

SCREENING PHYTOCHIMIQUE, ESSAIS *IN VITRO* DE CYTOTOXICITE, ET ANTILEISHMANIEN DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FEUILLES 'EE-F' DE *CESTRUM PARQUI* L'HERIT.

NAKKAB Selma^{1*}, TAIL Ghania¹, KARA Fatma .Zohra¹, MALLEM Hamida², CHADER Henni³, EDDAIKRA Naouel⁴ et SAIDI Fairouz¹

1. Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Faculté des Sciences Nature et Vie, Université de Blida 1, Algérie.
2. Laboratoire de recherche en Biotechnologie des Productions Végétales, Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences Nature et Vie, Université de Blida 1, Algérie.
3. Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques ; Centre collaborateur de l'OMS, Algérie.
4. Service Eco-Epidémiologie parasitaire, Institut Pasteur d'Algérie.

Reçu le 09/11/2017, Révisé le 29/12/2017, Accepté le 31/12/2017

Résumé

Description du sujet : La phytothérapie des leishmanioses dans les pays endémiques joue un rôle primordiale de lutte, et inspire les gens de créer une biothérapie, conforme et moins couteuse.

Objectifs : Notre travail vise à mettre en évidence les différents composés actifs de l'EE.F', et évaluer *in vitro* son effet cytotoxique, et anileishmanien.

Méthodes : L'identification chimique été réalisée par le screening phytochimique, les tests *in vitro* sont réalisées par deux méthodes : le test de l'inclusion par le bleu de TRYPAN à 0.4 %, et la méthode de réduction des sels de tétrazolium 'Test de MTT'.

Résultats : Le criblage chimique nous a montré une très forte richesse en saponines et alcaloïdes, les CC50 de l'EE-F sur les *Thp1* étaient plus que 800 ug/ml par les deux méthodes, les IC50 sur *L. major* et *L. infantum* été inférieurs à 100 u/ml par les deux méthodes.

Conclusion. Les résultats présentés montrent que les feuilles de *C.parqui* sont riches en composés actifs, dont l'EE-F été leishmanicide sur les deux souches et très faiblement cytotoxique sur les *Thp1*.

Mots clés: *Cestrum parqui* ; EE-F ; Screening phytochimique ; Essai de cytotoxicité ; *Thp1* ; Activité antileishmanienne ; Bleu de TRYPAN ; MTT.

PHYTOCHIMIC SCREENING, CYTOTOXICITY AND ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* TESTS OF ETHANOLIC EXTRACT OF LEAVES 'EE-F' OF *CESTRUM PARQUI* HERIT.

Abstract

Description of the subject: The herbal medicine of leishmaniasis in endemic countries plays a key role in the fight, and inspires people to create a biotherapy, consistent and less expensive.

Objectives: Our work aims to highlight the different major active compounds of the ethanolic extract of leaf of *C.parqui* 'EE.F', and to evaluate *in vitro* its cytotoxic and anileishmanial effect.

Methods: The chemical identification was carried out by the phytochemical screening. These biological activities are carried out *in vitro* by two methods: the TRYPAN blue at 0.4% inclusion test, and the tetrazolium salt reduction method 'MTT test'.

Results: The chemical screening showed a very high richness in saponins and alkaloids, the CC50 of EE-F on *Thp1* were more than 800 ug / ml by both methods, the IC50 on *L. major* and *L. infantum* were lower at 100 ug / ml by both methods..

Conclusion: The results presented show that *C.parqui* leaves are rich in active compounds, of which EE-F was leishmanicide on both strains and non-cytotoxic on *Thp1*.

Key words: *Cestrum parqui*; EE-F; Phytochemical screening; Cytotoxicity assay; Human cell line *Thp1*; Antileishmanian activity; TRYPAN Blue; MTT.

*Auteur correspondant : NAKKAB Selma, Email : nakkabselma@gmail.com.

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre de *Leishmania* [1]. Ces protozoaires apparaissent sous deux stades morphologiques au cours de leurs cycles de développement: la forme amastigote immobile et intracellulaire, et la forme promastigote flagellée libre et mobile [2, 3]. La leishmaniose est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé 'OMS', comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde [4].

La maladie est très variée cliniquement ; elle se manifeste sous forme des infections cutanées ou muco-cutanées, ou d'une maladie diffuse incontrôlable et fatale, lorsqu'elles évoluent sous forme viscérale [5,6,7]. La leishmaniose constitue en Algérie un réel problème de santé publique [8]. D'après [9,10, 11 et 12]; deux formes de leishmanioses sévissent en Algérie, la leishmaniose cutanée (LC), et la leishmaniose viscérale (LV). L'augmentation des cas de LC en Algérie dès l'année 2001 a atteint son maximum avec un pic au cours de l'année 2005 (avec 78 /100 000 habitants), Durant les six années qui suivent le taux d'incidence a baissé nettement en 2007 pour encore augmenté jusqu'au l'an 2010 avec une hausse très importante du taux d'incidence (58,93 cas pour 100 000 habitants) [13].

Dans la majorité des cas, les différentes formes de leishmanioses sont traitées à l'aide des dérivés de l'antimoine [14, 15, 10]. Depuis l'accroissement des cas de coïnfection de la leishmaniose viscérale/sida et l'apparition des résistances aux antimonies ; le paromomycine, la miltofosine, et l'amphotéricine B, surtout sous sa forme liposomale, ont tendance à leur disputer cette place [16, 10]; mais les principaux problèmes liés à ces traitements sont le coût, la longue période, et les effets secondaires indésirables [17, 18, 19, 10 et 20]; Dans ces conditions, la progression de la maladie et l'apparition de pharmacorésistance font augmenter la morbidité et la mortalité ; La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère par conséquent nécessaire [21, 22].

La médecine traditionnelle joue un rôle significatif dans le processus de découverte de nouvelles thérapeutiques, et elle est très populaire dans les zones où les leishmanioses sont endémiques [23, 24].

Les plantes offrent une source de molécules actives contre plusieurs protozoaires responsables de différentes maladies [25, 26, 21, 27 et 28]. La recherche de molécules bioactives ou de métabolites secondaires commence par le screening d'extraits bruts de plantes, suivi d'un fractionnement aboutissant à l'isolation et l'identification des molécules responsables de l'activité [29, 30, 31].

Le *Cestrum vert* (*Cestrum parqui* l'Hérit., *Solanaceae*) est très répandu en Algérie [32], cette plante est un arbuste de 2 à 3 mètres de longueur avec des feuilles vertes brillantes regroupées en terminal de 80 à 100 millimètres de longueur et de 20 à 30 mm de largeur, à forme pointue à chaque extrémité, avec un feuillage qui dure toute l'année [33, 34, 35 et 36]. Le parqui est une plante multidisciplinaire ; utilisée comme herbe ornementale, médicinale, et nutritionnelle [37, 38 et 32]. Traditionnellement, les différentes parties de *C. parqui*, principalement les feuilles, les fleurs et le bois, sont couramment utilisées soit fraîches, soit comme infusion, décoction, jus, ou cataplasme [39, 40, 41, et 42], principalement contre les infections fongiques [43, 44 et 45], contre les infections bactériennes et virales [39, 40 et 41], comme antiparasitaires [46], et contre l'inflammation [47, 48 et 49]. Sur ce papier nous présenterons notre étude expérimentale lors de laquelle nous avons étudié la composition chimique, l'effet cytotoxique sur les *Thp1*, et l'effet antipromastigote de l'extrait éthanolique de feuilles du *Cestrum parqui* sur deux espèces les plus endémiques en Algérie ; *Leishmania infantum* et *Leishmania major* [50, 51].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Les feuilles de *C. parqui* ont été récoltées dans la région d'Alger à Belouizdad en Avril 2014. Leur identification a été réalisée au jardin d'essais El Hamma-Alger, au département d'agronomie de l'Université de Blida 1, et à l'École National Supérieur d'Agronomie (ENSA) El Harrache -Alger ; où est conservé un échantillon. Les feuilles récoltées ont été bien rincées par l'eau distillée stérile, et séchées pendant 20 jours à température ambiante du laboratoire et à l'abri de la lumière ; après le séchage, les feuilles sont bien réduites en poudre.

1.2. Matériel biologique

1.2.1. Lignée monocyttaire humaine ; *Thp1*

Les *Thp1* sont incubées dans le RPMI1640 à l'étuve de 37°C avec 5% de CO₂ dans des flacons à 25 cm², additionné de 10 % de sérum de vœu fœtal inactivé (SVF), de 100 UI/ml de Pénicilline, et de 100 µg/ml de Streptomycine. Après 48 heures, les suspensions cellulaires sont retirées et centrifugées à 20°C±2 pour 10 min/2000trs, les culots sont ajustés à 5.10⁵ C/ml. 20 µl de la solution enzymatique PMA/RNA later (Phorbol Mérystate Acétate) est rajoutée pour chaque 20ml de solution ajustée. Chaque 100 µl de cette suspension sont déposés dans des puits d'une microplaque à fond plats de 96 puits, et incubées dans les mêmes conditions.

1.2.2. Parasites

Les formes promastigotes de *Leishmania major* (LIPA 100/09), et *Leishmania infantum* (LIPA 15/05) sont fournies par le service d'éco-épidémiologie parasitaire, Institut Pasteur d'Algérie, et maintenues pour 05 jours à 25°C± 2 sur le milieu Novy, MacNeal, and Nicolle (NNN) additionné de 100 UL/ml de Pénicilline et 100µg/ml de Streptomycine, après l'incubation ; 200 ul de chaque culture est repiquée dans 2 ml de RPMI1640 additionné de 10% de SVF, de 100UI/ml Pénicilline, et de 100 ug/ml Streptomycine, et incubées encore une fois pendant 96 heures à 25°C±2, un deuxième passage des deux souches dans le RPMI1640 est réalisé dans les mêmes conditions ; les cultures sont retirés de l'étuve, et centrifugées en raison de 2500t/10min à 22°C±2 ; le culot de chaque souche est récupéré, additionné de 2 ml de RPMI1640, compté sur cellule de THOMA, et ajusté à 10⁶ parasite/ml.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait éthanolique de feuilles de *C.parqui* EE-F

L'extrait est préparé par l'extraction solide-liquide par (ESL) la méthode de Soxhlet [52], cette technique permet le traitement de poudre de feuilles avec l'éthanol absolu (300ml) en phase liquide ou partiellement vaporisés ;

l'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair, le solvant est retiré à la fin de l'extraction est évaporé à 45 C° par un rotavapeur, le résidu obtenu nommé EE-F est pesé, et conservé à 4°C ± 2 pour les tests phytochimiques et biologiques.

2.2. Screening phytochimique de l'EE-F de *C.parqui*

2.2.1. Recherche des alcaloïdes aglycones

25 ml de l'EE-F sont évaporé à sec, le résidu est repris avec 5 ml de HCL 2N, le mélange est mis au bain marie à 45°C. Quelques gouttes de réactif de MAYER sont rajoutées au filtrat ; la formation d'un précipité blanc confirme la positivité de la réaction [53, 54,55].

2.2.2. Recherche des anthocyanes

5 ml de l'EE-F à 10% sont mélangés avec 15 ml de H₂SO₄ à 10%, et par la suite par 5 ml de NH₄OH dilué au demi. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique ; la présence des anthocyanes est confirmée [54,55].

2.2.3. Recherche des composés réducteurs

1 ml de l'EE-F est dilué par 2 ml d'eau distillée stérile, 20 gouttes de liqueur de Fehling sont rajouté, le mélange est chauffé à 50°C. La formation d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs [55].

2.2.4. Recherche des coumarines

Au résidu sec de l'EE-F, 2 ml d'eau distillée chaude ont été ajoutés. Après refroidissement, 0,5 ml d'ammoniaque ont été ajoutés. L'apparition d'une fluorescence intense bleu verdâtre ou violette sous la lumière UV ($\lambda = 254$ nm et $\lambda = 366$ nm) indique la présence de coumarines [53].

2.2.5. Recherche des flavonoïdes (Réaction à cyanidine)

2 ml de l'EE-F à 10% sont mélangés avec 5 ml de l'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°+ eau distillée + acide chlorhydrique concentré (V/V/V : 5ml)), quelques copeaux de Magnésium et 1 ml de l'alcool isoamylique sont rajoutés après au mélange. Le virage de couleur au rose orangé, ou rose violacé, ou rouge indique la présence des flavones, ou flavonones, ou flavonol respectivement [53,54, 55].

2.2.6. Recherche d'huiles volatiles et acides gras

10 ml de l'EE-F sont évaporées à sec, le résidu est dissout dans 3 ml de l'éthanol, la solution alcoolique est concentrée à sec ; la présence d'un résidu arôme confirme la positivité de la réaction. Le résidu restant est repris dans 3 ml de l'éther diéthylique et 10 ml de KOH 2N, la phase étherique est évaporée à sec, la présence d'un résidu gras indique la présence des acides gras [55].

2.2.7. Recherche des composés cyanogénétiques

Un gramme de l'EE-F est mélangé avec 5 ml de toluène dilué (V/V), un papier picrosodé est imbibé de réactif de Guignard (2 g d'acide picrique et 20 g de carbonate de sodium dans 200ml d'eau distillée) ; une réaction positive se traduit par le virage de couleur au rouge après 24 heures [53,55].

2.2.8. Recherche de mucilage

1 ml de l'EE-F à 10 % sont mélangés avec 5 ml de l'éthanol absolu, le mélange est bien agité pour 10 à 15 mn ; la formation d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage [53,55].

2.2.9. Recherche des polyphénols

Une goutte de chlorure ferrique à 2% est rajoutée à 2 ml de l'EE-F ; une coloration bleu noirâtre ou verte plus au moins foncé confirme la présence des polyphénols [53, 54].

2.2.10. Recherche des quinones

2 ml de l'EE-F à 10% sont évaporés à sec, le résidu obtenu est trituré dans 5 ml de HCL au 1/5, le mélange est laissé dans le bain marie à 50° pendant 30mn ; les contenus des tubes sont refroidis et mélangés avec 20 ml de chloroforme et 0.5 ml de l'ammoniaque dilué 2 fois. Une coloration rouge positive le résultat [53,56].

2.2.11. Recherche des saponines

Quelque goutte d'acétate de plombe est rajoutée aux 2 ml de l'EE-F. Un précipité blanc au fond du tube indique la présence des saponines [56,57].

2.2.12. Recherche des stérols et les terpènes

5 ml de l'EE-F est mélangé avec 1 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont laissés pendant 30 mn à 21°C. L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive : Couleur vert bleu : présence des hétérosides stéroïdiques, couleur violet : présence des hétérosides triterpéniques [53, 54, 58].

2.2.13. Recherche des tanins

30 ml de l'EE-F à 5% sont mélangés avec 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol 30% et 5 ml de HCL), le tube est chauffé au bain marie à 80°C/15 à 30mn ; la formation d'un précipité rouge indique la présence des tanins cathéchiques. La préparation est ensuite filtrée et saturée par l'acétate de sodium pulvérisé et 1 ml de FeCl₃ à 1% ; la couleur bleu noirâtre indique la présence des tanins galliques [53,58, 59].

2.3. Test de cytotoxicité in vitro de l'EE-F de *C.parqui* sur les monocytes humains THP1

Après les 48 heures d'incubation des microplaques contenant les monocytes *Thp1*, les suspensions de chaque puits sont jetées,

et lavées par 100 µl de RPMI1640. 100ul de chaque concentration (12.5, 25, 50, et 100 µg/ml à 0,5% de diméthylsulfoxyde) de l'EE-F sont ensuite déposés sur les puits contenant les *Thp1* en raison de quatre répétitions pour chaque concentration.

Des études préliminaires de l'effet de DMSO à 0,5% sur la prolifération normale des *Thp1* sont réalisées dans les mêmes conditions (test de contrôle). Les microplaques sont incubées encore une fois à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48h. Après l'incubation les puits sont lavés par 100 µl de solution tamponnée (PBS). Pour le test de l'inclusion par le bleu de TRYPAN à 0,4%: 50 µl du colorant est rajouté au puits pour 05 min. Les puits après sont lavés deux fois par 100 µl de PBS, les microplaques sont observées sous microscope inversé (20×0,4); dont les cellules vivantes et mortes sont comptées par le logiciel ImageJ 1.38e. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule suivante [60] :

$$[(\text{Nbr de CV}_C - \text{Nbr CV}_E / \text{Nbr CV}_C) \times 100$$

Nbr : Nombre, CV : Cellules vivantes, CV_E : Cellules avec extrait, CV_C : cellules contrôles

Pour la méthode de réduction des sels de Tétrazolium (MTT) : 10mg/ml de MTT sont rajoutés à chaque puits; les microplaques sont bien agitées et incubées par la suite pendant 4 heures à 37°C et 5% de CO₂. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 100 µl d'isopropanol (0,4N HCl) à 20% de sulfate dodécyl de sodium. Une lecture par un lecteur des microplaques à 550 nm des densités optiques de tous les puits est réalisée après 30 mn d'incubation. Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la formule suivante [61]:

$$[(\text{DO}_T - \text{DO}_E) / \text{DO}_T] \times 100$$

DOT : densité optique du contrôle, DOE : densité optique des cellules+ extrait.

2.4. *Activité antileishmanienne in vitro de l'EE-F sur L. major et L. infantum*

Dans des microplaques à 96 puits à fond plats ; 10 µl de chaque concentrations de l'EE-F (12.5, 25, 50, et 100 µg/ml à 0,5% de DMSO) sont mis en contact avec 90µl de suspension parasitaire de chaque souche de leishmanie (10⁶ parasites/ml) en raison de quatre répétitions pour chaque concentration, les microplaques sont bien agitées, et incubées à 25°C±2 pour 72 h.

Les deux souches parasites seules dans le RPMI1640 à 0.5% de DMSO (test de contrôle) et ceux avec les différentes concentrations de témoin positif ; l'antimoine trivalent SBIII (100, 50, 25, et 12.5 µg/ml) (test de référence) sont incubés dans les mêmes conditions. Après 72 heures ; les microplaques sont retirées de l'étuve.

Pour le test de l'inclusion au bleu de TRYPAN à 0,4% : 10 µl de chaque puits est mélangé avec 10 µl de formol à 10% et 10 µl de bleu de TYPAN ; les cellules sont comptées sur cellule de THOMA (×40), et le pourcentage de viabilité des parasites est calculé par rapport au témoin négatif selon la formule suivante [62, 63] :

$$\% \text{ De viabilité} = (\text{MCP}_E / \text{MCP}_T) \times 100.$$

MCP_E : Moyenne de charge parasitaire+ extrait, T : Témoin négatif.

Pour la méthode de réduction de sels de Tétrazolium (MTT) : Juste après la fin d'incubation ; 10mg/ml de MTT sont rajoutés à chaque puits, les microplaques sont incubées à 37°C et de 5% de CO₂ pour 04 heures, 100 ul de l'isopropanol (0,4N HCl) sont rajouté par la suite à chaque puits et laissés agir pendant min à 37°C et à 5% de CO₂, la densité optique de chaque puits est mesurée à 550 nm. Les pourcentages d'inhibition sont calculées à partir de cette formule selon [64, 65] :

$$[(\text{DO}_T - \text{DO}_E) / \text{DO}_T] \times 100$$

DO_T : Densité optique du contrôle, DO_E : Densité optique des cellules+ extrait.

3. *Étude statistiques*

Le test d'ANOVA a été réalisé par le logiciel MINITAB17, pour déterminer les différences significatives (P<0.05), la comparaison multiple a été appliquée entre les moyennes par recours au test de Fisher, avec un intervalle de confiance de 95%.

RÉSULTATS

1. *Rendement de l'extraction et le screening phytochimique de l'EE-F de C.parqui*

L'extraction éthanolique (ESL) de feuilles de *C.parqui* a donné un rendement important de 16.29 %; dont la différence est très significative (p<0,05) (Tableau 1).

Tableau 1 : Rendement de l'extraction solide-liquide de l'extrait éthanolique de feuilles de *C.parqui* 'EE-F'.

ESL* <i>P=0.009</i>	M (%)	IC 95%
EE-F	16,29 ± 3,41	(12,08; 20,49)

ESL : Extraction solide-liquide,* : Trois répétitions, M : Moyenne, IC : Intervalle de confiance.

Les différents tests phytochimiques effectués dans le cadre de cette étude nous ont permis de démontrer qu'il n'y avait pas d'anthocyanes, des composés réducteurs, des coumarines, des huiles volatils, acides gras, des hétérosides cyanogéniques, des quinones, et des stérols, dans les feuilles de *C.parqui*, par contre des traces ont été observées en ce qui concerne les flavonoïdes. Les tests concernant les alcaloïdes, les saponines, le mucilage, les polyphénols, les terpènes, et les tanins ont été fortement positifs (Tableau 2).

Tableau 2 : Screening phytochimique de l'EE-F de *C.parqui*.

Composés phytochimiques recherchés dans EE-F*													
ALC	ANT	CR	COU	FLA	HV/AG	HC	MUC	PPH	QUIN	SAP	STR	TRP	Ta CG
+++	-	-	-	+	-	-	+	++	-	+++	-	+	++

ALC : Alcaloïdes, ANT : Anthocyanes, CR : Composés réducteurs, COU : Coumarines, FLA : Flavones, HV/AG : Huiles volatiles et acides gras, HC : Hétéroside cyanogénique, MUC : Mucilage, PPH : Polyphénols, QUIN : Quinones, SAP : Saponines, STR : Stérols, TRP : Terpènes, TA CG : Tanins cathéchiques et galiques. * : Trois répétitions pour chaque test.

2. Activité antileishmanienne in vitro de l'EE-F de feuilles de *C.parqui* sur *L. major* et *L. infantum*

2.1. Test de contrôle ; effet de DMSO à 0.5% sur la croissance cellulaire des THP1, *L. major*, et *L. infantum*

Le tableau 3 représente l'effet de DMSO à 0.5 % sur la prolifération de la lignée cellulaire humaine *Thp1* avec les deux méthodes; l'ajout de 0.5% de DMSO au milieu de croissance (RPMI1640) avec les cellules n'a induit aucune différence significative ($p=0.958$, et test de Fisher) de la croissance cellulaire en comparant avec le lot des *Thp1* seules par la méthode de coloration par le bleu de TRYPAN, par contre on a remarqué une petite inhibition inférieure à 1% de la croissance cellulaire des *Thp1* par rapport au lot du contrôle par la méthode de MTT ($p=0.000$, et test de Fisher).

Les mêmes résultats sont montrés concernant l'effet de DMSO à 0.5% sur la croissance de *L. major* et *L. infantum* ;

aucune différence significative de l'effet de DMSO sur la croissance parasitaire entre les lots du contrôle des cellules seules, et les lots additionnés du DMSO par la méthode de coloration par le bleu de TRYPAN ($p=0,562$ pour *L.major*, et $p=0,958$ pour *L. infantum* (Tableau 04 et 05), par contre par la méthode colorimétrique du MTT ; la 0.5 % du DMSO a pu inhiber presque 0.9% de la croissance parasitaire des deux souches ; malgré que ce pourcentage d'inhibition est très faible (<1%) mais la différence est significative par rapport aux lots du contrôles (parasites seules) avec $p=0.000$ pour *L. major*, et $p=0.009$ pour *L. infantum* (Tableau 4 et 5).

On s'est repéré par le lot des cellules avec le DMSO 0.5% comme témoin négatif ; puisque le DMSO à 0.5% est présent avec ou sans l'EE-F dans tous les puits testés dans ce travail ; dont le faible effet du DMSO à 0.5% et l'apoptose cellulaire spontanée des cellules (nombre des cellules mortes dans le lot des cellules seules sans DMSO) étaient négligés afin de montrer l'effet réel de l'extrait dans les deux activités biologiques et de se rapprocher de plus en plus des concentrations efficaces de l'EE-F.

Tableau 3 : Effet de DMSO à 0.5% sur la croissance des *Thp1*

Lots	Bleu de Trypan* $p=0,065$		MTT* $p=0,000$	
	% Cytotoxicité**	IC 95%	% Cytotoxicité**	IC 95%
<i>Thp1</i>	00 ^a	(-0,328012; 0,328012)	00 ^b	(-0,092773; 0,092773)
<i>Thp1</i> +DMSO 0.5%	0,42 ^a ± 0,37	(0,099; 0,756)	0,66 ^a ± 0,10	(0,5722; 0,7578)

* : Quatre répétitions pour chaque essai, ** : Comparaison des moyennes par le test de regroupement de Fisher, IC : Intervalle de confiance.

Tableau 4 : Effet de DMSO à 0.5% sur la croissance des *L.major*

Lots	Bleu de Trypan* $p=0.562$		MTT* $p=0.000$	
	% Vitalité**	IC 95%	% Inhibition**	IC 95%
<i>L.major</i>	100,0 ^a ± 0,0	(97,7; 102,3)	00 ^b	(-0,164201; 0,164201)
<i>L.major</i> + DMSO 0.5%	99,27 ^a ± 2,00	(97,00; 101,54)	0,89 ^a ± 0,18	(0,7283; 1,0567)

Tableau 5 : Effet de DMSO à 0.5% sur la croissance des *L. infantum*

Lots	Bleu de Trypan* $p=0.958$		MTT* $p=0.009$	
	% Vitalité**	IC 95%	% Inhibition**	IC 95%
<i>L.infantum</i>	100,0 ^a ± 0,0	(97,3; 102,7)	00 ^b	(-0,391570; 0,391570)
<i>L.infantum</i> + DMSO 0.5%	99,92 ^a ± 2,39	(97,22; 102,63)	0,87 ^a ± 0,45	(0,478; 1,262)

: Quatre répétitions pour chaque essai, **: Comparaison des moyennes par le test de regroupement de Fisher, IC : Intervalle de confiance.

2.2. Effet cytotoxique in vitro de l'EE-F sur la lignée cellulaire monocyttaire THP1

D'après les deux graphes ci-dessous (Fig. 1 : A et B) on remarque qu'il y a une relation dose-réponse entre les concentrations de l'EE-F (ug/ml) et le pourcentage de cytotoxicité sur les *Thp1* par les deux méthodes avec une différence significative de la réponse à chaque augmentation de la concentration de l'extrait ($p=0,000$, test de Fisher),

le test de cytotoxicité sur les *Thp1* que nous avons effectué a permis de démontrer que l'effet cytotoxique de l'extrait éthanolique était moins important par la méthode du MTT que la méthode de coloration ; concluant que la CC50 (Concentration de cytotoxicité à 50% des *Thp1*) de l'EE-F et un peu plus élevée que celle du Bleu de TRYPAN. Les CC50 de l'EE-F obtenues par les deux méthodes (Tableau 06) assure et valide la reproductibilité du test de cytotoxicité sachant que les tests ont été faites en quatre répétitions.

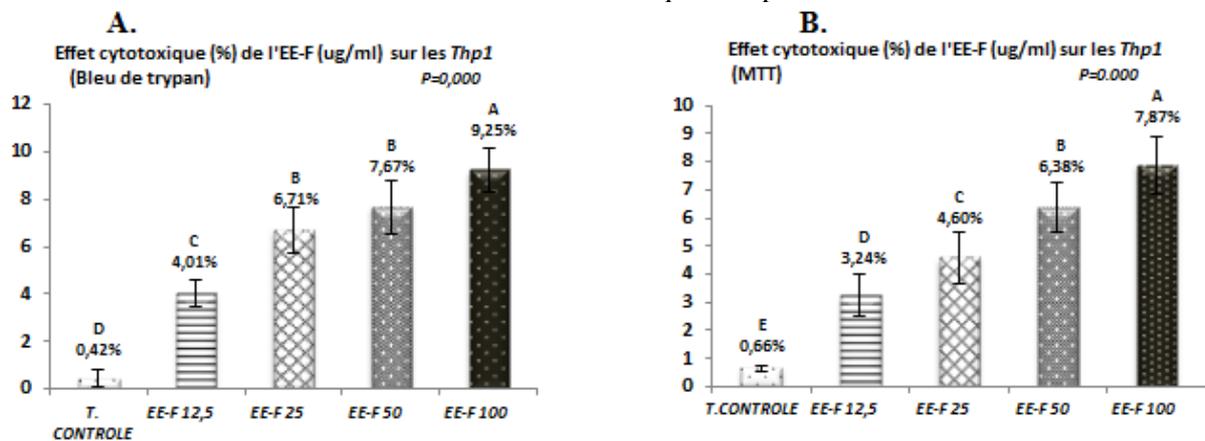


Figure 01 : Effet cytotoxique de l'EE-F de *C. parqui* sur les *Thp1*. EE-F : Extrait éthanolique de feuilles de *C. parqui*, T.CONTROLE : *Thp1*+DMSO 0.5%, A, B, C, D, E : Comparaison des moyennes par le test de Fisher.

Tableau 6 : Concentrations de cytotoxicité de l'EE-F sur les *Thp1*

CC50 (ug/ml) de l'EE-F sur les <i>Thp1</i>	
Bleu de TRYPAN	MTT $p=0.039$
$p=0.096$	
885.69	929.47

CC50 : Concentration qui inhibe 50% de la croissance cellulaire des *Thp1*.

2.3. Activité antileishmanienne de l'EE-F de feuilles de *C. parqui* sur *L. major* et *L. infantum*

Les deux méthodes réalisées dans ce travail ont une expression des résultats inversée ; la coloration des parasites par le test de l'inclusion par le bleu de TRYPAN donne un pourcentage de vitalité des parasites (cellules vivantes incolores comptées),

par contre celle du MTT nous donne le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire (taux de Formazan formé par les cellules vivantes) ; ceci explique la croissance et la décroissance des courbes affichées ci-dessus : les représentations graphiques A et C (Fig. 02) nous montre une diminution de pourcentage de vitalités des deux souches parasitaires à chaque augmentation des concentration de l'EE-F, et de SBIII par la méthode de bleu de TRYPAN ; dont les effets de deux produits répondent d'une façon très significative ($p=0,000$) avec une relation dose-réponse dépendante entre les différentes concentration testées (Test de Fisher).

Concernant la méthode colorimétrique du MTT (Fig. 2 : B et D) : Encore une fois ;

les résultats sont presque les mêmes que ceux de bleu de TRYPAN ; le SFIII se s'est montré fortement actif vis-à-vis des formes promastigotes de *Leishmania* de deux souches avec un pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire de 90.69% et de 96.68% pour *L. major* et *L. infantum* respectivement , néanmoins l'extrait éthanolique de feuilles a montré une bonne activité antileishmanienne avec des concentration à 50 % d'inhibition presque identiques à celles de la première méthode (42.20 ug/ml pour *L. major* et 36.26 ug/ml pour *L. infantum*) (Tableau 7). La compatibilité des résultats des deux méthodes confirme la reproductivité des effets antileishmaniennes de l'EE-F sur les deux souches.

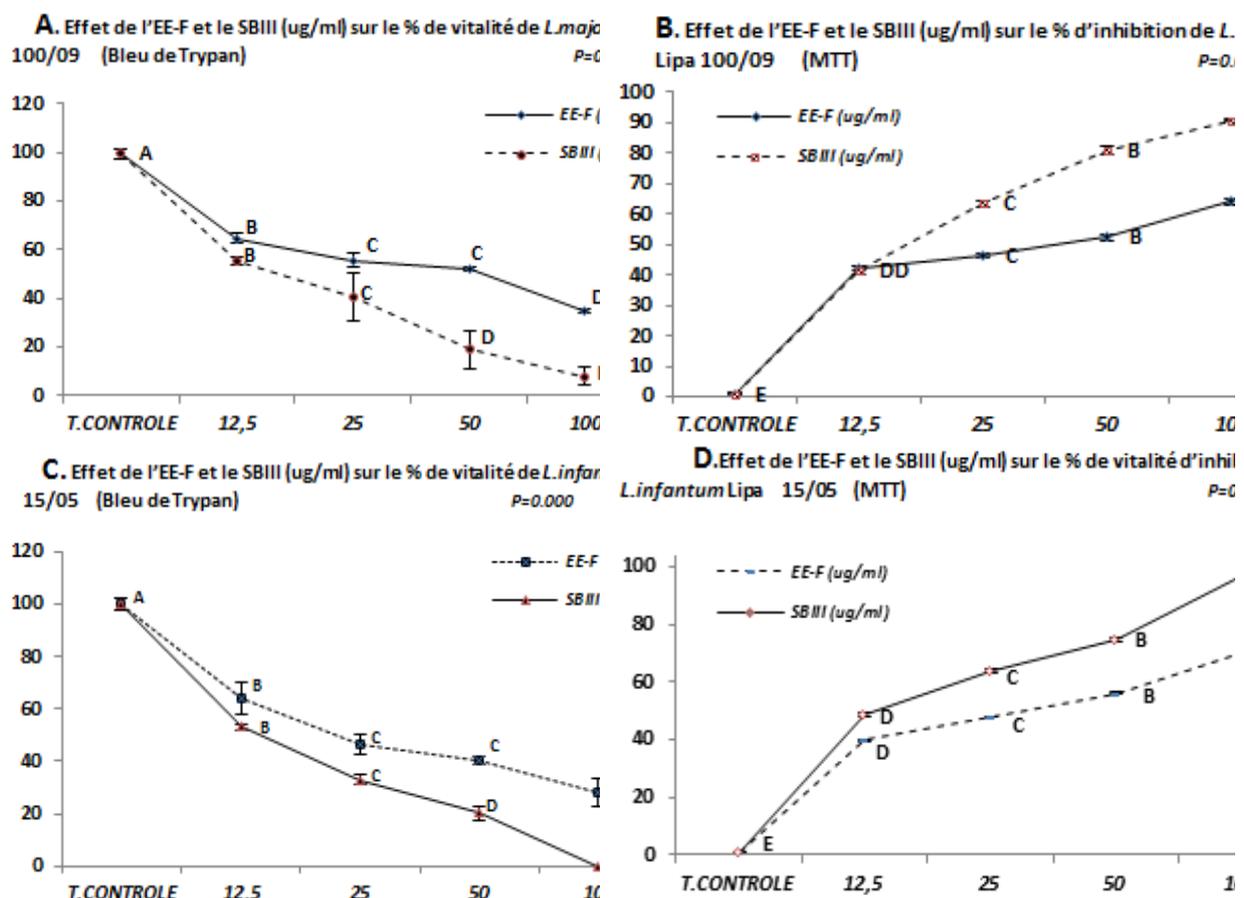


Figure 2 : Effet antileishmanien de l'EE-F et le SBIII par la méthode de Bleu de Trypan et MTT.

Fig. A, et B : *L. major*. Fig. C, et D : *L. infantum*. EE-F : Extrait éthanolique de feuilles de *C. parqui*, SBIII : Antimoine trivalent, T.CONTROLE : Parasites+ DMSO à 0.5%. A,B,C,D,E : Comparaison des moyennes par le test de Fisher.

Le SBIII à 100ug/ml a donné un pourcentage de vitalité sur *L. major* inférieur à 8%, par contre la même concentration de SBIII a complètement inhibée la croissance de *L. infantum* (% de vitalité égal à 0,00%) ; montrant donc que la concentration inhibitrice à 50% des parasites (CI50) de SBIII sur *L. infantum* (4,29 $\mu\text{g/ml}$) est moins que celle de *L. major* (9,64 $\mu\text{g/ml}$) (Tableau 7). Concernant

le test d'activité antileishmanique de L'EE-F et malgré une allure de courbe de croissance différente de celle du témoin de référence (SBIII) ; mais l'extrait avait une bonne action inhibitrice sur les *L. infantum* que les *L. major* avec des CI50 à 32,29 $\mu\text{g/ml}$ et à 52.66 $\mu\text{g/ml}$ respectivement (Fig. 2, Tableau 7).

Tableau 7: CI50 (ug/ml) de l'EE-F et le SBIII sur les *L. major* et *L. infantum* par les deux méthodes

<i>L. major</i> Lipa 100/09	EE-F	Bleu de TRYPAN	52.66
		MTT	42.20
SBIII	Bleu de TRYPAN		9.64
		MTT	8.80
<i>L. infantum</i> Lipa 15/05	EE-F	Bleu de TRYPAN	32.29
		MTT	36.26
SBIII	Bleu de TRYPAN		4.29
		MTT	5.83

La comparaison des moyennes individuellement par le test de Fisher (Fig. 3) peut nous montrer bien si l'effet de n'importe qu'elle concentration de l'EE-F sur la croissance de *L. major* avait un effet similaire

entre les souches de *L. infantum* par chaque test, dont les intervalles qui ne contiennent pas la valeur 0 ont une différence significative de l'effet antileishmanien.

Si on remarque bien les deux schémas de la figure 03 (A et B) ; on constate premièrement que les valeurs des pourcentages d'inhibition sont beaucoup plus proches de la moyenne dans la méthode de MTT, résultant des intervalles de confiances plus courts que ceux de la méthode de bleu de TRYPAN; dans la méthode de MTT ; l'effet de l'EE-F sur les deux souches été complètement différent entre toutes les concentrations testées (aucun intervalle contient la valeur 0), par contre l'action de l'EE-F sur la croissance des deux souches testées par la méthode de bleu de TRYPAN a reconnu certains similarité de l'effet (valeurs touchant le 0), principalement à la concentration de 12.5ug/ml qu'avait presque le même effet sur les deux souches.

A

B

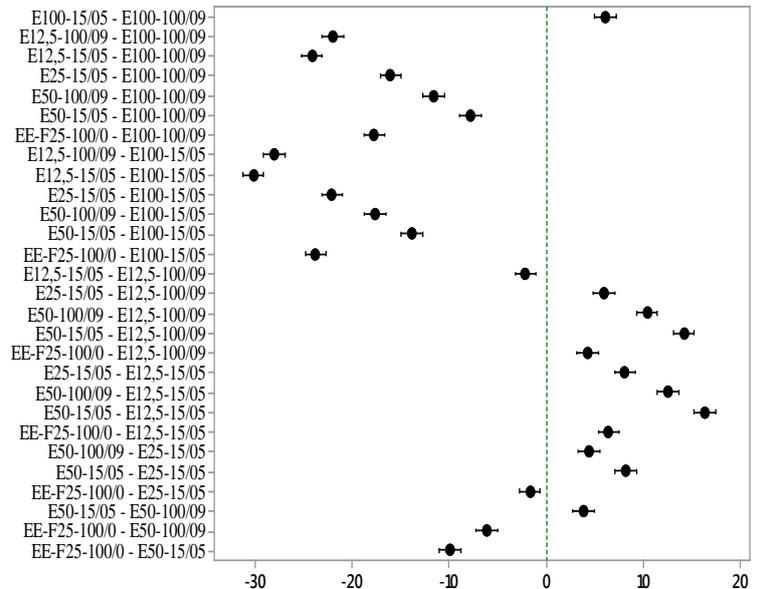
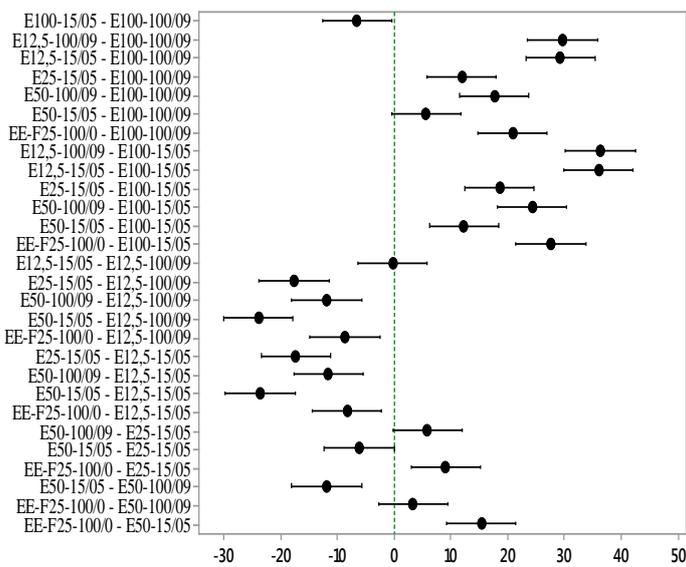


Figure 3 : Comparaison de l'effet antileishmanien *in vitro* de l'EE-F entre les deux souches testées par les deux méthodes par le test de comparaison individuelle des moyennes – Test de Fisher.

A : Bleu de Trypan, B : MTT, E : Extrait éthanolique de feuilles, 100/09 : *L. major*, 15/05 : *L. infantum*

DISCUSSION

Le traitement topique des blessures provoquées par la leishmaniose indique que la maladie n'est pas reconnue comme infection systémique par le parasite, mais comme une épidémie des plaies et les surinfections qui surviennent ; par conséquent, le *C. parqui* comme il est couramment utilisé pour désinfecter et guérir les blessures aussi il est appliqué par les populations pour traiter la leishmaniose [66, 67, 68, 69].

Les résultats obtenus dans ce travail confirment l'utilité traditionnelle de feuilles de cette plante contre l'infection par les Leishmanies, le choix de la méthode de l'extraction et la nature du solvant utilisé est basé sur l'originalité ; par contre d'autres types d'extractions dont le solvant est différent ont été déjà réalisées. L'éthanol absolu ; qui est le solvant choisi pour l'ESL dans ce travail est de polarité très élevée ; connue pour extraire la totalité des composés polaires du Totum de la plante (composés les plus actifs) ;

nombreux chercheurs ont pris les initiatives de mettre en évidence quelques composés de feuilles de *C.parqui* par le criblage phytochimique [40, 67, 68, 69] : la positivité et la négativité des tests réalisés par Ratsch [40] et l'équipe de Khaled *et al.* [69] étaient proches à nos résultats. La richesse de feuilles de *C.parqui* en composés phytochimiques principalement les alcaloïdes, les saponines, et les tanins, et les polyphénols confirme les informations traditionnelles recueillies lors de l'enquête telles que leurs utilisations comme antimicrobiens. L'utilisation traditionnelle des plantes du genre *Cestrum* pour lutter contre les protozoaires flagellés a déjà été reporté [70, 71, 72, 73], malgré la richesse des espèces de *Cestrum* en molécules connues comme antiparasitaire mais peu de travaux sur l'activité antiprotozoaire ont été réalisées [74, 46], Il est démontré que ce genre est riche principalement en saponines, alcaloïdes, et les terpènes ; qui pourraient être responsables de l'activité antiparasitaire [75, 76, 77, 78, 79].

La richesse de l'EE-F en composés actifs nous a inspiré de chercher si la synergie entre ces molécule a un effet antiparasitaire ou non ; un extrait total renferme de très nombreuses molécules, et lorsqu'ils sont testées séparément peuvent n'avoir que très peu d'activité ; basant sur ça qu'on a commencé de tester l'extrait éthanolique de feuilles. Dans le cas de molécules possédant des effets synergiques (activités contre le parasite sur une même voie métabolique) ou des effets de potentialisation (activités contre le parasite sur des voies différentes et complémentaires), nous observons une activité anti-parasitaire plus importante lorsque ces molécules sont testées ensemble. La purification de tels composés ne conduit donc pas à une concentration linéaire de l'activité.

La purification de composés implique parfois des manipulations dénaturant les principes actifs. Par exemple : des substances actives volatiles peuvent s'évaporer à l'air ambiant ou à l'évaporateur rotatif ; dans le cas d'extractions à chaud, la température peut altérer les composés ; l'utilisation d'acides ou de bases (dans les extractions d'alcaloïdes) peut hydrolyser certaines structures ; des impuretés ou solvants réactifs peuvent modifier les molécules isolées. Tous ces paramètres expérimentaux agissent donc sur l'évolution de l'activité biologique au cours des purifications [80].

Très peu de recherche de toxicité *in vitro* sur les lignées cellulaires humaines de l'EE-F de *C. parqui* ont été publiées ; on retrouve qu'une seule étude de cytotoxicité de l'extrait éthanolique sur les cellules de Caco-2 réalisée en 2010 par l'équipe de Gloria *et al.* [67] même pour les peu d'études de cytotoxicité des différents extraits de quelques espèces de genre *Cestrum* ; l'ensemble de leurs CC50 de leur extraits étaient toujours élevées (généralement supérieures à 200 µg/ml) [74, 69, 81].

On comparant les pourcentages de cytotoxicité de DMSO à 0.5 % de deux méthodes qui sont vraiment proches ; on peut conclure que la différence est due aux lots du contrôle puisque le résultat est toujours calculé par rapport à ce lot, sachant que la croissance des *Thp1* dans les mêmes conditions des deux méthodes n'assure pas avoir exactement la même charge cellulaire à la fin de l'expérience ; et n'ignorant pas l'apoptose cellulaire spontanée qui peut provoquer cette petite différence. Les CC50 obtenues de l'EE-F (> 800 µg/ml) indiquent que l'extrait n'est pas cytotoxique *in vitro* sur ces cellules monocytaires humaines ; sachant que ces cellules sont la première cible des *Leishmanies* au début de l'infection chez l'homme ; les doses finales testées de l'EE-F sont choisies en basant sur de ne pas choisir des doses létales nocives ; ces résultats ne sont pas complètement valides ; des tests de cytotoxicité plus poussés et avec des fractionnements de l'extrait sont fortement recommandés pour mieux se rapprocher à l'effet réel des différents composés de cet extrait.

Les produits antileishmaniens ont une action inhibitrice sur la synthèse de l'ADN, sur l'oxydation glycolytique et sur celle des acides gras, de plus ils ne sont actifs *in vivo* qu'après conversion en antimoine trivalent (comme le SbIII), Il vient d'être démontré que l'antimoine trivalent est un inhibiteur de la trypanothione réductase du parasite, enzyme présente seulement chez le parasite [4]. Dans ce travail ; on n'a pas pu démontrer l'action antiparasitaire de l'EE-F sur le plan physiologique et génétique ; ce genre d'étude faisant partie des travaux d'exploitation dans le futur ; mais on peut dire que l'action antiparasitaire de l'extrait résulte de l'effet de synergie des différentes molécules criblées de cet extrait.

D'après Sereno et Lemesre [64, 65] ; un extrait brut a une activité leishmanicide si la CI50 est inférieur à 400 ug/ml ; les résultats obtenus dans ce papier montre que l'EE-F est fortement actif sur les deux souches testées avec des CI50 inférieur à 100 ug/ml.

L'évaluation de l'activité antileishmanienne d'une plante est complexe et requiert de nombreux outils d'analyse. Dans le cas de cette étude, l'efficacité de *C.parqui* a été démontrée par l'activité *in vitro* de l'un de ses extraits contre *L.major* et *L.infantum* ; Il est certain que de nombreuses plantes ne répondent pas de manière positive à ce type de test mais possèdent tout de même une activité contre la leishmaniose (plantes soignant la symptomatologie de la maladie ou potentialisant d'autres drogues...). La notion d'efficacité d'une plante est également dépendante du type de médecine dans laquelle elle est employée, elle varie donc selon les cultures. En conséquent, nous ne pouvons absolument pas affirmer que les plantes inactives *in vitro* sur *L. major* et *L. infantum*, sont dénuées d'efficacité contre la leishmaniose. Néanmoins la reproductibilité, la simplicité et l'objectivité des tests *in vitro* permettent une sélection rationnelle des plantes potentiellement antileishmaniennes.

CONCLUSION

L'EE-F de feuilles de *C.parqui* par sa richesse en molécules actives sur l'inhibition de la prolifération cellulaire des formes promastigotes de *L. major* et *L. infantum* a donné dans ce travail un effet antileishmanien important ; les résultats de ce travail font un point de départ pour mieux comprendre les mécanismes d'inhibition et même pour tester d'autres extraits bruts ou fractionnés de cette plante, et de tester aussi d'autres souches de *Leishmania* afin d'optimiser les résultats. Dans cette optique, le fractionnement et l'hémisynthèse à partir de cet extrait peut permettre de baisser la toxicité du traitement et d'augmenter la biodisponibilité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Dedet J.P. (2009).** Les leishmanioses : introduction à la prise en charge. Université Montpellier-I et CHU de Montpellier. Centre national de référence des *Leishmania*. Bull Soc Pathologie Exotique. Pathexo3392 Thérapeutique des leishmanioses. Paris 102: 123-129.
- [2]. **Buffet P, Caumes É., et Gentilini M. (1994).** Traitement des leishmanioses cutanées localisées. *Ann Dermatol Vénérolog*, 121 : 503-511.
- [3]. **Grevelink SA et Lerner EA. (1996).** Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 34 : 257-272.
- [4]. **Baiocco, P. (2009).** Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem*. 52: 2603-12.
- [5]. **Ciaramella P., Oliva G., et De Luna R. (1997).** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum* *Veterinary Record*. 141: 539-543.
- [6]. **Solano-Gallego L., Llull J., et Arboix M. (2001).** Evaluation of the efficacy of two leishmanins in the detection of cellular immunity in asymptomatic dogs *Veterinary Parasitology*,102(1-2) : 163-166.
- [7]. **Ahua K.M., Ioset J.R., Ioset K.N., Diallo D., Maue L J., et Hostettmann K (2007).** Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110 : 99-104.
- [8]. **Harrat Z., Hamrioui B., Belkaid M. et Tabet-Derraz O. (1995).** Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 88 :180-184.
- [9]. **Bachi F. (2006).** *Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie.* 21: 9-15.
- [10]. **OMS (2010).** La lutte contre la leishmaniose ; Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22 - 26 mars, n°949.
- [11]. **Loïc Epelboin (2012).** *Prise en charge des leishmanioses en Algérie ; Journées d'échanges scientifiques de l'Ouarsenis Tissemsilt, Algérie.*
- [12]. **Cherif K. (2014).** Etude Eco-Epidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le bassin du Hodna (M'SILA), Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- [13]. **INSP (2011).** *Situation Epidémiologique provisoire de l'année 2011 sur la base des cas déclarés à l'I.N.S.P.* Relevés épidémiologiques mensuels : 5.

- [14]. Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P., Wasunna M.K. et Bryceson A.D.M. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Diseases*, 2: 494-501.
- [15]. Kolodziej H., Kiderlen A.F. (2005). Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 66 : 2056–2071.
- [16]. Haldar A.K., Banerjee S., Naskar K., Kalita D., Islam N.S., Roy S. (2009). Sub-optimal dose of Sodium Antimony Gluconate (SAG)-diperovoxanadate combination clears organ parasites from BALB/c mice infected with antimony resistant *Leishmania donovani* by expanding antileishmanial T-cell repertoire and increasing IFN- γ to IL-10 ratio. *Exp. Parasitol.* 122 : 145–154.
- [17]. Grogl M., Thomason T.N., et Franke E.D. (1992). Drug resistance in leishmaniasis: Its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*, 47: 117-26.
- [18]. Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561–1577.
- [19]. Kedzierski L., Sakthianandeswaren A., Curtis J.M., Andrews P.C., Junk P.C., Kedzierska K. (2009). Leishmaniasis: current treatment and prospect for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.* 16 : 599–614.
- [20]. Sundar N., Kumar M., Singh R.K. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5 : 485-497.
- [21]. Fournet et Muñoz A.V. (2002). Natural Products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2:1213-1235.
- [22]. Croft S.L., Sundar S., et Fairlamb A.H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 19: 111-26.
- [23]. Jaafari M.R., Hooshmand S., Samiei A., et Hossainzadeh H. (2007). Evaluation of leishmanicidal effect of *Perovskia abrotanoides* Karel. Root extract by *in vitro* leishmanicidal assay using promastigotes of *Leishmania major*. *Pharmacologyonline*. 1: 299-303.
- [24]. Singh N., Kumar M., et Singh R.K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 5: 485-497.
- [25]. Chan Bacab M.J., et Pen A-Rodriguez L.M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 18 : 674–688.
- [26]. De Carvalho P.B., et Ferreira E.I. (2001). Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-Review. *Fitoterapia.* 72 : 599-618.
- [27]. Newman D.J., Cragg G.M., et Gordon M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70 : 461–477.
- [28]. Duran G., Duran N., Culha G., Ozcan B., Oztas H., et Ozer B. (2008). *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitol Res* 102:1217–1225.
- [29]. Beutler JA. (2009). Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*, 46 : 9.11.1.
- [30]. Sereno D, Cordeiro Da Silva A, Mathieu-Daude F, et Ouaiissi A. (2007). Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 56:3–7.
- [31]. Tatiana S. Tiuman A.B., Adriana O., Santos B., Tania Ueda-Nakamura A.B., Benedito P., Dias Filho A.B., Celso V., et Nakamura A.B. (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment, *International Journal of Infectious Diseases* 15 : 525–532..
- [32]. Hammiche (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*, Springer-Verlag, France, Paris.
- [33]. Barbouche N., Hajjem B., Lognay G., Ammar M. (2001). Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 : 85-90.
- [34]. Croft D. et Holding D. (2004). A community approach: Green *Cestrum*. factsheet. cooperative research centre for australian Weed management. www.weeds.crc.org.au

- [35]. **Aguilar R., et Galetto L. (2004).** Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae), *Oecologia*. 138: 513–520.
- [36]. **Reid S., et Armesto JUAN J. (2011).** Avian gut-passage effects on seed germination of shrubland species in Mediterranean central Chile, *Plant Ecol*. 212:1–10.
- [37]. **Evert T., Vandebroek I., Goetghebeur P., Sabino S., Arrazola S., et Patrick V. (2008).** The Relation ship Between Plant Use and Plant Diversity in the Bolivian Andes, with Special Reference to *Medicinal Plant Use Damme Hum Ecol*. 36:861–879.
- [38]. **Ladio M., Lozada M., et Weigandt M. (2007).** Comparison of traditional wild plant knowledge between aboriginal communities inhabiting arid and forest environments in Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments* 69 : 695–715.
- [39]. **Houghton P.J., et Manby J. (1985).** Medicinal plants of the mapuche, *Journal of Ethnopharmacology*, 13: 89-103.
- [40]. **Ratsch C. (1998).** The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its Applications. Rochester: *Park Street Press*.
- [41]. **Mendoza AC. (2009).** *Plantas medicinales. L'experiencia de Tinguipaya* .2da. Edición : 113.
- [42]. **Ceuterick M., Vandebroek I., et Pieroni A. (2011).** Resilience of Andean urban ethnobotanies: A comparison of medicinal plant use among Bolivian and Peruvian migrants in the United Kingdom and in their countries of origin. *Journal of Ethnopharmacology* 136 : 27–54.
- [43]. **Toursarkissian M. (1912).** Plantas Medicinales de la Argentina: Sus Nombres Botánicos, Vulgares, Usos y Distribución Geográfica” Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- [44]. **Lahitte H.B. et Y Hurrel J.A. (1998).** Plantas medicinales rioplatenses utilizadas en medicina popular en la región del delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera platense”. L.O.L.A., Buenos Aires.
- [45]. **Ruben V.D. Rondina, Arnaldo L. Bandoni, et Coussio Jorge D. (2010).** Argentine medicinal plants with potential antifungal activity. *Dominguezia*. 26 : 1-9.
- [46]. **Valadeau C.B., Adrianac P., Deharo E.B.D., Castillo J., Yannickb E., Augustof L.F., Rosariog R., Dioniciag G., Michelb. D S., Castillo D., et Genevieveb B.D. (2009).** Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 123 : 413–422.
- [47]. **Jose San Martin A. (1983).** Plants in Central Chile, *Economic Botany*, 37 : 216-227.
- [48]. **Backhouse N., Delporte C., et Negrete R. (1996).** Antiinflammatory and antipyretic activities of *Cuscuta chilensis*, *Cestrum parqui* and *Psoralea glandulosa*. *Int J Pharmacog*, 34 :53-7.
- [49]. **D'Abrosca B.A., Dellagreca M.B., Fiorentino A.A., Monaco P.A., et Zarrelli A.B. (2004).** Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum parqui*, *J. Agric. Food Chem*. 52: 4101–4108.
- [50]. **Mihoubi I., Picot S., Hafirassou N., et Monbrison F. (2008).** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102 :1157-1159.
- [51]. **Harrat Z., Boubidi SC., Pralong F., Benikhlef R., Selt B. (2009).** Description of a dermatropic leishmania close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pralong 1986) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 716–720.
- [52]. **Houghton P. J., et Raman A. (1998).** *Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts*. Chapman et Hall, Londres, 1ère éd., 29-31.
- [53]. **Ronchetti F., et Russo G. (1971).** A new alkaloid from *Rauvolfia vomitoria*. *Phytochemistry, HEGNAUER*. 10 : 1385-1388.
- [54]. **Hegnauer R. (1973).** *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 6 :761.
- [55]. **Ciulei I. (1982).** *Practical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs*. Bucharest: Ed. Ministry of chemical industry : 67.

- [56]. **Wagner H. (1983).** *Drogen analyse, Dünnschicht chromatographische Analyse von Arzneidrogen.* Springer Verlag Berlin Heidelberg New York : 522.
- [57]. **Trease E., et EVANS W.C. (1987).** *Pharmacognosy.* Billiare.Tindall. London 13 Edn : 61-62.
- [58]. **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc, Gmira N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides* » *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 142 :61-78.
- [59]. **Bekro Y.A., Bekro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H. et Ehile E.E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi Caesalpiniaceae. *Rev. Sci. Nat.* 4: 217-225.
- [60]. **Castillo D., et al. (2007).** Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J Ethnopharmacol.* 112: 410-414.
- [61]. **Mosmann T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 :55-63.
- [62]. **Warren S. (1997).** Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc : A.3B.1-A.3B.2.
- [63]. **David J., Satoskar A.R., Brombacher F., Shoemaker C.B., Titus R.G., et Boza M. (1997).** Immunomodulatory properties of maxadilan, a peptide derived from sand fly saliva. *Acta Parasitol Turcica* 21:174.
- [64]. **Sereno D., et Lemesre J.L. (1997 a).** Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 972-976.
- [65]. **Sereno D., et Lemesre J.L. (1997 b).** Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigotes stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Res.* 83: 401-403.
- [66]. **Antonio Fiorentino A., Marina Dellagrecia B., Brigida D'abrosca A., Palma Oriano A., Annunziata Golino A., Angelina Izzo A., Armando Zarrelli B., et Pietro Monaco. (2007).** Lignans, neolignans and sesquignans from *Cestrum parqui* l'Her. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 392-396.
- [67]. **Gloria C.R., Giovanna R.A., Bjorn A., et Rui-Dong D. (2010).** Antiproliferative activity of extracts of Bolivian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4 : 2204-2210.
- [68]. **Paul D., De D., Ali K.M. (2010).** Comparative study on the spermicidal activity of organic solvent fractions from hydro-ethanolic extracts of *Achyranthus aspera* and *Stephania hernandifolia* on human and rat sperm. *Contraception.* 81:355-61.
- [69]. **Khaled R., Xing-Jie Z., Meng-Ting L., et Yong-Tang Z. (2013).** Evaluation of anti-hiv-1 activity from *Cestrum nocturnum* aerial parts and phytochemical analysis. *Reviews of Progress.* 1 : 5-11.
- [70]. **Bourdy G., Chavez De Michel L.R., et Roca-Coulthard A. (2004).** Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceno-Guarani (Bolivian Chaco). *J Ethnopharmacol.* (2-3):189-208.
- [71]. **Yannick E. (2009).** *Activite leishmanicide de plantes issues de la pharmacopee traditionnelle Peruvienne et de molecules de synthese; etude relation structure activite.* Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier : 79.
- [72]. **Odonne G. (2010).** Approche ethnopharmacologique comparative des traitements phytothérapeutiques de la leishmaniose en Amazonie : 208-209.
- [73]. **Bussmann W. (2013)** The Globalization of Traditional Medicine in Northern Peru: From Shamanism to Molecules Rainer Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 291903 : 46.
- [74]. **Madureira M., Martins A.P., Gomes M., Paiva J., Antonio Proenc A., Da Cunha A., Do Rosario V. (2002).** Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Principe islands *Journal of ethnopharmacology* ; 81 : 23-29.
- [75]. **Kayser O., Kinderlen A.F., Croft S.L. (2003).** Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res* 90: 55-62.
- [76]. **Fouad M.A. (2008).** Cesdiurins I-III, steroidal saponins from *Cestrum diurnum* L. *Nat Med* (Tokyo). 62(2):168-73.

- [77]. **Germonprez N. (2003).** *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *J Med Chem.* 48 : 32-37.
- [78]. **Das R., et al.** Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis*, 13 : 867-82.
- [79]. **Mishra B.B., Kale R.R., Singh R.K., Tiwari V.K. (2009).** Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 80: 81-90.
- [80]. **Aïache J. M., Devissaguet J.P., Guyot-Hermann A.M. (1978).** Galenica, biopharmacie. tecand doc, Paris.
- [81]. **Sri Wahyuni T., Tumewu L., Ayu Permanasari A., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Inge Lusida M., Fuad A., Soetjipto N., Fuchino H., Kawahara N., Shoji I., Deng L., Aoki C., and, Wahyuni H.- H. (2013).** Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal* 10:259.