmaniose cutanée à *L. major* chez des souris BALB/c. Les résultats ont prouvé que l'efficacité antileishmanienne des formulations dépendait significativement du type d'huile utilisée. Cext NE MCT a démontré la meilleure efficacité révélée par une diminution significative de la charge parasitaire, une stabilisation de la taille de la lésion, ainsi qu'une diminution de l'inflammation de la peau des souris. Il a été également prouvé que la formulation choisie contribuait à l'efficacité antileishmanienne par un effet additif. En outre, l'encapsulation a permis de pallier les problèmes de toxicité observés lors de l'application topique de l'extrait dans l'huile. D'autre part, l'application de Cext NE SO a engendré une toxicité neurologique et aucune efficacité antiparasitaire. Cependant, Cext SO administré directement sur les lésions a révélé une bonne efficacité du traitement, aussi bien par la diminution de la taille des lésions, la réduction de la charge parasitaire et la diminution de l'inflammation chez les souris traitées. L'efficacité de cette formulation pourrait être expliquée par une amélioration de la pénétration de l'extrait à travers la peau en raison de la présence dans l'huile de sésame d'acides gras mono et polyinsaturés, tels que les acides oléique et linoléique. Cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel des formulations lipidiques dans le traitement local des lésions de Leishmaniose cutanée.

Title: Valorization of extracts from Tunisian plants as new antileishmanial substances.

Keywords: Antileishmanial activity, *Artemisia herba-alba*, *Citrus limon*, *Leishmania major*, *Pistacia lentiscus*

Abstract: The valorization of bioactive molecules extracted from medicinal plants is a promising strategy in the search of active pharmaceutical ingredients for the treatment of leishmaniasis while overcoming problems of toxicity and resistance caused by conventional treatments.

Three plant species were chosen namely *Artemisia herba-alba*, *Citrus limon* and *Pistacia lentiscus*. Extracts and essential oils from these plants showed significant antileishmanial potential. The activity depended both on the extract nature (extraction technique and / or the plant harvesting region) and on the parasite lifestage. For a matter of originality, *Citrus limon* acetone extract (Cext) was selected and encapsulated in a nanoemulsion (NE) stabilized by β -lactoglobulin (β -lg). This NE was composed of 80 % of aqueous phase (β -lg solution at 1.2 wt%) and 20 % oily phase (sesame oil (SO) or Medium Chain Triglycerides (MCT)). Cext encapsulation at concentrations of 0.1 wt% allowed the best activity toward intramacrophage amastigotes, the least cytotoxicity. Encapsulation did not interfere with NEs stability over time. Thus, MCT-based NE containing 0.1 % extract (Cext NE MCT) showed minimal cytotoxicity (Selectivity Index = 21.4 ± 6.1). Despite its toxicity, SO-based NE (Cext NE SO) was also selected for the healing properties described for SO.

Finally, the antileishmanial efficacy evaluation *in vivo* was carried out by topical application of NEs on cutaneous leishmaniasis lesions due to *L. major* in BALB/c mice. Results showed that the antileishmanial activity of the formulations depended significantly on the oil type. Cext NE MCT demonstrated the best efficacy revealed by a significant decrease in parasite load, stabilization of the lesion size, as well as a decrease in the skin inflammation. It was also demonstrated that the chosen formulation contributes to antileishmanial efficacy through an additive effect. In addition, the extract encapsulation allowed to overcome toxicity observed with topical application of the extract diluted in MCT. On the other hand, the application of Cext NE SO produced neurological toxicity and no antiparasitic efficacy. However, Cext SO administered topically showed high treatment efficacy, by reducing the lesions size, the skin parasite load and the skin inflammation. The antiparasitic efficacy of this formulation could be explained by penetration enhancement of the extract through the skin due to the presence in sesame oil of mono and polyunsaturated fatty acids, such as oleic and linoleic acids. This study revealed the potential of lipid formulations potential as a local treatment of cutaneous leishmaniasis lesions.