

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Spécialité : Parasitologie et chimie antiparasitaire

Présentée et soutenue publiquement par

JÉRÉMY SPALENKA

Le 6 juin 2018

**Screening et identification de molécules actives sur *Toxoplasma gondii* et
autres protozoaires d'intérêt médical et vétérinaire**

Thèse co-dirigée par **M. DOMINIQUE AUBERT** et **M. JEAN-HUGUES RENAULT**

JURY

M. Dominique AUBERT, Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Directeur de thèse**
M. Jean-Hugues RENAULT, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Co-directeur de thèse**
Mme. Marie-Laure DARDÉ, Professeur, Université de Limoges, **Rapporteur**
M. Philippe LOISEAU, Professeur, Université de Paris-Sud, **Rapporteur**
M. Aurélien DUMÈTRE, Maître de Conférences, Université d'Aix-Marseille, **Examineur**
Mme. Jane HUBERT, Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Examineur**
Mme. Isabelle VILLENA, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Examineur**
Mme. Catherine VONTHRON-SÉNÉCHEAU, Maître de Conférences, Université de Strasbourg, **Examineur et Présidente du Jury**



UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Spécialité : Parasitologie et chimie antiparasitaire

Présentée et soutenue publiquement par

JÉRÉMY SPALENKA

Le 6 juin 2018

**Screening et identification de molécules actives sur *Toxoplasma gondii* et
autres protozoaires d'intérêt médical et vétérinaire**

Thèse co-dirigée par **M. DOMINIQUE AUBERT** et **M. JEAN-HUGUES RENAULT**

JURY

M. Dominique AUBERT, Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Directeur de thèse**
M. Jean-Hugues RENAULT, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Co-directeur de thèse**
Mme. Marie-Laure DARDÉ, Professeur, Université de Limoges, **Rapporteur**
M. Philippe LOISEAU, Professeur, Université de Paris-Sud, **Rapporteur**
M. Aurélien DUMÈTRE, Maître de Conférences, Université d'Aix-Marseille, **Examineur**
Mme. Jane HUBERT, Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Examineur**
Mme. Isabelle VILLENA, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, **Examineur**
Mme. Catherine VONTHRON-SÉNÉCHEAU, Maître de Conférences, Université de Strasbourg, **Examineur et Présidente du Jury**



Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes plus sincères remerciements à Madame le Professeur Isabelle Villena, à Monsieur le Docteur Dominique Aubert, à Monsieur le Professeur Jean-Hugues Renault et à Madame le Docteur Jane Hubert pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs depuis le début de ce projet en stage de Master 2. Je vous remercie d'avoir dirigé, encadré, supervisé cette thèse tout au long de ces quatre années, le tout avec un investissement certain. J'en ressors riche des enseignements et conseils que vous m'avez tous prodigués. Merci à vous pour cette collaboration et cette thèse sur mesure !

Je remercie Madame le Professeur Marie-Laure Dardé et Monsieur le Professeur Philippe Loiseau d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et à qui je témoigne d'un profond respect.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Docteur Aurélien Dumètre pour avoir eu l'obligeance d'examiner ce travail. Je vous remercie sincèrement pour votre présence dans ce jury mais aussi pour les conseils avisés que vous m'avez donnés lors du comité de thèse.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Catherine Vonthron-Sénécheau pour avoir accepté d'examiner mon travail. Un grand merci également pour ton accueil chaleureux et ta bonne humeur lors de mes deux courts passages à Strasbourg, ainsi que pour ta patience lorsqu'il s'agissait des problèmes rencontrés pour la culture de *Plasmodium*. Tes conseils judicieux lors du comité de thèse m'ont également été d'une grande aide pour la suite des expérimentations.

Je remercie chaleureusement Madame le Docteur Sandie Escotte-Binet pour son aide inestimable, ses nombreux conseils et compétences auxquels j'ai pu faire appel maintes fois depuis le début du projet. Merci pour tout, Madame le couteau-suisse du laboratoire !

Je remercie Monsieur le Professeur Loïc Favennec et Monsieur le Docteur Gilles Gargala, ainsi que toute l'équipe de Rouen, pour les discussions intéressantes qui ont pu se faire suite aux différentes réunions entre les deux équipes, le tout de la façon la plus bienveillante et sympathique possible.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Marie-Lazarine Poule pour sa sympathie et son entrain à partager ses connaissances lorsque l'occasion le permettait.

Un grand merci à l'équipe du service Parasitologie du CHU pour leur aide, leurs conseils et leur savoir-faire, notamment Régine, Emilie, Loren et Naïma. Je remercie également Laurence et Laurence pour leur sympathie et leur gentillesse à chaque fois que je faisais un crochet par le secrétariat.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Frédéric Velard pour son aide inestimable, ses nombreux et précieux conseils, et sa confiance, toujours avec une grande bienveillance et de l'humour à profusion. La qualité de ta pédagogie et de ton expertise est inversement proportionnelle au nombre de cheveux qu'il te reste !

J'en profite également pour remercier toute l'équipe de l'EA 4691 BIOS pour leurs conseils et leur aide ainsi que leur bonne humeur quotidienne : Christine, Léa, Hassan, Halima, Marie, Cédric, Florian et Fanny. Un merci particulier à Martial et à Marius pour les longues discussions passées à parler jeux vidéo et autres éléments de la culture geek.

Je présente mes sincères remerciements au Docteur Christine Terryn pour sa disponibilité, sa sympathie et ses compétences en imagerie confocale.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Jérôme Depaquit, dont la pédagogie et l'enthousiasme communicatif m'ont fait découvrir et aimer ce vaste domaine qu'est la parasitologie. Si j'en suis arrivé là aujourd'hui, c'est en partie grâce à toi.

Je remercie Mireille Cousinat pour sa gentillesse légendaire et les nombreuses discussions que nous avons pu avoir au détour d'un couloir, et ce toujours avec le sourire. Un grand merci également à Véronique Lehrter, dont l'aide a été un véritable salut lors de mes problèmes de coloration de frottis sanguins. Enfin, je remercie le Docteur Christine Millot pour les (trop peu nombreuses) discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir vers la fin de ma thèse.

Je remercie chaleureusement l'équipe du laboratoire d'Innovation Thérapeutique de Strasbourg pour leur accueil, leurs conseils, leur expertise, leur disponibilité et leur sympathie. Flore, Laure, Nicolas et Jean-Baptiste, je vous souhaite également le meilleur pour l'avenir.

J'adresse également mes remerciements au Docteur David Ta Phi Thanh et à Isabelle Trichet, de l'Etablissement Français du Sang, pour leur disponibilité et leur accueil.

Je remercie mes collègues doctorants ou post-doctorants, Julie, Matthieu, Angélique, Ali, Loïc, Antoine et Salma ainsi que les stagiaires venus dans notre laboratoire : Simon, Marie, Sabine, Irène, Elsa, Louis, Pierre, Pierre et Malik.

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu croiser au 3^{ème} étage pour leur gentillesse, leur soutien et leur bonne humeur, avec ou sans café : Jérôme, Yves, Sandra, Claire, Rida, Sylvie et Jennifer. Merci à Monsieur le Professeur Richard Le Naour, Mehdi, Flora et Alexandre pour leur aide. Merci aussi aux hommes de l'ombre, André, Michel, Pierre et Jean-Claude, ainsi qu'à Martial et Catherine pour leur sympathie et leur convivialité.

Je tiens également à remercier les membres de l'UMR FARE, les Docteurs Sabine Gognies, Angélique Gainvors-Claisse, Estelle Copinet, Harivony Rakotoarivonina et Ludovic Besaury, ainsi que Véronique, Younes et Quentin, pour leur accueil chaleureux et amical lorsque j'ai pu faire des enseignements à leurs côtés. Un grand merci au désormais retraité Professeur Abdel Belarbi, dont la culture générale m'a maintes fois bluffé au détour de conversations des plus amicales. Votre bienveillance et votre bonté nous manqueront.

Je remercie Floriane, Hélène, Antony et Anne-Pascaline, Mélanie et Christelle pour leur soutien et leur amitié depuis les débuts de la thèse, voire avant. Soyez sûrs que j'en suis honoré.

Enfin, je remercie ma famille pour leurs encouragements, leur confiance et leur soutien indéfectible qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. Merci à vous, papa et maman, pour votre soutien et votre amour.

Mes derniers remerciements vont à Eléonore, qui a cru en moi et a été d'un soutien sans faille durant toutes ces années. Je t'aime.

A mes parents,

A Eléonore,

Screening et identification de molécules actives sur *Toxoplasma gondii* et autres protozoaires d'intérêt médical et vétérinaire.

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* et *Plasmodium falciparum* sont des parasites protozoaires intracellulaires obligatoires, respectivement responsables de la toxoplasmose, de la néosporose et du paludisme. Les différents traitements mis en œuvre reposent sur une association médicamenteuse. Cependant, des échecs thérapeutiques et des résistances aux traitements ont été décrits. Notre travail a porté sur l'identification de molécules actives isolées par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) à partir d'extraits d'écorces d'*Anogeissus leiocarpus*, un arbre d'Afrique de l'ouest connu pour son activité antipaludique, et de dix arbres de la région Champagne-Ardenne. Nous nous sommes penchés, dans un premier temps, sur l'activité antiparasitaire des fractions obtenues à partir d'extrait d'écorce d'*A. leiocarpus*. La trachelospérogénine E et l'extrait global sans tanin se sont révélés actifs, notamment en inhibant l'invasion des cellules hôtes par *T. gondii*. Cet extrait a également préservé la survie des souris atteintes de toxoplasmose chronique. Les mêmes composés naturels ont eu un effet contre *N. caninum* et *P. falciparum*. Dans une seconde partie, 30 extraits d'écorces de dix arbres de la région Champagne-Ardenne ont été testés sur *T. gondii* et *N. caninum*. Les composés responsables de l'activité antiparasitaire présents chez *Alnus glutinosa* semblent être la bétuline et ses dérivés. Dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'activité de 400 molécules de synthèse de la Pathogen Box. Huit d'entre elles ont eu un effet significatif contre *T. gondii*, dont trois avec une sélectivité importante. Des expérimentations sont toutefois à réaliser pour *N. caninum*.

Mots-clés : criblage moléculaire, parasites protozoaires, chromatographie de partage centrifuge, Pathogen Box, écorces, molécules actives.

Screening and identification of active molecules towards *Toxoplasma gondii* and other protozoans of medical and veterinary interest.

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* and *Plasmodium falciparum* are mandatory intracellular protozoan parasites and are responsible for toxoplasmosis, neosporosis and malaria, respectively. The different treatments used are based on drug combination. However therapeutic failures and drug resistances have been described. Our work focused on the identification of active compounds isolated by Centrifugal Partition Chromatography (CPC) from crude barks extracts from *Anogeissus leiocarpus*, a West African tree known for its antimalarial activity, and ten trees from the Champagne-Ardenne region. First we studied the activity of the fractions obtained from the crude bark extract from *A. leiocarpus*. Trachelosperogenin E and the global extract without tannin showed a good activity by inhibiting host cell invasion by *T. gondii*. The latter was able to preserve mice survival toward chronic toxoplasmosis. These extracts were also active on *N. caninum* and *P. falciparum*. In a second part 30 crude barks extracts from ten trees located in the Champagne-Ardenne region were screened on *T. gondii* and *N. caninum*. Compounds responsible for the antiparasitic activity found in *Alnus glutinosa* were especially betulin and its derivatives. In the last part of this study we focused on the antiparasitic activity of 400 synthetic molecules from the Pathogen Box. Eight out of them were significantly efficient against *T. gondii*, among which three showed an important selectivity. Further experiments must be completed in the case of *N. caninum*.

Keywords: molecular screening, protozoan parasites, centrifugal partition chromatography, Pathogen Box, barks, active molecules.

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Parasitologie et chimie antiparasitaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

PROTAL – EA 3800

Laboratoire de Parasitologie – Mycologie EA 3800
UFR Médecine, 51 rue Cognacq Jay
51095 Reims Cedex



Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abréviations

Liste des publications et des communications

Liste des formations suivies

INTRODUCTION 1

Contexte scientifique et présentation de l'étude 2

i) Les maladies, agents pathogènes, traitements et phénomènes de résistance 6

La toxoplasmose et *Toxoplasma gondii* 6

I. Les formes cliniques de la toxoplasmose 6

1) La toxoplasmose acquise de l'individu immunocompétent 6

2) La toxoplasmose congénitale 7

3) La toxoplasmose de l'individu immunodéficient 8

II. *Toxoplasma gondii* 9

1) Découverte du parasite 9

2) Les stades parasitaires 10

a. Le tachyzoïte 10

b. Le bradyzoïte 11

c. Le sporozoïte 12

3) Le cycle parasitaire de *T. gondii* 13

a. La phase sexuée : gamétogonie 13

b. La phase asexuée : schizogonie 15

4) Les différentes souches de *T. gondii* 15

a. Type I	15
b. Type II.....	16
c. Type III.....	16
5) Les protéines de <i>T. gondii</i>	16
a. Les protéines de surface SAG	17
b. Les protéines des organelles sécrétoires.....	17
III) Diagnostic et traitements de la toxoplasmose	19
1) Le diagnostic biologique	19
2) Le diagnostic sérologique.....	20
3) Les traitements de la toxoplasmose.....	20
a. Les inhibiteurs de la voie de synthèse des folates	20
b. La voie de synthèse des protéines et l'apicoplaste.....	21
c. La voie de l'ubiquinone, transporteur d'électrons.....	22
La néosporose et <i>Neospora caninum</i>	23
I) La néosporose.....	23
1) La néosporose canine	23
2) La néosporose bovine	24
II) <i>Neospora caninum</i>	25
1) Découverte du parasite	25
2) Les stades parasitaires	26
3) Le cycle parasitaire de <i>N. caninum</i>	28
4) Les différentes souches de <i>N. caninum</i>	29
5) Les protéines de <i>N. caninum</i>	30
a. Les protéines de surface	30
b. Les protéines des organelles sécrétoires.....	30
III) Diagnostic et traitement de la néosporose	31
1) Le diagnostic histologique.....	31

2) Le diagnostic immuno-histochimique	32
3) Détermination de la viabilité du parasite.....	32
4) Le diagnostic par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	33
5) Le diagnostic sérologique.....	33
6) Les traitements de la néosporose.....	33
Le paludisme et <i>Plasmodium falciparum</i>	35
I) Le paludisme	35
1) Historique	35
2) Les vecteurs du paludisme	36
3) Les modes de transmission du paludisme	37
a. La transmission vectorielle.....	37
b. La transmission par transfusion sanguine	38
c. La transmission materno-fœtale	39
4) Les manifestations cliniques du paludisme	39
a. L'accès palustre.....	39
b. Le paludisme viscéral évolutif	39
c. Le neuropaludisme	39
d. Le paludisme de la femme enceinte	40
e. Autres formes de paludisme	40
II) <i>Plasmodium falciparum</i>	41
1) Les différentes espèces de <i>Plasmodium</i> pathogènes pour l'Homme	41
a. <i>Plasmodium knowlesi</i>	41
b. <i>Plasmodium malariae</i>	41
c. <i>Plasmodium vivax</i>	42
d. <i>Plasmodium ovale</i>	42
e. <i>Plasmodium falciparum</i>	42
2) Les stades et le cycle parasites	42

a. La schizogonie pré-érythrocytaire.....	43
b. La schizogonie érythrocytaire	45
3) Les différentes souches de <i>P. falciparum</i>	46
4) Les protéines de <i>P. falciparum</i>	47
a. La relation entre le parasite et le globule rouge	47
b. Les antigènes de Plasmodium	48
III) Diagnostic et traitement du paludisme	50
1) Le diagnostic clinique	50
2) Le diagnostic de certitude : l'examen sanguin au microscope.....	50
3) Les tests de diagnostic rapide (TDR)	51
4) Le diagnostic par biologie moléculaire	51
5) Le diagnostic sérologique.....	51
6) Les traitements du paludisme	51
a. Les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine	51
b. Les antifolates	52
c. Les naphthoquinones.....	52
d. Les antibiotiques	53
Les résistances médicamenteuses chez ces protozoaires.....	54
I) La chimiorésistance chez <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>	54
1) <i>Toxoplasma gondii</i>	54
2) <i>Neospora caninum</i>	55
II) La chimiorésistance chez <i>P. falciparum</i>	55
III) Contourner les chimiorésistances : un objectif à portée de main ?	56
ii) Méthodes de screening	58
I) Les méthodes de screening <i>in silico</i>	59
II) Les méthodes de screening <i>in vitro</i>	60

1) Les tests morphologiques	61
2) Les précurseurs radioactifs	61
3) La Polymerase Chain Reaction (PCR)	61
4) Les souches parasitaires transgéniques	62
5) Les tests de viabilité	62
6) Les tests immunologiques	63
III) Les méthodes de screening <i>in vivo</i>	63
iii) Ressources naturelles étudiées pour leurs actions antiparasitaires : <i>Anogeissus leiocarpus</i> et dix arbres de la région Champagne-Ardenne	65
I) Le bouleau d'Afrique (<i>Anogeissus leiocarpus</i>).....	66
1) Généralités.....	66
2) Utilisation par l'Homme.....	66
3) Caractérisation chimique	67
II) Le hêtre commun (<i>Fagus sylvatica</i>).....	67
1) Généralités.....	67
2) Utilisation par l'Homme.....	68
3) Caractérisation chimique	68
III) Le chêne pédonculé (<i>Quercus robur</i>).....	69
1) Généralités.....	69
2) Utilisation par l'Homme.....	69
3) Caractérisation chimique	70
IV) L'aulne glutineux (<i>Alnus glutinosa</i>).....	70
1) Généralités.....	70
2) Utilisation par l'Homme.....	71
3) Caractérisation chimique	72
V) Le merisier (<i>Prunus avium</i>).....	72
1) Généralités.....	72

2) Utilisation par l'Homme.....	73
3) Caractérisation chimique.....	73
VI) L'érable sycomore (<i>Acer pseudoplatanus</i>).....	73
1) Généralités.....	73
2) Utilisation par l'Homme.....	74
3) Caractérisation chimique.....	74
VII) Le frêne commun (<i>Fraxinus excelsior</i>).....	75
1) Généralités.....	75
2) Utilisation par l'Homme.....	75
3) Caractérisation chimique.....	76
VIII) Le peuplier robusta (<i>Populus robusta</i>).....	76
1) Généralités.....	76
2) Utilisation par l'Homme.....	77
3) Caractérisation chimique.....	77
IX) Le mélèze d'Europe (<i>Larix decidua</i>).....	77
1) Généralités.....	77
2) Utilisation par l'Homme.....	78
3) Caractérisation chimique.....	78
X) L'épicéa commun (<i>Picea abies</i>).....	79
1) Généralités.....	79
2) Utilisation par l'Homme.....	79
3) Caractérisation chimique.....	80
XI) Le tremble d'Europe (<i>Populus tremula</i>).....	80
1) Généralités.....	80
2) Utilisation par l'Homme.....	81
3) Caractérisation chimique.....	81
XII) Récapitulatif des dix essences de la région Champagne-Ardenne.....	81

iv) Présentation de la Pathogen Box.....	83
I) Historique	83
II) Principe.....	84
III) Données scientifiques actuelles.....	84
 MATÉRIELS ET MÉTHODES	88
 Partie I. Extraits naturels	89
I) Origine des extraits naturels d'écorces d'arbres.....	89
1) Ecorce d' <i>Anogeissus leiocarpus</i>	89
2) Ecorces d'arbres provenant de la région Champagne-Ardenne	89
a. Origine des arbres.....	89
b. Obtention des extraits naturels	89
II) Fractionnement des extraits naturels par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) 90	
1) Principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge (EPC)	90
2) Fractionnement des extraits par CPC	92
3) Obtention du profil chromatographique des différentes fractions par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	93
4) Analyse des fractions CPC par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	93
III) Solubilité des fractions d' <i>Anogeissus leiocarpus</i> et des dix arbres de la région Champagne- Ardenne dans le DMSO	94
1) Critères de sélection du DMSO en tant que solvant « universel ».....	94
2) Mode opératoire	95
 Partie II. Cultures cellulaires et parasitaires	96
I) Origine et caractéristiques des souches parasitaires utilisées.....	96
1) Souches de <i>Toxoplasma gondii</i>	96

2) Souche de <i>Neospora caninum</i>	96
3) Souches de <i>Plasmodium falciparum</i>	97
II) Cultures cellulaires et parasitaires	97
1) Culture cellulaire liée à <i>T. gondii</i> et à <i>N. caninum</i>	97
a. Lignée cellulaire Vero	97
b. Entretien des cellules Vero	97
c. Congélation et décongélation	98
d. Multiplication des parasites sur cellules Vero	99
2) Culture cellulaire liée à <i>P. falciparum</i>	100
a. Poche de sang total et conservation du sang	100
b. Préparation du Milieu de Culture Malaria (MCM)	101
c. Préparation des hématies pour la culture de <i>P. falciparum</i>	101
d. Congélation et décongélation des parasites	102
e. Multiplication des parasites	103
III) Evaluation du potentiel antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits d'écorces d'arbres sur <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>	104
1) Préparation des cellules Vero pour l'évaluation de la cytotoxicité	104
2) Cytotoxicité des extraits naturels	105
a. Screening	105
b. Détermination de la Concentration Cytotoxique à 50% (CC ₅₀)	105
c. Révélation à la résazurine	105
d. Analyse des données	107
3) Préparation des cellules Vero pour l'évaluation de la chimiosensibilité	107
4) Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> et de <i>N. caninum</i> aux extraits naturels	108
a. Screening	108
b. Détermination de la Concentration Inhibitrice à 50% (CI ₅₀)	108
c. Fixation des cultures parasitaires au méthanol froid	109

d. Dosage ELISA.....	109
e. Analyse des données	111
f. Coloration des cellules infestées et contrôles microscopiques.....	112
5) Calcul des indices de sélectivité (IS).....	112
6) Détermination préliminaire de l'action des extraits naturels sélectifs sur <i>T. gondii</i> vis-à-vis de la multiplication parasitaire et de l'invasion cellulaire	113
a. Préparation des cellules infestées	113
b. Immunomarquage pour microscopie optique.....	113
c. Immunolocalisation pour microscopie confocale	114
d. Analyse des données	115
IV) Evaluation du potentiel antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits d'écorces d'arbres sur <i>P. falciparum</i>	116
1) Préparation de la suspension parasitaire.....	116
2) Chimiosensibilité de <i>P. falciparum</i>	116
a. Détermination de la CI ₅₀	116
b. Dosage ELISA.....	117
c. Analyse des données	117
V) Evaluation du potentiel antiparasitaire <i>in vitro</i> de 400 composés provenant de la Pathogen Box	117
1) Préparation des composés	117
2) Screening de la Pathogen Box sur <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>	118
3) Détermination de la CC ₅₀	118
a. Préparation des cultures cellulaires	118
b. Analyse des données	119
4) Détermination de la CI ₅₀	119
a. Préparation des cultures cellulaires infectées et traitement.....	119
b. Analyse des données	119
5) Calcul des indices de sélectivité.....	119

6) Analyses statistiques.....	120
7) Comparaisons structurales des composés actifs.....	120
VI) Evaluation du potentiel antiparasitaire <i>in vivo</i> des extraits d'écorces d'arbres sur <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>	121
1) Modèle murin utilisé	121
2) Approche expérimentale.....	121
a. Lots de souris	121
b. Immunosuppression des souris.....	121
c. Procédure expérimentale	122
d. Sacrifice des souris et récupération des organes d'intérêt.....	122
e. Analyse des échantillons biologiques	122
VII) Récapitulatif de la méthodologie mise en jeu	123

RÉSULTATS ET DISCUSSION 126

Partie I : Chimiosensibilité de *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum* aux extraits d'écorce d'*A. leiocarpus* 127

I) Etudes préliminaires : isolement, identification et solubilité des fractions et détermination de la cytotoxicité	127
1) Isolement et identification des fractions obtenues par EPC	127
a. Premières fractions obtenues.....	127
b. Fractions CPC d' <i>A. leiocarpus</i>	129
2) Solubilité des fractions	131
3) Evaluation de la cytotoxicité sur cellules Vero	131
a. Premières fractions obtenues.....	131
b. Fractions CPC	133
II) Chimiosensibilité <i>in vitro</i> de <i>T. gondii</i> , <i>N. caninum</i> et <i>P. falciparum</i>	135
1) <i>Toxoplasma gondii</i>	135

2) <i>Neospora caninum</i>	141
3) <i>Plasmodium falciparum</i>	145
III) Identification de l'origine de l'effet antiparasitaire de EBST et TrachE chez <i>T. gondii</i> ..	146
1) Observations en microscopie optique.....	146
2) Observations en microscopie confocale	148
IV) Chimiosensibilité <i>in vivo</i> de <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i> à l'EBST et TrachE.....	150
1) Contexte.....	150
2) Evaluation de la chimiosensibilité <i>in vivo</i>	150
a. Lot A : toxoplasmose aiguë chez des souris immunocompétentes (souche RH).....	150
b. Lot B : toxoplasmose chronique chez des souris immunocompétentes (souche ME49)	151
c. Lot C : toxoplasmose aiguë chez des souris immunodéprimées (souche ME49)	154
d. Lot D : néosporose aiguë chez des souris immunodéprimées (souche NC1)	154
V) Bilan des résultats.....	155
VI) Conclusion et discussion	157

Partie II : Chimiosensibilité de *T. gondii* et *N. caninum* à des extraits d'écorces d'arbres de la région Champagne-Ardenne 165

I) Solubilité des extraits d'écorces dans le DMSO	165
II) Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i> aux extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne.....	166
1) Evaluation de la cytotoxicité et de la chimiosensibilité par screening.....	166
a. Evaluation de la cytotoxicité	166
b. Evaluation de la chimiosensibilité des parasites aux extraits d'essences par screening	167
2) Détermination de la CC ₅₀ et de la CI ₅₀ des extraits actifs sur <i>T. gondii</i>	169
a. Détermination de la CC ₅₀	169
b. Détermination de la CI ₅₀	170

3) Détermination de la CC ₅₀ et de la CI ₅₀ des extraits actifs sur <i>N. caninum</i>	171
c. Détermination de la CC ₅₀	171
d. Détermination de la CI ₅₀	171
III) Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i> aux fractions d'extrait d'aulne glutineux obtenues par EPC	171
1) Fractionnement des extraits <i>n</i> -heptane et méthanol d'aulne glutineux	171
2) Evaluation de la cytotoxicité et de la chimiosensibilité par screening.....	172
a. Evaluation de la cytotoxicité	172
b. Evaluation de la chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i> par screening.....	173
3) Détermination des CC ₅₀ et des CI ₅₀	175
a. Détermination de la CC ₅₀	175
b. Détermination de la CI ₅₀	177
4) Indices de sélectivité	181
IV) Caractérisation chimique des fractions actives et identification des composés responsables de l'activité antiparasitaire	182
1) Fractions actives de l'extrait <i>n</i> -heptane.....	182
2) Fractions actives de l'extrait méthanol.....	183
V) Bilan des résultats.....	185
VI) Conclusion et discussion	187
 Partie III : Screening de la Pathogen Box sur <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>.....	190
I) Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> aux molécules de la Pathogen Box	190
1) Evaluation de la chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> par screening.....	190
2) Détermination de la CC ₅₀ des molécules actives.....	190
3) Détermination de la CI ₅₀ des molécules actives et calcul des indices de sélectivité....	191
4) Analyses des similarités structurelles	193
II) Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> aux molécules de la Pathogen Box	195
III) Conclusion et discussion	196

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	200
BIBLIOGRAPHIE	206
ANNEXES.....	238

Liste des tableaux

Tableau I. Distribution géographique des cinq espèces de <i>Plasmodium</i> pathogènes pour l'Homme	41
Tableau II. Exemples de méthodes de screening <i>in vitro</i> dans le cas de parasites protozoaires apicomplexes.....	60
Tableau III. Récapitulatif des propriétés antimicrobiennes des dix essences de la région Champagne-Ardenne étudiées, focalisé sur certains métabolites primaires et secondaires caractérisés au sein de leurs écorces respectives.....	82
Tableau IV. Rapports tachyzoïtes/cellules utilisés pour la culture cellulaire	100
Tableau V. Concentrations utilisées en fonction des différents arbres à tester lors de la détermination de la CC ₅₀	105
Tableau VI. Composition des différents tampons utilisés pour le dosage ELISA.....	111
Tableau VII. Composition des différentes fractions isolées par CPC à partir de l'extrait brut éthanol 99% de poudre d'écorce d' <i>A. leiocarpus</i>	128
Tableau VIII. Composition des fractions CPC obtenues à partir de l'extrait brut éthanol 99% de poudre d'écorce d' <i>A. leiocarpus</i>	130
Tableau IX. Concentrations maximales de l'extrait brut d' <i>A. leiocarpus</i> et des différentes fractions dans le DMSO, en comparaison avec les données présentes dans la littérature et dans les fiches techniques des composés purs commercialisés.....	131
Tableau X. Tableau récapitulatif des valeurs de CC ₅₀ , CI ₅₀ et des indices de sélectivité des différents extraits et fractions obtenus à partir de l'écorce d' <i>A. leiocarpus</i> et testés sur <i>T. gondii</i>	138
Tableau XI. Tableau récapitulatif des valeurs de CC ₅₀ , CI ₅₀ et des indices de sélectivité des fractions CPC F1 à F5 obtenues à partir de l'écorce d' <i>A. leiocarpus</i> et testées sur <i>T. gondii</i>	141
Tableau XII. Tableau récapitulatif des valeurs de CC ₅₀ , CI ₅₀ et des indices de sélectivité des différents extraits et fractions obtenus à partir de l'écorce d' <i>A. leiocarpus</i> et testés sur <i>N. caninum</i>	143
Tableau XIII. Tableau récapitulatif de la valeur de CC ₅₀ , CI ₅₀ et de l'indice de sélectivité de la fraction CPC F7 obtenue à partir de l'écorce d' <i>A. leiocarpus</i> et testée sur <i>N. caninum</i>	145
Tableau XIV. Solubilité des 30 extraits d'écorces de dix arbres de la région Champagne-Ardenne	165

Tableau XV. Indices de sélectivité des fractions actives issues des extraits <i>n</i> -heptane et méthanol d'aulne glutineux	182
Tableau XVI. Caractéristiques des 15 composés présentant une activité antitoxoplasmique après criblage préliminaire à 1 μ M	190
Tableau XVII. Caractéristiques des huit composés montrant une activité anti- <i>T. gondii</i> sélective	191

Liste des figures

Figure 1. Ultrastructure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i>	11
Figure 2. Ultrastructure d'un bradyzoïte de <i>T. gondii</i>	12
Figure 3. Oocyste et sporozoïtes de <i>T. gondii</i>	13
Figure 4. Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i>	14
Figure 5. Reconstruction tridimensionnelle d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> mettant en évidence les granules denses, les rhoptries et les micronèmes.....	18
Figure 6. Schéma simplifié de la voie de synthèse des folates chez <i>T. gondii</i>	21
Figure 7. Ultrastructure d'un tachyzoïte de <i>N. caninum</i> en microscopie électronique à transmission.....	27
Figure 8. Ultrastructure d'un bradyzoïte de <i>N. caninum</i> en microscopie électronique à transmission.....	28
Figure 9. Oocyste de <i>N. caninum</i>	28
Figure 10. Cycle parasitaire de <i>N. caninum</i>	29
Figure 11. Nécrose cérébrale typique de la néosporose chez un fœtus bovin après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.....	32
Figure 12. Première description d' <i>Oscillaria malariae</i> , ancienne dénomination de <i>Plasmodium falciparum</i> , d'après les observations de Laveran.....	36
Figure 13. Femelle <i>Anopheles freeborni</i> prenant son repas sanguin sur un humain.....	37
Figure 14. Phases précoces de la transmission vectorielle de <i>Plasmodium spp.</i> à l'hôte consécutivement au repas sanguin de la femelle anophèle	38
Figure 15. Cycle parasitaire de <i>Plasmodium spp</i>	43
Figure 16. Gamétocyte de <i>P. falciparum</i> après coloration d'un frottis sanguin au May-Grünwald-Giemsa	44
Figure 17. Sporozoïte de <i>P. falciparum</i> après coloration d'un frottis sanguin au MGG	45
Figure 18. Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> après coloration d'un frottis sanguin au MGG	46
Figure 19. Schizonte érythrocytaire de <i>P. falciparum</i> après coloration d'un frottis sanguin au MGG.....	46
Figure 20. Représentation schématique des mécanismes d'exportation de l'antigène PfEMP1 de <i>P. falciparum</i>	48
Figure 21. Formules semi-développées de la méfloquine, de la chloroquine, de l'artémisinine et de son dérivé, l'artésunate	52

Figure 22. Moyens possibles pour limiter et contourner l'apparition des chimiorésistances des parasites protozoaires	56
Figure 23. Approche globale appliquée lors du screening de composés actifs	58
Figure 24. Exemple de drug design dans le cas de la recherche d'inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2 (COX2)	59
Figure 25. Principe du screening <i>in vivo</i> proposé pour le processus de découverte de composés antipaludiques.....	64
Figure 26. Caractéristiques morphologiques d' <i>Anogeissus leiocarpus</i>	66
Figure 27. Caractéristiques morphologiques de <i>Fagus sylvatica</i>	68
Figure 28. Caractéristiques morphologiques de <i>Quercus robur</i>	69
Figure 29. Caractéristiques morphologiques d' <i>Alnus glutinosa</i>	71
Figure 30. Caractéristiques morphologiques de <i>Prunus avium</i>	72
Figure 31. Caractéristiques morphologiques d' <i>Acer pseudoplatanus</i>	74
Figure 32. Caractéristiques morphologiques de <i>Fraxinus excelsior</i>	75
Figure 33. Caractéristiques morphologiques de <i>Populus robusta</i>	76
Figure 34. Caractéristiques morphologiques de <i>Larix decidua</i>	78
Figure 35. Caractéristiques morphologiques de <i>Picea abies</i>	79
Figure 36. Caractéristiques morphologiques de <i>Populus tremula</i>	80
Figure 37. Présentation de la Malaria Box	83
Figure 38. Présentation de la Pathogen Box.....	84
Figure 39. Principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge, basé sur le coefficient de distribution (Kd) des solutés à extraire.....	90
Figure 40. Aperçu de l'extracteur FCPE300® utilisé pour l'Extraction de Partage Centrifuge	91
Figure 41. Comparaison des différentes techniques d'extraction	91
Figure 42. Déduction des liaisons et des relations de proximité possibles à partir des données des spectres RMN COSY, HSQC ou HMBC	93
Figure 43. Formule semi-développée du DMSO	94
Figure 44. Observation au microscope optique de cellules Vero infestées par des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> (G : X 40) après coloration à l'éosine et au bleu de méthylène	99
Figure 45. Observation au microscope optique de cellules Vero infestées par des tachyzoïtes de <i>N. caninum</i> (G : X 40) après coloration à l'éosine et au bleu de méthylène.....	99
Figure 46. Observation au microscope optique d'un frottis sanguin d'hématies infestées par des trophozoïtes (« rings ») de <i>P. falciparum</i> après coloration au May-Grünwald-Giemsa	104

Figure 47. Réaction d'oxydoréduction de la résazurine	106
Figure 48. Coloration à la résazurine obtenue après 3 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO ₂	106
Figure 49. Obtention du logarithme de la CC ₅₀ ou de la CI ₅₀ à partir des DO et des droites de régression linéaire.....	107
Figure 50. Plan de plaque utilisé pour la détermination de la CI ₅₀	109
Figure 51. Protocole du dosage immuno-enzymatique ELISA pour <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>	110
Figure 52. Observation au microscope optique de tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> marqués à l'AlexaFluor 488 en train d'envahir des cellules Vero (G : X 40).....	115
Figure 53. Exemple de reconstruction 3D à partir d'observations au microscope confocal de tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> après invasion de la cellule Vero (G : X 63).....	116
Figure 54. Récapitulatif de la méthodologie appliquée pour le criblage des extraits et fractions d' <i>A. leiocarpus</i> sur <i>T. gondii</i> , <i>N. caninum</i> et <i>P. falciparum</i>	124
Figure 55. Récapitulatif de la méthodologie appliquée pour le criblage des extraits et fractions issus des dix arbres de la région Champagne-Ardenne sur <i>T. gondii</i> et <i>N. caninum</i>	125
Figure 56. Méthodologie globale appliquée pour la stratégie de déréplication	129
Figure 57. Cytotoxicité des fractions obtenues par CPC sur cellules Vero après 72 heures d'incubation.....	132
Figure 58. Cytotoxicité des fractions CPC d' <i>A. leiocarpus</i> déterminée par screening sur cellules Vero après 72 heures d'incubation.....	133
Figure 59. Cytotoxicité des cinq fractions CPC d' <i>A. leiocarpus</i> sur cellules Vero après 72 heures d'incubation	134
Figure 60. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> aux fractions obtenues par CPC après 72 heures d'incubation.....	136
Figure 61. Observations au microscope optique de la croissance des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> (souche RH) en présence des extraits et fractions d' <i>A. leiocarpus</i> pendant 72 heures	137
Figure 62. Chimiosensibilité des fractions CPC d' <i>A. leiocarpus</i> déterminée par screening sur des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> après 72 heures d'incubation	139
Figure 63. Chimiosensibilité des fractions CPC d' <i>A. leiocarpus</i> actives sur des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> après 72 heures d'incubation	140
Figure 64. Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> aux fractions obtenues par CPC après 72 heures d'incubation.....	141

Figure 65. Observations au microscope optique de la croissance des tachyzoïtes de <i>N. caninum</i> (souche NC1) en présence des extraits et fractions d' <i>A. leiocarpus</i> pendant 72 heures	142
Figure 66. Chimiosensibilité des fractions CPC d' <i>A. leiocarpus</i> déterminée par screening sur des tachyzoïtes de <i>N. caninum</i> après 72 heures d'incubation	144
Figure 67. Chimiosensibilité de la fraction CPC F7 d' <i>A. leiocarpus</i> sur des tachyzoïtes de <i>N. caninum</i> après 72 heures d'incubation	145
Figure 68. Chimiosensibilité de <i>P. falciparum</i> aux extraits EB99 et EBST issus de l'écorce d' <i>A. leiocarpus</i> après 72 heures d'incubation	146
Figure 69. Observation au microscope optique de tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> , pré-incubés en présence d'EBST ou de TrachE lors de l'invasion de cellules Vero.....	147
Figure 70. Nombre relatif de tachyzoïtes après pré-incubation en présence d'EBST ou de TrachE	148
Figure 71. Observation en microscopie confocale de l'inhibition de l'invasion cellulaire par des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> après traitement à l'EBST et TrachE	149
Figure 72. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin de toxoplasmose aiguë (souche RH)	151
Figure 73. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin de toxoplasmose chronique (souche ME49).....	152
Figure 74. Effet <i>in vivo</i> du DMSO sur <i>T. gondii</i> (souche ME49) dans le cerveau en comparaison à des souris infectées non traitées.....	152
Figure 75. Nombre relatif de parasites détectés dans le cerveau après traitement avec EBST dans un modèle murin de toxoplasmose chronique (souche ME49).....	153
Figure 76. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin immunodéprimé de toxoplasmose aiguë (souche ME49).....	154
Figure 77. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin immunodéprimé de néosporose aiguë (souche NC1)	155
Figure 78. Bilan des résultats de l'étude portant sur l'activité antiparasitaire des extraits et fractions issus de l'écorce d' <i>A. leiocarpus</i>	156
Figure 79. Cytotoxicité des extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne évaluée par screening sur cellules Vero à 100 µg/mL.....	166
Figure 80. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> à des extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne évaluée par screening sur des tachyzoïtes de la souche RH à 100 µg/mL	167
Figure 81. Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> à des extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne évaluée par screening sur des tachyzoïtes de la souche NC1 à 100 µg/mL	168

Figure 82. Cytotoxicité des extraits <i>n</i> -heptane de l’aulne glutineux et du mélèze d’Europe sur cellules Vero après 72 heures d’incubation.....	169
Figure 83. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> à des extraits <i>n</i> -heptane de l’aulne glutineux et du mélèze d’Europe sur des tachyzoïtes de la souche RH après 72 heures d’incubation	170
Figure 84. Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> à l’extrait <i>n</i> -heptane d’aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche NC1 après 72 heures d’incubation	171
Figure 85. Cytotoxicité des fractions des extraits <i>n</i> -heptane et méthanol d’aulne glutineux évaluée par screening sur cellules Vero	172
Figure 86. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> aux fractions des extraits <i>n</i> -heptane et méthanol d’aulne glutineux évaluée par screening	173
Figure 87. Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> aux fractions des extraits <i>n</i> -heptane et méthanol d’aulne glutineux évaluée par screening	174
Figure 88. Cytotoxicité des fractions de l’extrait <i>n</i> -heptane d’aulne glutineux sur cellules Vero après 72 heures d’incubation.....	176
Figure 89. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> aux fractions de l’extrait <i>n</i> -heptane d’aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche RH après 72 heures d’incubation	178
Figure 90. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> aux fractions de l’extrait méthanol d’aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche RH après 72 heures d’incubation	179
Figure 91. Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> aux fractions de l’extrait <i>n</i> -heptane d’aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche NC1 après 72 heures d’incubation	180
Figure 92. Chimiosensibilité de <i>N. caninum</i> aux fractions de l’extrait méthanol d’aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche NC1 après 72 heures d’incubation	181
Figure 93. Identification des différents groupes ou clusters chimiques par RMN sur les fractions de l’extrait <i>n</i> -heptane d’aulne glutineux.....	183
Figure 94. Identification des différents groupes ou clusters chimiques par RMN sur les fractions de l’extrait méthanol d’aulne glutineux.....	184
Figure 95. Bilan des résultats de l’étude portant sur l’activité antiparasitaire des extraits et fractions issus des écorces d’arbres de la région Champagne-Ardenne.....	186
Figure 96. Structures des composés ayant montré une activité antitoxoplasmique sélective	192
Figure 97. Chimiosensibilité de <i>T. gondii</i> aux trois molécules les plus actives de la Pathogen Box après 72 heures d’incubation	193
Figure 98. Fréquence des coefficients de Tanimoto entre les neuf molécules, dont la pyriméthamine, basée sur leur empreinte APfp	194

Figure 99. Mise en évidence les similarités entre les neufs composés, dont la pyriméthamine (PYR), d'après leur coefficient de Tanimoto	194
Figure 100. Observation au microscope optique de la croissance des tachyzoïtes de <i>N. caninum</i> (souche NC1) en présence de la molécule MMV687807 pendant 72 heures	195

Liste des annexes

Annexe 1. Publication portant sur l'activité in vitro et in vivo des extraits et fractions d' <i>A. leiocarpus</i> sur <i>T. gondii</i>	239
Annexe 2. Résultats bruts obtenus pour la détection des parasites dans les cerveaux des souris atteintes de toxoplasmose chronique et de néosporose aiguë par qRT-PCR	258
Annexe 3. Publication portant sur la découverte de nouveaux inhibiteurs de <i>T. gondii</i> grâce à la Pathogen Box	268

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AE	Acide Ellagique
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
APfp	Atom Pair fingerprints
ARN	Acide RiboNucléique
ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumine
CC ₅₀	Concentration Cytotoxique à 50%
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDC	Center for Disease Control and prevention
cGMP	cyclic Guanosine MonoPhosphate
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COSY	CORrelation SpectroscopY
COX2	Cyclo-OXYgénase 2
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
CQ	ChloroQuine
CRB	Centre de Ressources Biologique
CSP1	Circum Sporozoite Protein 1
Ct	Cycle threshold
CTFT	Centre Technique Forestier Tropical
DEM	Dérivés Ellagiques Méthylés
DHFR	DiHydroFolate Réductase
DHFR-TS	DiHydroFolate Réductase-Thymidylate Synthase
DHFS	DiHydroFolate Synthase
DHPS	DiHydroPtéroate Synthase
DL	Dose Létale
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DO	Densité Optique
EB99	Extrait Brut éthanol 99%
EBST	Extrait Brut Sans Tanin

EDTA	Ethylène Diamine TetraAcétique
EFS	Etablissement Français du Sang
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMP1	Erythrocyte Membrane Protein 1
EPC	Extracteur de Partage Centrifuge
FCPE	Fast Centrifugal Partition Extractor
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GRA	Protéines des Granules denses
GSK	Glaxo Smith Kline
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRP	HorseRadish Peroxidase
HRP2	Histidine Rich Protein 2
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
ICMR	Institut de Chimie Moléculaire de Reims
Ig	ImmunoGlobuline
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPPTS	Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg
IS	Indice de Sélectivité
Kd	Coefficient de partage
Ln	Logarithme népérien
MCM	Milieu de Culture Malaria
MetOH	Méthanol
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MIC	Protéines des Micronèmes
MMV	Medicines for Malaria Venture
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5
MSP	Merozoite Surface Protein
MTBE	Méthyl <i>Tert</i> -Butyl Ether
MTT	3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphénylTetrazolium bromide
NAD ⁺	oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	O-Phénylènediamine Dihydrochloride
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PICT	Plate-forme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire
pLDH	parasite Lactate DeHydrogenase
PRBI	Plateforme Régionale de Biologie Innovante
PSMII	Poste de Sécurité Microbiologique II
PYR	Pyriméthamine
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RON	Rhoptry Neck protein
ROP	Rhoptry bulb Protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SAG	Surface AntiGen
SAGM	Saline Adenine Glucose Medium
SATT	Société d'Accélération du Transfert de Technologie
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Séricoside
SIDA	Syndrome De l'Immunodéficience Acquise
SRS	SAG1-Related Sequence
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T+F	Trachélospérogénine E + Flavonoïdes
Tan	Tanins
Tc	Tanimoto coefficient
TDR	Tests de Diagnostic Rapide
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
ToxoDB	<i>Toxoplasma</i> DataBase
TrachE	Trachélospérogénine E
UV	UltraViolet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP	Vacuole Parasitophore
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Liste des publications et des communications

Publications scientifiques de thèse

Spalenka J., Escotte-Binet S., Bakiri A., Hubert J., Renault JH., Velard F., Duchateau S., Aubert D., Huguenin A., Villena I.

Discovery of new inhibitors of Toxoplasma gondii via the Pathogen Box.

Accepté dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018.

Spalenka J., Hubert J., Aubert D., Escotte-Binet S., Borie N., Velard F., Villena I., Renault JH.
In vitro and in vivo activity of Anogeissus leiocarpus and isolated metabolites against Toxoplasma gondii.

Soumis au journal *Experimental Parasitology*, 2018.

Communications orales

Spalenka J., Escotte-Binet S., Duchateau S., Velard F., Hubert J., Renault JH., Villena I., Aubert D.

Mise au point d'un outil de criblage de composés à potentiel antiparasitaire : application à la Pathogen Box.

Journée annuelle des Jeunes Chercheurs, UFR Médecine, Reims, France. 31 mars 2017.

Spalenka J., Escotte-Binet S., Duchateau S., Velard F., Hubert J., Renault JH., Villena I., Aubert D.

Découverte de nouveaux composés antiparasitaires grâce à la Pathogen Box.

7^{èmes} journées du Consortium Anti-Parasitaire et Anti-Fongique (CaPF), Campus de Médecine, Strasbourg, France. 11 et 12 mai 2017.

Liste des formations suivies

Janvier 2015 :

- Bonnes pratiques de laboratoire (Université de Reims Champagne-Ardenne).
- Prévention risque et sécurité (Université de Reims Champagne-Ardenne).

Mars 2015 :

- Méthodologie de la Recherche (Université de Reims Champagne-Ardenne).
- Rédaction en anglais – Sciences Techniques et Santé (Université de Reims Champagne-Ardenne).

Novembre 2015 :

- Formation à la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* (Université de Strasbourg).

Décembre 2015 :

- Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale – Parcours Conception (Université de Reims Champagne-Ardenne).

Janvier 2016 :

- Pédagogie dans l'Enseignement Supérieur et mise en pratique (Université de Reims Champagne-Ardenne).

Janvier – Avril 2016 :

- Entraînement à la conversation en anglais – niveau avancé (B2 et plus) (Université de Reims Champagne-Ardenne).

Janvier – Avril 2017 :

- Entraînement à la conversation en anglais – niveau avancé (B2 et plus) (Université de Reims Champagne-Ardenne).

INTRODUCTION

Contexte scientifique et présentation de l'étude

La toxoplasmose est une maladie ubiquitaire d'origine parasitaire due à un protozoaire très répandu, *Toxoplasma gondii*. C'est l'une des infections parasitaires les plus courantes, généralement bénigne chez les individus immunocompétents. Néanmoins, la gravité de cette pathologie est liée, d'une part, au risque de transmission fœtale du parasite lors de la primo-infection de la mère au cours de la grossesse (toxoplasmose congénitale), et, d'autre part, à la réactivation d'une infection antérieure du parasite aboutissant à une toxoplasmose cérébrale ou généralisée chez les patients immunodéprimés. *T. gondii* envahit les cellules-hôtes par une pénétration active qui aboutit à la formation d'une vacuole parasitophore au sein de laquelle le parasite se multiplie rapidement. Cela va provoquer l'éclatement des cellules-hôtes et permettre ainsi aux parasites d'envahir les cellules voisines. Les thérapies mises en jeu pour contrer cette pathologie restent toutefois limitées, offrant une efficacité relative puisque les formes kystiques du parasite sont insensibles aux traitements *in vivo*.

La néosporose est également une maladie ubiquitaire d'origine parasitaire due à un protozoaire, *Neospora caninum*. A l'inverse de la toxoplasmose, il s'agit d'une maladie exclusivement vétérinaire. Elle est responsable d'avortements chez les chiens, les ovins, mais aussi et surtout chez les bovins. L'impact économique consécutif à ces avortements est d'autant plus important que le parasite peut persister chez les animaux n'ayant pas été avortés, perpétuant ainsi la contamination au sein d'un élevage. *N. caninum* est très proche de *T. gondii* d'un point de vue phylogénétique (Ellis et al., 1994). Ainsi, de la même façon que pour ce dernier, l'invasion des cellules-hôtes par *N. caninum* est un processus actif aboutissant à la formation d'une vacuole parasitophore où les parasites vont se multiplier rapidement avant d'éclater la cellule-hôte et envahir les cellules adjacentes. Les traitements utilisés sont peu nombreux et partiellement efficaces.

Tout comme les deux pathologies citées précédemment, le paludisme est une maladie due à un parasite protozoaire apicomplexe du genre *Plasmodium*, qui comporte cinq espèces pathogènes pour l'Homme, et dont la forme la plus grave est provoquée par *Plasmodium falciparum*. Cette maladie humaine est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Transmis par un moustique du genre *Anopheles*, le paludisme est présent en Amérique du Sud, en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud. Les traitements mis en jeu contre ce parasite sont

peu nombreux et peu accessibles aux populations touchées. Ces problèmes sont d'autant plus importants que *P. falciparum* est capable de développer des chimiorésistances, rendant un certain nombre de traitements inefficaces. La lutte antipaludique repose principalement sur des traitements prophylactiques et des répulsifs anti-moustiques.

Les traitements contre ces trois infections parasitaires ont consisté notamment en l'association d'un sulfamide et de pyriméthamine. Ces molécules agissent en synergie afin de bloquer la voie de synthèse des folates en inhibant respectivement deux enzymes parasitaires : la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR). L'inhibition de ces deux enzymes entraîne ainsi l'arrêt de la réplication du parasite. Néanmoins, aucun des traitements actuels utilisés contre la toxoplasmose, la néosporose ou le paludisme n'est exempt d'échecs thérapeutiques. En effet, un certain nombre de ces échecs ont été rapportés chez *T. gondii* (Baatz et al., 2006; Dannemann et al., 1992; Derouin, 2001), *N. caninum* (Lindsay and Dubey, 1990) et *P. falciparum* (Sahr et al., 2001). De plus, il a été démontré que des résistances médicamenteuses peuvent se développer chez ces parasites (Doliwa et al., 2013; Lindsay et al., 1996; Mita and Tanabe, 2012; Reynolds et al., 2001) et qu'il existe également une variabilité de la susceptibilité vis-à-vis des traitements antiparasitaires (Meneceur et al., 2008; Webster et al., 1985). Il est également important de noter que ces traitements présentent souvent des effets secondaires relativement importants (Dujovne et al., 1967; Weinke et al., 1991).

Le faible nombre de molécules actives et utilisables *in vivo* ainsi que la possibilité de voir se développer un mécanisme de résistance chez le parasite obligent donc les scientifiques à rechercher de nouvelles molécules actives, qu'elles soient issues de synthèse chimique ou de substances naturelles. Parmi celles-ci, notre étude s'est focalisée, en partie, sur *Anogeissus leiocarpus*, un arbre très présent en Afrique de l'ouest et communément appelé le « bouleau d'Afrique ». Il est utilisé en médecine traditionnelle africaine pour soigner la fièvre, la toux, les rhumatismes, les maladies de peau, mais aussi pour traiter certaines maladies dues à des parasites protozoaires telles que le paludisme et la maladie du sommeil. D'autres arbres de la région Champagne-Ardenne ont également été testés dans le cadre de ce travail de thèse pour leurs potentielles activités antiparasitaires, le but étant d'explorer de nouvelles pistes de valorisation des sous-produits de la filière bois. Nous avons également testé un ensemble de 400 composés de synthèse issus de la Pathogen Box. L'ensemble de ces expérimentations, initialement testées sur *Toxoplasma gondii* puis étendues à *Neospora caninum* et, dans une

moindre partie, à *Plasmodium falciparum*, a eu pour objectif final d'aboutir à la mise en place d'une unité de criblage antiparasitaire de substances naturelles ou synthétiques.

Le manuscrit est organisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre est une introduction présentant : i) les maladies et leurs agents pathogènes respectifs, avec leurs traitements et les phénomènes de résistance à ceux-ci, ii) les méthodes de screening des activités antiparasitaires, iii) les ressources naturelles étudiées dans cette thèse, avec les différents arbres sélectionnés pour cette étude et leur possible utilisation d'un point de vue médical, iv) la Pathogen Box fournie par la fondation Medicines for Malaria Venture.

Le second chapitre concerne la présentation des matériels et méthodes, avec un détail des souches parasitaires utilisées et des techniques employées.

Le troisième chapitre se focalise sur la présentation des résultats obtenus au cours de ces travaux et de leur discussion. Il est découpé en trois parties.

La première partie se focalise sur l'étude de la chimiosensibilité de *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum* à différents extraits provenant d'*A. leiocarpus* ainsi que l'aspect mécanistique mis en jeu lors de l'effet antitoxoplasmique observé pour les extraits les plus efficaces. La seconde partie s'attarde sur la chimiosensibilité de *T. gondii* et *N. caninum* vis-à-vis d'extraits d'écorces d'arbres provenant de la région Champagne-Ardenne. La troisième et dernière partie, quant à elle, porte sur le criblage de la Pathogen Box sur *T. gondii* et *N. caninum* et la découverte de composés efficaces.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre présente une conclusion générale de l'ensemble des travaux. Des perspectives sont proposées en dernier lieu pour approfondir ces travaux de thèse.

i) Les maladies, agents pathogènes, traitements et phénomènes de résistance

La toxoplasmose et *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite dont l'agent pathogène est *Toxoplasma gondii*, un parasite protozoaire ubiquiste. C'est l'une des infections parasitaires les plus répandues. En effet, plus d'un tiers de la population mondiale serait exposée au parasite (Montoya and Liesenfeld, 2004). En France, il apparaît que moins de la moitié de la population française est infectée (Fromont et al., 2009; Villena et al., 2010), et les modèles de prédiction confortent la diminution de la séroprévalence d'ici à 2020 (Nogareda et al., 2014). La séroprévalence semble d'ailleurs être corrélée à l'hygiène de vie et aux habitudes alimentaires de la population (Montoya and Liesenfeld, 2004).

La contamination humaine s'effectue principalement par l'alimentation *via* l'ingestion de kystes présents dans les viandes crues ou pas assez cuites (Choi et al., 1997; Dubey and Beattie, 1988). Elle peut également se faire *via* l'ingestion d'oocystes sporulés présents dans les aliments souillés par des fèces de chat contaminé (Jones and Dubey, 2010) ou encore dans l'eau (Bowie et al., 1997; de Moura et al., 2006). Dans une moindre mesure, il est possible que la transmission parasitaire de la forme tachyzoïte ait lieu *in utero* (Montoya and Remington, 2008) ou par greffe d'organe (Derouin et al., 2008). Des cas plus exceptionnels, des contaminations peuvent avoir lieu lors de transfusion sanguine (Singh and Sehgal, 2010) ou par inoculation accidentelle au laboratoire (Herwaldt, 2001).

I. Les formes cliniques de la toxoplasmose

Il existe trois formes cliniques principales décrites : la toxoplasmose acquise de l'individu immunocompétent, la toxoplasmose congénitale et la toxoplasmose de l'individu immunodéficient.

1) La toxoplasmose acquise de l'individu immunocompétent

La toxoplasmose acquise est asymptomatique dans près de 80 % des cas chez les individus immunocompétents. Lorsqu'elle est symptomatique, elle est le plus souvent bénigne, avec des

signes cliniques de type adénopathie, fièvre et asthénie. Ces formes ganglionnaires guérissent spontanément, sans traitement. Exceptionnellement, des atteintes viscérales sévères sont possibles. Le diagnostic de cette pathologie repose sur la mise en évidence d'une séroconversion toxoplasmique.

2) La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale résulte du passage transplacentaire des parasites présents dans le sang maternel lorsqu'une mère non immunisée antérieurement subit une primo-infection pendant sa grossesse. Le fœtus n'étant pas mature d'un point de vue immunologique, la propagation du parasite n'est pas contrôlée par le système immunitaire de celui-ci. Plus la mère est infectée tôt au cours de sa grossesse, plus les séquelles peuvent être sévères pour le fœtus, et inversement (Desmots and Couvreur, 1974a; Montoya and Liesenfeld, 2004).

L'une des pathologies les plus courantes pour le fœtus, consécutivement à l'infection par *T. gondii*, est une encéphalomyélite. Les conséquences peuvent aller de la mortalité néonatale à l'avortement. Dans d'autres cas, le bébé développe des retards mentaux progressifs et d'autres déficiences neurologiques (retard psychomoteur, convulsions...). Dans le cas d'une transmission materno-fœtale tardive au cours de la grossesse, les conséquences pour le fœtus sont moins sévères. Il risque néanmoins de développer des lésions oculaires au cours de son enfance ou pendant l'adolescence, telles qu'une rétinoblastome pouvant aboutir à une diminution de la vision, voire à la cécité.

La toxoplasmose congénitale représente 2 à 3 séroconversions pour 1000 en France (Berger et al., 2009), ce qui correspond à environ 300 naissances par an en 2007 (Villena et al., 2010). La meilleure lutte contre la toxoplasmose congénitale consiste donc en la prévention. Celle-ci a été mise en place en France à partir de 1978. Elle repose sur le contrôle du statut immunitaire de toute femme enceinte vis-à-vis de la toxoplasmose. En cas de séronégativité, une surveillance sérologique est effectuée, d'après le décret de 1992. Si une séroconversion maternelle a lieu, la datation de l'infection conduira à la proposition d'un diagnostic anténatal permettant, en cas de test positif, de traiter l'enfant *in utero* (McLeod et al., 2006; Villena et al., 1998). Toutes ces dispositions prises pour le dépistage et la prise en charge précoce de la maladie ont permis de réduire de façon significative la gravité des lésions engendrées chez

l'enfant. Cependant, elles n'ont pas permis de diminuer drastiquement le nombre d'infections diagnostiquées au cours de la grossesse.

3) La toxoplasmose de l'individu immunodéficient

La toxoplasmose de l'individu immunodéficient a deux origines distinctes. Elle peut résulter soit d'une primo-infection, soit d'une réactivation à partir des kystes présents chez un individu déjà infecté. Les personnes concernées par cette toxoplasmose sont des sujets présentant une immunodéficiences sévère pouvant être liée au SIDA, à une greffe (greffe d'organe, allogreffe de moelle osseuse) ou à une chimiothérapie.

La réactivation parasitaire se traduit par une transformation des bradyzoïtes présents dans les kystes en tachyzoïtes, consécutivement à l'immunodéficiences cellulaire. Ces derniers vont ensuite se multiplier et se disséminer dans l'organisme. L'atteinte cérébrale la plus fréquente est l'encéphalite, pouvant être mortelle si elle n'est pas prise en charge rapidement. Environ 95% des encéphalites toxoplasmiques sont provoquées par la réactivation parasitaire (Luft and Remington, 1992).

L'infection toxoplasmique est particulièrement grave chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficiences Humaine (VIH) et dont l'immunodéficiences est avancée. En fonction du pays concerné, environ 12 à 47% des personnes infectées à la fois par ce virus et par *T. gondii* sont sujettes à une réactivation parasitaire en l'absence d'un traitement prophylactique efficace (Kasper and Buzoni-Gatel, 1998; Luft and Remington, 1992). En France, au début des années 2000, environ 200 cas de toxoplasmose chez des patients atteints du VIH apparaissaient chaque année. Ce nombre a fortement diminué depuis l'utilisation des trithérapies (Afssa, 2005). Au cours d'une greffe d'organe ou de moelle osseuse, le patient receveur est soumis à un traitement immunosuppresseur pour éviter les rejets ou à une irradiation avant la greffe de moelle. Il est alors susceptible de développer une toxoplasmose lorsque le greffon provient d'un donneur déjà infecté (Hill and Dubey, 2002).

II. *Toxoplasma gondii*

1) Découverte du parasite

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire responsable de la toxoplasmose. Ce protozoaire a été décrit pour la première fois en 1908 par Charles Nicolle et Louis Herbert Manceaux, deux médecins français à l'Institut Pasteur de Tunis. Cette découverte eut lieu après qu'une épidémie d'origine inconnue toucha des rongeurs de laboratoire *Ctenodactylus gundi* (Nicolle and Manceaux, 1908). Ils isolèrent ainsi un protozoaire de forme arquée, qu'ils nommèrent *Toxoplasma gondii*. Son étymologie provient du grec *toxon* (arc) et *plasma* (forme), ainsi qu'au rongeur chez lequel il a été découvert. La même année, le parasite est également décrit au Brésil chez le lapin (Splendore, 1908).

La première description d'un cas de chorioretinite induite par la toxoplasmose chez un enfant n'a lieu que quinze ans plus tard, en 1923 (Janku, 1923). En 1939, Wolf, Cowen et Paige sont les premiers à identifier *T. gondii* comme étant responsable d'une encéphalite chez l'Homme (Wolf et al., 1939). Le premier test immunologique, le dye test, a été mis au point en 1949 par Sabin et Feldman (Sabin and Feldman, 1948). Il a ainsi permis d'évaluer l'importance de la prévalence de la toxoplasmose humaine, et donc mis en évidence la dispersion de cette maladie au sein de la population mondiale. En 1974, et après une étude sur 15 ans, Desmonts parvient à la conclusion que le parasite ne se transmet pas de la mère au fœtus si la mère est infectée avant sa grossesse et que les conséquences sur le fœtus sont d'autant plus graves que l'infection est précoce lors de la grossesse (Desmonts and Couvreur, 1974b). Au cours de cette étude, en 1965, il découvre également que la viande insuffisamment cuite est responsable de la contamination humaine par le parasite (Desmonts et al., 1965). Le rôle des félinidés dans la transmission des parasites *via* les fèces est mis en évidence en 1969 (Kühn and Weiland, 1969), expliquant ainsi l'origine de la contamination des herbivores. Le cycle du parasite est finalement décrit dans sa globalité par Hutchison (Hutchison et al., 1969) et Frenkel (Frenkel et al., 1970).

T. gondii appartient au phylum des Apicomplexa et à l'ordre des Eucoccidiorida. Le genre *Toxoplasma* ne comprend actuellement qu'une seule espèce, *Toxoplasma gondii*, au sein de laquelle se trouvent de nombreuses souches regroupées en lignées clonales (Dardé, 2004; Su et al., 2012).

2) Les stades parasitaires

Au cours de son cycle, *T. gondii* se présente sous trois stades infectieux : le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte.

a. Le tachyzoïte

Le tachyzoïte, du grec *tachy* signifiant « rapide », est la forme proliférative dont la multiplication intracellulaire obligatoire a lieu lors de la phase active de l'infection. Il s'agit d'une cellule de forme arquée, d'environ 8 µm de long et 3 µm de large. Son extrémité antérieure est effilée tandis que son extrémité postérieure est plus large et arrondie. Comme pour tous les Apicomplexa, *T. gondii* présente un complexe apical dans son extrémité antérieure. Ce complexe comprend un conoïde, qui participe à la mobilité du parasite et à la pénétration des cellules, des rhoptries, des micronèmes et des granules denses (Dubey et al., 1998a). L'apicoplaste est une autre structure caractéristique des Apicomplexa. C'est un plastide contenant une molécule d'ADN circulaire de 35 kb. Il dériverait d'un chloroplaste ancestral suite à une endosymbiose d'une algue rouge par une cellule eucaryote (Lim and McFadden, 2010). Bien que son rôle ne soit pas encore clairement établi, il pourrait être une cible de choix dans de futurs programmes thérapeutiques (Bowman et al., 2014). Le tachyzoïte est également caractérisé par trois membranes superposées formant un complexe membranaire, un noyau, une unique mitochondrie, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi. L'ultrastructure schématisée du tachyzoïte est présentée dans la **Figure 1**.

Le tachyzoïte est capable d'envahir tout type de cellule nucléée (Dubey and Beattie, 1988). La pénétration de la cellule-hôte par le parasite est un processus rapide, de l'ordre de 30 à 60 secondes (Black and Boothroyd, 2000). Il s'internalise dans la cellule-hôte en s'entourant d'une vacuole parasitophore au sein de laquelle il se multiplie par endodyogénie. Il s'agit d'une multiplication intracellulaire asexuée au cours de laquelle deux cellules-filles sont issues d'une même cellule-mère. Le « tachyzoïte-fils » se multiplie à l'intérieur de la membrane du « tachyzoïte-père » pour former des rosettes, aboutissant par la suite à l'éclatement de la cellule-hôte. Celle-ci meurt, ce qui permet aux parasites qui s'y sont multipliés d'envahir rapidement les cellules voisines. Selon la souche de *T. gondii* et le type de cellule envahie, le taux d'invasion peut varier (Appleford and Smith, 1997; Kaufman et al., 1958). La forme tachyzoïte est très fragile dans le milieu extérieur. C'est cette forme qui est utilisée dans les tests de chimiosensibilité.

Lorsque, chez l'individu immunocompétent, l'immunité spécifique s'installe, il y a interconversion de la forme tachyzoïte en forme bradyzoïte (du grec *brady*, signifiant « lent ») (Weiss and Kim, 2000).

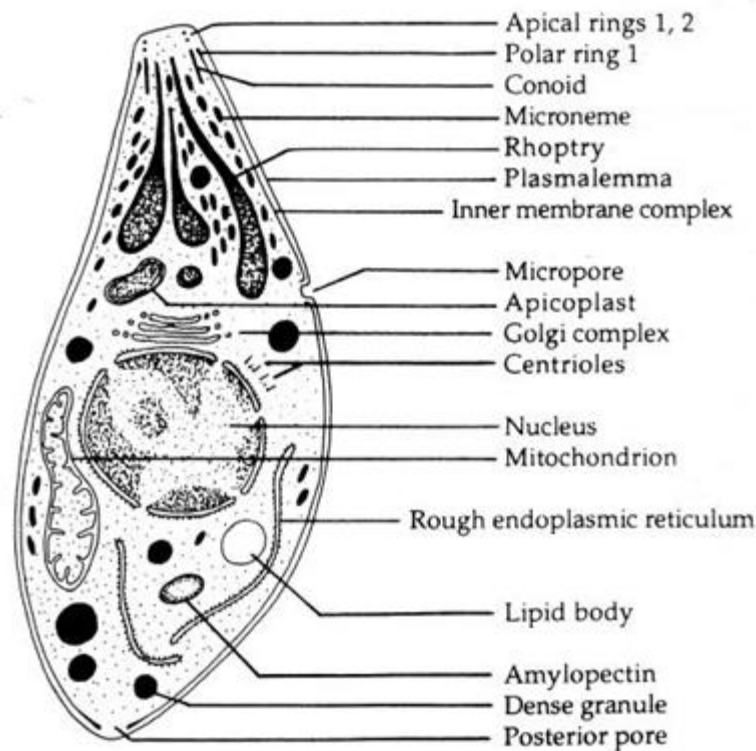


Figure 1. Ultrastructure d'un tachyzoïte de *T. gondii* (d'après Dubey et al., 1998a).

b. Le bradyzoïte

Le bradyzoïte est une forme de latence et de résistance intracellulaire lors de l'évolution de l'infection dans l'organisme. Sa morphologie est très proche de celle de la forme tachyzoïte, malgré quelques différences. En effet, le bradyzoïte présente un plus grand nombre de micronèmes et de grains d'amylopectine, en plus d'un épaissement de la membrane et de la matrice de la vacuole parasitophore. Cette transformation aboutit à la formation du kyste toxoplasmique. Celui-ci mesure entre 10 et 200 μm et est une forme de résistance et de dissémination pouvant contenir jusqu'à un millier de bradyzoïtes. Leur métabolisme est adapté à une vie quiescente (Sullivan and Jeffers, 2012). La transformation du tachyzoïte en bradyzoïte et la formation du kyste à partir de la vacuole parasitophore a lieu entre 4 et 6 jours post-infection *in vitro* (Salimi et al., 2016; Weiss and Kim, 2000) et au moins 14 jours post-infection *in vivo* dans un modèle murin (Di Cristina et al., 2008). Les kystes persistent préférentiellement dans les tissus pauvres en immunoglobulines tels que le système nerveux central, les muscles, l'œil et les viscères. Leur éclatement est responsable de l'entretien de l'immunité protectrice

chez les individus immunocompétents. L'ultrastructure schématisée du bradyzoïte est présentée en **Figure 2**.

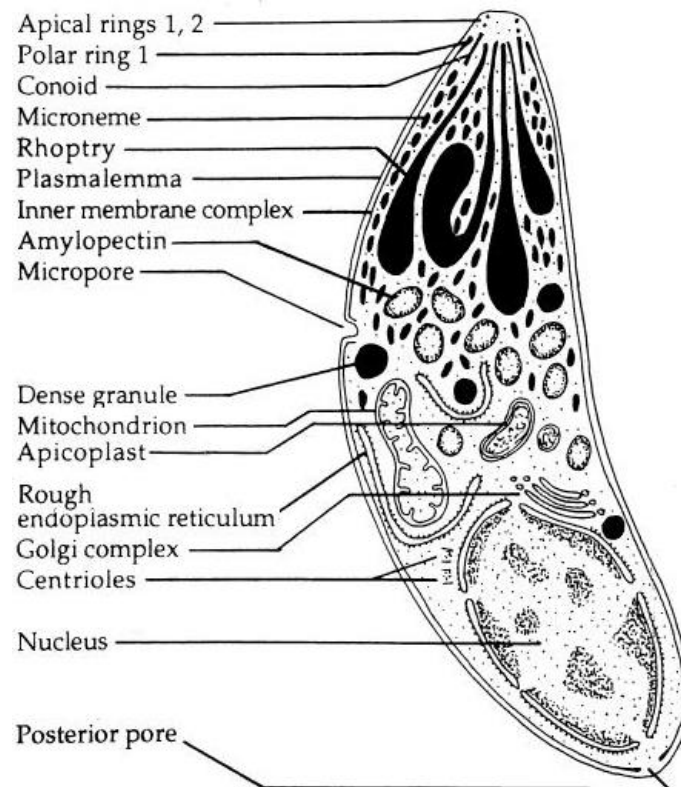


Figure 2. Ultrastructure d'un bradyzoïte de *T. gondii* (d'après Dubey et al., 1998a).

c. Le sporozoïte

Les sporozoïtes se retrouvent au nombre de huit dans un oocyste sporulé. Les oocystes sont formés lors de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, un félin. Au moment de la phase aiguë de l'infection, des centaines de milliers d'oocystes non sporulés sont émis dans les fèces de l'animal. Les oocystes contiennent alors une masse unique nommée sporoblaste. Après sporulation dans le milieu extérieur se forment deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes (**Figure 3**). Ils sont peu différents des autres stades infectants en microscopie électronique.

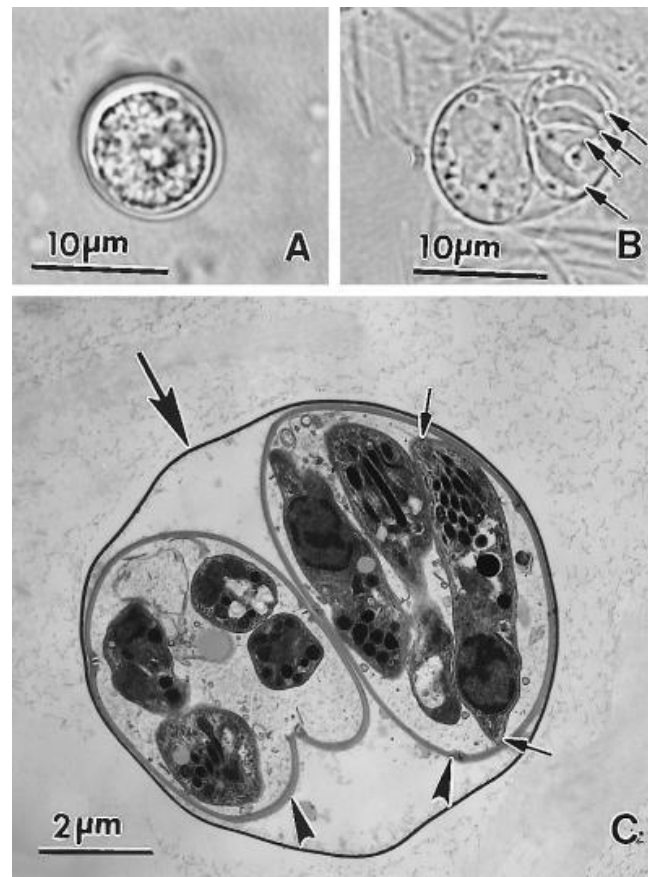


Figure 3. Oocyste et sporozoïtes de *T. gondii* (Dubey et al., 1998a). (A) Oocyste non sporulé. (B) Oocyste sporulé contenant deux sporocystes qui renferment chacun quatre sporozoïtes (flèches). (C) Oocyste sporulé observé en microscopie électronique.

3) Le cycle parasitaire de *T. gondii*

Le cycle parasitaire de *T. gondii* (Hunter and Sibley, 2012) est divisé en deux phases distinctes (**Figure 4**). La première est une phase de reproduction sexuée se déroulant exclusivement chez l'hôte définitif, un félin. La seconde phase est une phase asexuée qui a lieu chez les hôtes intermédiaires, les animaux à sang chaud.

a. La phase sexuée : gamétogonie

La gamétogonie se déroule exclusivement dans le système digestif de l'hôte définitif lorsque celui-ci s'infeste en ingérant des kystes contenus dans les tissus de ses proies, telles que des petits rongeurs ou des oiseaux. Les parasites quiescents contenus dans ces kystes sont libérés et pénètrent les cellules de l'épithélium intestinal. Ils s'y multiplient de façon active par endodyogonie avant de se différencier en gamétocytes mâles et femelles. La formation d'oocystes non sporulés, et donc non infectieux, résulte de la fécondation des formes sexuées. Ces oocystes vont par la suite être excrétés par millions dans les fèces des félinés environ 3 à 5

jours après infection *via* ingestion des kystes, pendant 7 à 15 jours (Dubey et al., 1970). Une fois excrétés dans le milieu extérieur, les oocystes deviennent infectieux en 1 à 5 jours en fonction des paramètres environnementaux tels que la température et l'hygrométrie. L'acquisition de l'infectiosité se fait par un processus de maturation appelé sporogonie, aboutissant à la formation des sporozoïtes. Les oocystes sporulés peuvent ainsi rester quiescents pendant plus d'un an dans le sol avant d'infester un nouvel hôte intermédiaire ou définitif.

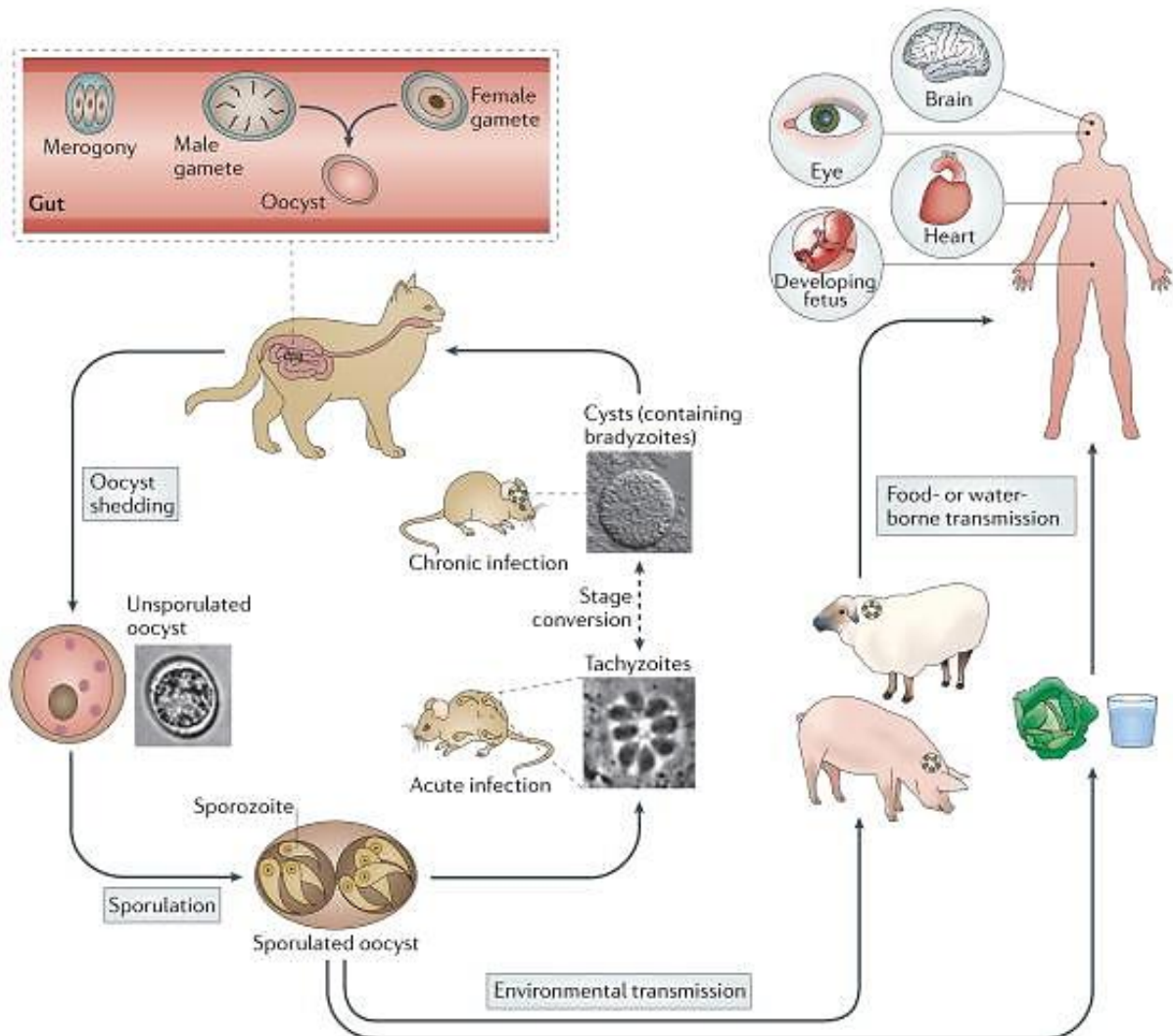


Figure 4. Cycle parasitaire de *T. gondii* (Hunter and Sibley, 2012).

La viabilité des oocystes est assurée par les félinés puisque ceux-ci ont l'habitude d'enterrer leurs fèces, limitant leur dessiccation dans le sol. L'excrétion des oocystes a lieu pendant une durée limitée après l'infection du féliné, mais les ré-excrétions d'oocystes restent toutefois rares (Dubey, 1995).

b. La phase asexuée : schizogonie

La schizogonie a lieu chez l'hôte définitif. Dans le cas des omnivores et des carnivores, la contamination se fait *via* ingestion de kystes présents dans les tissus des proies que constituent d'autres hôtes intermédiaires. Lorsque ces kystes se rompent, la multiplication active des tachyzoïtes permet la dissémination du parasite dans tout l'organisme. Ceux-ci vont ensuite s'enkyster dans les tissus dont l'immunité est faible, tels que les muscles, les viscères, l'œil et le système nerveux central.

Dans le cas des omnivores et des herbivores, la contamination peut être due à l'ingestion d'oocystes sporulés dont la paroi se rompt dans l'intestin. Les sporozoïtes ainsi libérés pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin avant de se transformer en tachyzoïtes. A l'issue d'une brève parasitémie de l'ordre de quelques jours, les parasites s'enkystent dans les tissus de l'hôte. Ils entrent ensuite à l'état quiescent pendant toute la vie de l'hôte.

Cette parasitémie peut aboutir à une transmission directe de tachyzoïtes, notamment lors du passage transplacentaire de la mère au fœtus au cours de la grossesse. Une transmission directe de tachyzoïtes peut également être possible, mais exceptionnelle, au cours d'une transfusion sanguine ou consécutivement à un accident de laboratoire.

4) Les différentes souches de *T. gondii*

Le genre *Toxoplasma gondii* n'est constitué que d'une seule espèce dont les différences intraspécifiques sont significatives. La classification actuelle des souches est basée sur la virulence chez la souris et la variabilité de marqueurs génétiques spécifiques.

Initialement, les premières études sur les souches de *T. gondii* s'attardaient sur les comportements, relativement similaires, de celles-ci (Ferguson and Hutchison, 1981). A l'heure actuelle, ces études se basent sur les caractéristiques phénotypiques et génotypiques (Lehmann et al., 2000). Ainsi, trois génotypes principaux (I, II et III) ont été identifiés, chacun montrant une virulence variable sur la souris. Aujourd'hui, le genre *Toxoplasma gondii* est découpé en six clades majeurs, regroupant 16 haplogroupes (Behnke et al., 2016). Historiquement, les souches étaient réparties en trois lignées clonales, ou génotypes, auxquelles ont été ajoutées des souches atypiques.

a. Type I

Les souches de génotype I sont des souches virulentes non kystogènes qui induisent une toxoplasmose aiguë et la mort des souris en moins de 10 jours (Howe et al., 1996). La dose

létale 100% (DL_{100}) est à 1 tachyzoïte ($DL_{100} = 1$), ce qui signifie que l'inoculation d'un seul tachyzoïte d'une de ces souches entraîne une mortalité de 100% des souris. Les tachyzoïtes ont une capacité de réplication très rapide et disséminent rapidement dans l'organisme (Hitziger et al., 2005). L'une des souches de type I de référence est la souche RH, isolée en 1939 et largement utilisée dans les laboratoires depuis. C'est cette souche qui sera utilisée dans le modèle *in vivo* de toxoplasmose aiguë chez la souris.

b. Type II

Les souches de génotype II sont des souches kystogènes non virulentes qui provoquent une toxoplasmose chronique asymptomatique. Les souris survivent avec persistance de kystes dans le cerveau. Ces souches ont la particularité de se multiplier plus lentement *in vitro* (Radke et al., 2001) et peuvent présenter des différences phénotypiques entre elles (Brenier-Pinchart et al., 2010). La DL_{50} est supérieure à 1000 tachyzoïtes. La souche ME49 sera utilisée dans le modèle *in vivo* de toxoplasmose chronique chez la souris.

c. Type III

Les souches de génotype III sont des souches non virulentes dont la pathogénicité est intermédiaire. Par conséquent, elles peuvent provoquer une toxoplasmose subaiguë aboutissant à des conséquences neurologiques telles qu'une encéphalite. Certaines souris meurent prématurément au bout de 2 semaines tandis que d'autres meurent au bout de 3 à 6 mois. La DL_{50} est supérieure à 1000 tachyzoïtes.

5) Les protéines de *T. gondii*

T. gondii, comme d'autres organismes unicellulaires, est composé d'une multitude d'antigènes immunogènes, membranaires ou cytoplasmiques ou faisant partie des composants structuraux. La composition de la surface du parasite est modulée de manière importante au cours de l'interconversion bradyzoïtes/tachyzoïtes. De par sa multiplication rapide, le tachyzoïte est responsable de la dissémination et de complications cliniques lors de la primo-infection ou lors des réactivations, contrairement au bradyzoïte qui se multiplie lentement et ne cause pas de dommage tissulaire significatif. Les molécules exprimées à un stade spécifique semblent contrôler les différences phénotypiques entre tachyzoïtes et bradyzoïtes. On distingue les protéines de surface et les protéines contenues dans les organelles sécrétoires du parasite (micronèmes, rhoptries et granules denses). Certaines de ces protéines peuvent être communes

à plusieurs stades évolutifs. Les trois types de protéines décrits ci-dessous sont très conservés chez les parasites appartenant au phylum des Apicomplexa.

a. Les protéines de surface SAG

La membrane plasmique du parasite est recouverte de nombreuses protéines. Ces protéines sont d'une grande variété et regroupent la superfamille des SRS (SAG1-related sequence) (Jung et al., 2004). Les SRS sont des protéines de surface divisées en deux sous familles dont les membres prototypes sont SAG1 et SAG2A, respectivement (Cesbron-Delauw et al., 1994). Elles sont ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Manger et al., 1998). Plusieurs études ont montré le rôle des protéines SAG, notamment de SAG1, dans l'attachement du tachyzoïte à la cellule-hôte lors de l'invasion (Mineo and Kasper, 1994; Robinson et al., 2004). Le traitement des parasites avec des anticorps dirigés contre SAG1 inhibe la fixation du parasite à la cellule-hôte de 71% (Mineo and Kasper, 1994). Les protéines SAG ne sont pas exprimées à tous les stades parasitaires. Ainsi, les protéines SAG1 et SAG2A ne sont exprimées qu'au stade tachyzoïte (Kasper and Ware, 1985) alors que SAG3, dont la séquence d'acides aminés est très proche de celle de SAG1 (Cesbron-Delauw et al., 1994), est aussi exprimée au stade bradyzoïte (Tomavo et al., 1991). La protéine majeure de surface SAG1 est la cible de la révélation enzymatique ELISA dans nos tests de chimiosensibilité.

b. Les protéines des organelles sécrétoires

T. gondii possède trois organelles sécrétoires essentielles à l'invasion de la cellule-hôte et à la formation de la vacuole parasitophore : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. La répartition de ces organelles est présentée dans la **Figure 5**, d'après les travaux de Paredes-Santos (Paredes-Santos et al., 2012).

i. Les protéines des micronèmes (MIC)

Les micronèmes sont localisés au pôle apical du parasite. Ces organites ont une forme allongée et sont orientés selon l'axe principal du parasite au niveau apical et à la périphérie du parasite. Leur rôle est essentiel dans la survie et la propagation parasitaire. Les protéines qu'ils sécrètent sont impliquées dans la motilité, l'invasion et la virulence du parasite (Cérède et al., 2005; Tomley and Soldati, 2001). La plupart des protéines des micronèmes identifiées sont des adhésines transmembranaires ou des protéines accessoires de ces dernières. Lors du contact

initial entre le parasite et la cellule-hôte, elles sont libérées et participent à l'attachement du parasite à la membrane de la cellule (Tomley and Soldati, 2001).

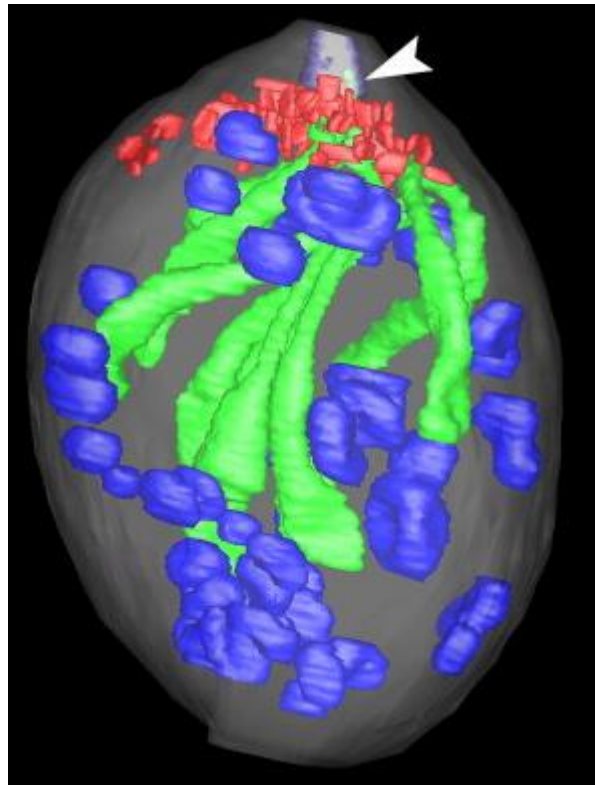


Figure 5. Reconstruction tridimensionnelle d'un tachyzoïte de *T. gondii* mettant en évidence les granules denses (bleu), les rhoptries (vert) et les micronèmes (rouge) (d'après Paredes-Santos et al., 2012).

ii. Les protéines des rhoptries (ROP et RON)

Les rhoptries sont des organelles sécrétoires essentielles pour le parasitisme chez les Apicomplexa. Les tachyzoïtes de *T. gondii* possèdent 12 rhoptries, regroupées au pôle apical du parasite. Ces organelles sont très conservées au sein du phylum des Apicomplexa. De ce fait, il est probable qu'elles aient un rôle important dans le cycle intracellulaire de ces parasites.

De nombreuses protéines de rhoptries ont été mises en évidence, telles que les ROP et les RON. Les ROP (Rhoptry bulb Protein) sont présentes dans le bulbe et les RON (Rhoptry Neck proteins) dans le cou des rhoptries. La plupart des protéines ROP et RON sont spécifiques des Apicomplexa et n'ont pas ou peu de similitudes avec des protéines d'eucaryotes supérieurs.

Les rhoptries déchargent leur contenu lors de l'invasion de la cellule-hôte. Bien que le signal déclenchant la sécrétion des protéines soit inconnu, il dépend de la reconnaissance directe

entre la surface du pôle apical du parasite et des molécules réceptrices de la cellule-hôte. Au niveau de ce pôle apical se trouve un orifice qui correspondrait à l'ouverture *via* laquelle les rhoptries sécrètent leur contenu (Nichols et al., 1983). A la suite de ce processus, les protéines des rhoptries ont des destinations différentes. Les protéines ROP vont en effet se retrouver dans trois localisations principales : la lumière et la membrane de la vacuole parasitophore (VP) et à l'intérieur de la cellule-hôte (Beckers et al., 1994; Carey et al., 2004; Saffer et al., 1992). Les protéines RON, quant à elles, vont former un complexe avec une protéine de micronème, AMA1 (Apical Membrane Antigen 1), et jouer un rôle dans la jonction mobile entre le parasite et la cellule-hôte (Lamarque et al., 2014).

iii. Les protéines des granules denses (GRA)

Les granules denses sont des vésicules sécrétrices de 200 nm de diamètre entourées d'une membrane unique. Leur nombre varie de 3 à 15 granules par parasite. Ils jouent un rôle prépondérant dans les modifications structurales de la vacuole parasitophore et de sa membrane dans le maintien du parasitisme (Nam, 2009). Les protéines des granules sont libérées à l'intérieur de la vésicule parasitophore pendant et après l'invasion de la cellule-hôte. Elles sont également impliquées dans la survie et la multiplication intracellulaire du parasite (Cesbron-Delauw et al., 1996).

III) Diagnostic et traitements de la toxoplasmose

1) Le diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose sur l'isolement du parasite, de son ADN et/ou de la détection d'anticorps spécifiques. Le diagnostic de certitude est apporté par la mise en évidence du parasite dans les différents prélèvements biologiques. Il repose sur l'examen direct, l'isolement du parasite et la détection d'ADN toxoplasmique. L'isolement du parasite nécessite préalablement l'inoculation intrapéritonéale des prélèvements à la souris. Ce type d'inoculation est la technique de référence. L'inoculation à l'animal a l'avantage de pouvoir être pratiquée sur tout type de prélèvement. Lorsque l'inoculum contient des toxoplasmes, les souris développent une infection généralement asymptomatique dont le diagnostic est réalisé par détection d'anticorps spécifiques 3 à 4 semaines après l'inoculation, avec présence de kystes cérébraux. Cette technique présente une bonne sensibilité, bien que variable selon la richesse de l'inoculum, une excellente spécificité et l'avantage de détecter des parasites viables.

Cependant, son délai de réponse tardif représente un inconvénient majeur pour le diagnostic. La biologie moléculaire permet d'obtenir un diagnostic plus rapide à partir de tout type de prélèvement biologique, par exemple grâce à la technique de PCR en temps réel (Menotti et al., 2010).

2) Le diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique regroupe deux catégories de techniques de dépistage et de diagnostic. La première catégorie correspond aux techniques dites de « première intention ». Ce sont des techniques quantitatives qui reposent essentiellement sur des réactions immuno-enzymatiques ou d'immuno-chimiluminescence. Elles permettent de quantifier des anticorps IgG, IgM ou IgA. D'autres tests peuvent être mis en œuvre, tels que l'immunofluorescence ou l'agglutination directe pour la détection des IgG. Ces techniques sont souvent utilisées en association pour dater une infection chez la femme enceinte.

La seconde catégorie correspond à des techniques complémentaires dites de « seconde intention ». Elles sont utilisées pour l'analyse quantitative des anticorps notamment chez la femme enceinte lorsque les tests cités précédemment ne permettent pas de dater précisément la contamination. La technique de Western Blot est également utilisée pour l'analyse des profils immunologiques dans le cas d'une toxoplasmose oculaire.

3) Les traitements de la toxoplasmose

Les voies ciblées par les molécules couramment utilisées dans le traitement de la toxoplasmose sont la voie de synthèse des folates, la voie de synthèse de l'apicoplaste et celle du transport d'électrons dans la membrane mitochondriale.

a. Les inhibiteurs de la voie de synthèse des folates

Utilisés dans la synthèse des nucléosides, les folates sont des composés essentiels au métabolisme et à l'homéostasie du parasite. Les inhibiteurs utilisés comprennent des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR) et des inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase (DHPS). Ils sont utilisés en association afin d'établir un effet synergique sur les deux enzymes parasitaires citées précédemment (**Figure 6**).

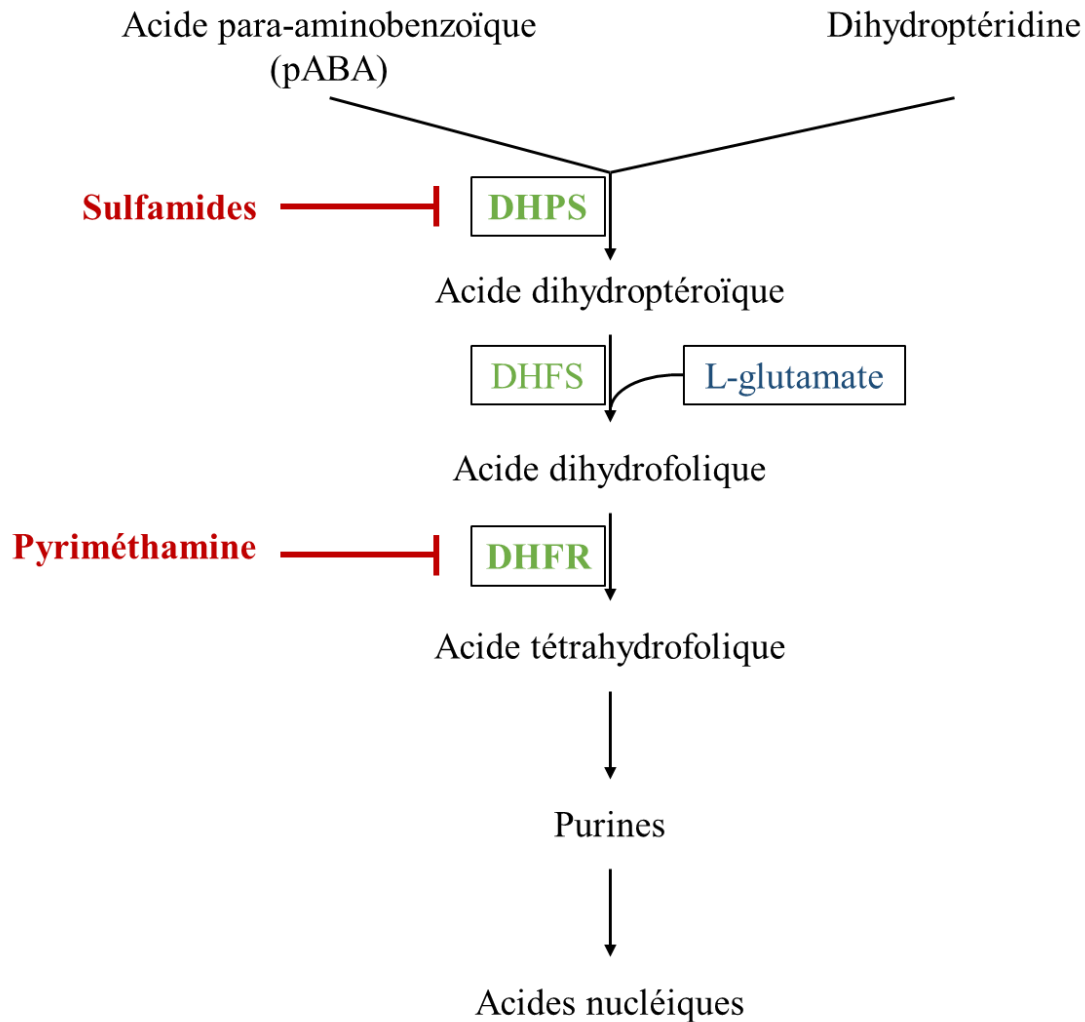


Figure 6. Schéma simplifié de la voie de synthèse des folates chez *T. gondii*.

La DHFR est présente chez l'Homme et l'utilisation d'inhibiteurs dans ce contexte résulte en une carence en folates potentiellement responsable de troubles de l'hématopoïèse et de fœtopathies. La prescription, chez l'Homme, d'un inhibiteur de la DHFR doit donc être accompagnée d'une complémentation en folates. Dans le cadre de la toxoplasmose, la pyriméthamine est l'inhibiteur de DHFR le plus communément utilisé. Les inhibiteurs de la DHPS sont représentés par les sulfones et sulfonamides (principalement la sulfadiazine), dont les effets secondaires fréquemment rapportés sont les allergies cutanées et l'intolérance digestive.

b. La voie de synthèse des protéines et l'apicoplaste

Les macrolides (spiramycine, roxithromycine, clarithromycine, clindamycine, azithromycine et kétolides) présentent une efficacité sur le toxoplasme, mais les deux molécules les plus efficaces sont la clindamycine et l'azithromycine (Derouin, 2005). Plusieurs équipes

ont montré que ces molécules ciblaient spécifiquement la réplication de l'apicoplaste. Les délais d'efficacité font de ces molécules des choix thérapeutiques de seconde ligne, utilisées en particulier en cas d'intolérance à la sulfadiazine (bithérapie pyriméthamine – clindamycine). La spiramycine est le seul macrolide à être utilisé couramment en monothérapie, dans le cadre des séroconversions toxoplasmiques au cours de la grossesse. Si le diagnostic de toxoplasmose congénitale est avéré, une bithérapie pyriméthamine – sulfamides est mise en place.

c. La voie de l'ubiquinone, transporteur d'électrons

Les hydroxynaphtoquinones sont actives contre différents protozoaires (Baggish and Hill, 2002). Parmi elles, l'atovaquone agit au niveau du complexe du cytochrome bc1 en entrant en compétition avec l'ubiquinone et perturbe ainsi le transport d'électrons dans la membrane mitochondriale et, indirectement, la voie de synthèse de l'ADN. Chez *T. gondii*, l'atovaquone représente aussi l'une des seules molécules potentiellement actives sur les kystes.

L'arsenal thérapeutique actuellement disponible est relativement pauvre et pourvu d'effets secondaires rendant la prise en charge de la toxoplasmose parfois difficile et peu satisfaisante. Il existe un réel besoin de nouvelles molécules efficaces et bien tolérées.

La néosporose et *Neospora caninum*

La néosporose est une maladie vétérinaire cosmopolite dont l'agent pathogène est *Neospora caninum*, un parasite protozoaire ubiquiste. Tout comme *Toxoplasma gondii*, dont il est très proche d'un point de vue phylogénétique, il appartient au phylum des Apicomplexa. A l'inverse de celui-ci, c'est un parasite qui ne touche pas l'Homme.

En plus de provoquer des avortements chez les chiens, *N. caninum* est responsable d'au moins 20% des avortements chez les bovins dans plusieurs pays (Dubey et al., 2007). Il est considéré comme étant le premier agent abortif chez les bovins. En fonction des pays, la séroprévalence oscille entre 10% et 50% (Reichel et al., 2013). En 2012, les avortements chez les élevages de bovins (laitiers et allaitants confondus) induits par cette pathologie ont engendré une perte économique de l'ordre du milliard de dollars dans le monde (Reichel et al., 2013). La contamination des élevages est liée à la nourriture donnée aux bovins (Dubey et al., 2007).

La contamination des chiens se fait essentiellement par l'ingestion de viande contaminée, tandis que la contamination des bovins s'effectue principalement par l'alimentation *via* l'ingestion d'oocystes sporulés présents dans leur nourriture ou dans leur eau de boisson (Dubey et al., 2007). Ces aliments souillés le sont généralement par des oocystes de *N. caninum* provenant de fèces de chien. De la même façon que pour *T. gondii*, la transmission materno-fœtale est possible entre la vache et son petit au cours de la gestation.

D) La néosporose

1) La néosporose canine

Chez le chien, hôte définitif, le parasite peut se retrouver dans tous les tissus de l'animal malade, dont la peau (Dubey, 2003). Ce tropisme explique la diversité des symptômes consécutifs à une infection chez les animaux atteints, notamment le chiot et l'adulte immunodéprimé. En effet, chez ceux-ci, la néosporose est responsable de troubles locomoteurs et neurologiques mortels tels que l'encéphalomyélite, la paralysie progressive des membres postérieurs, la faiblesse des membres antérieurs et le déficit des nerfs crâniens. D'autres manifestations cliniques peuvent également avoir lieu : dermatite, pneumonie, hépatite, pancréatite et phlébite sont parmi les plus répandues. Les cas de néosporose les plus sévères

concernent les chiots infectés congénitalement. Cependant, le parasite peut infecter des chiens de tout âge et parfois être mortel pour les animaux âgés (Dubey, 2003).

La transmission verticale est également possible chez la chienne atteinte. En effet, les tachyzoïtes de *N. caninum* se retrouvent dans les ovaires et l'utérus (Barber et al., 1996), favorisant ainsi la dissémination du parasite jusqu'au fœtus. Le chiot atteint peut déclarer les symptômes dès 15 jours après sa naissance (Dubey and Lindsay, 1996). Une femelle infectée par *N. caninum* peut transmettre le parasite aux fœtus tout au long de sa vie.

2) La néosporose bovine

Les bovins font partie des hôtes intermédiaires. La néosporose bovine est responsable des avortements dans les élevages de bovins, laitiers ou allaitants. Dès le troisième mois de gestation, la vache peut avorter à cause de la néosporose. La plupart de ces avortements ont lieu entre le cinquième et le sixième mois de gestation. Si le fœtus meurt *in utero*, il peut se résorber ou se momifier suite à sa dessiccation. Il a été démontré que le taux d'anticorps augmente entre le quatrième et le cinquième mois avant la parturition, ce qui suggère une réactivation du parasite qui se trouvait à l'état latent (Stenlund et al., 1999). Le mécanisme de réactivation est cependant inconnu. Le parasite provoque également une altération du placenta (Buxton et al., 2002) *via* sa multiplication et la réponse immunitaire induite. Tout comme la toxoplasmose, la néosporose est d'autant plus grave pour le fœtus que le celui-ci est infecté précocement.

La gestation peut cependant arriver à son terme. Ainsi, le veau va naître avec ou sans signe clinique. Dans le second cas, il présentera une néosporose chronique qui, s'il s'agit d'une femelle, contaminera les futurs veaux de la même façon. Les vaches séropositives sont davantage susceptibles d'avorter que les vaches séronégatives (Dubey, 2003). Cependant, jusqu'à 95% de veaux infectés congénitalement chez des vaches séropositives ne présentent pas de signe clinique.

Les signes cliniques apparaissent principalement au-delà du deuxième mois post-natal. Les veaux atteints peuvent présenter un déficit de poids, une incapacité à marcher ou des atteintes neurologiques et oculaires (exophtalmie, asymétrie des yeux).

II) *Neospora caninum*

1) Découverte du parasite

Neospora caninum est un parasite intracellulaire obligatoire responsable de la néosporose. Ce protozoaire a été décrit initialement en 1984 chez trois portées successives de chiots de race Boxer (Bjerkås et al., 1984). Les chiots présentaient des troubles neurologiques entre 2 et 6 mois. Un parasite semblable à *Toxoplasma gondii* avait alors été observé sur des coupes histologiques de cerveaux. Cependant, aucun anticorps anti-*T. gondii* n'avait été détecté au cours des analyses sérologiques. La seule différence morphologique était que ce parasite non identifié semblait plus gros que *T. gondii*. En 1988, une étude sur 23 chiens présumés atteints de toxoplasmose a permis d'observer ce parasite parmi 10 de ces animaux. Ces travaux ont abouti à la description du parasite jusqu'alors non identifié, désormais nommé *Neospora caninum* (Dubey et al., 1988a). En 1991, des travaux portant sur la comparaison des antigènes conservés de *Neospora caninum* isolés en 1988 avec ceux isolés en 1984 confirme que ces derniers correspondent bien à ce parasite (Bjerkås and Dubey, 1991). Des études rétrospectives ont également été réalisées, mettant en évidence la contamination de chiens par *N. caninum* dès 1957 aux Etats-Unis (Dubey et al., 1990).

Les premières études portant sur la relation parasite/hôte ont montré que *N. caninum* engendre, de par la multiplication intracellulaire des tachyzoïtes, des lésions nécrotiques importantes en seulement quelques jours. Ces lésions provoquent une dégénérescence neuromusculaire chez les hôtes intermédiaire et définitifs se traduisant par la destruction d'un grand nombre de neurones et l'altération de la conduction de l'influx nerveux (Dubey and de Lahunta, 1993; Mayhew et al., 1991). Tout comme *T. gondii*, les tachyzoïtes de *N. caninum* peuvent se transformer en bradyzoïtes, la forme latente du parasite, qui vont se retrouver au sein d'un kyste dans les tissus pauvres en immunoglobulines. Les kystes tissulaires peuvent persister au moins un an dans le cerveau de souris infectées expérimentalement (Lindsay et al., 1992). Une immunodéficiência entraîne la réactivation du parasite et donc de la néosporose chez l'animal traité avec des corticostéroïdes (Dubey and Lindsay, 1993). La néosporose ne touche pas l'Homme, malgré la mise en évidence de la présence d'anticorps anti-*N. caninum* suite à des sérologies (McCann et al., 2008; Petersen et al., 1999; Tranas et al., 1999).

Bien que très semblable à *T. gondii*, *N. caninum* reste néanmoins différent d'un point de vue antigénique et au niveau des rhoptries lorsqu'elles sont observées en microscopie électronique (Dubey et al., 1988a). Ces deux parasites se distinguent aussi par leurs hôtes naturels, leurs facteurs de virulence et leur pathogénicité (Dubey and Lindsay, 1996; Dubey et al., 2007). Plus récemment, d'autres différences d'ordre génétique ont été mises en évidence par des approches génomiques et transcriptomiques (Reid et al., 2012). Le genre *Neospora* regroupe deux espèces : *Neospora caninum* et *Neospora hughesi* (Marsh et al., 1999). Cette dernière est responsable d'encéphalite équine.

2) Les stades parasitaires

Tout comme *T. gondii*, *N. caninum* peut se trouver sous trois formes parasitaires : tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte. Ces trois formes sont toutes infectieuses et sont impliquées dans la transmission du parasite. Les carnivores peuvent s'infecter par ingestion de tissus contaminés où se trouvent des kystes renfermant les bradyzoïtes ou par ingestion d'eau contaminée par des oocystes sporulés renfermant les sporozoïtes. Les herbivores peuvent, quant à eux, s'infecter par ingestion de nourriture ou d'eau contaminée par des oocystes sporulés. La transmission materno-fœtale est également possible lorsque des tachyzoïtes sont transmis par passage transplacentaire au cours de la gestation. Le chien et les canidés (Gondim et al., 2004; McAllister et al., 1998) en sont les hôtes définitifs. Le bovins, les ovins, les équidés et certaines espèces sauvages (Donahoe et al., 2015) en sont les hôtes intermédiaires.

Les stades parasitaires de *N. caninum* sont extrêmement proches de ceux de *T. gondii*. Les tachyzoïtes (**Figure 7**) ont une forme arquée et mesurent environ 7 μm de long sur 2 μm de large. Les caractéristiques morphologiques, structurales (Speer et al., 1999) et des processus d'invasion (Hemphill et al., 1996) et de multiplication par endodyogénie (Buxton et al., 2002) des tachyzoïtes sont sensiblement les mêmes que celles décrites précédemment pour *T. gondii*. Ce stade parasitaire est utilisé lors des expérimentations *in vivo* dans notre modèle murin de néosporose aiguë.

Tout comme ce dernier, le tachyzoïte peut se transformer en bradyzoïte (**Figure 8**) sous l'effet de la pression immunitaire de l'hôte. Ces bradyzoïtes sont moins nombreux chez *N. caninum* par rapport à *T. gondii*. En effet, leur nombre oscille entre 20 à 100 bradyzoïtes par kyste tissulaire contre plusieurs centaines à milliers de bradyzoïtes, respectivement. Leur

multiplication se fait également par endodyogénie (Speer et al., 1999). Les bradyzoïtes de *N. caninum* mesurent environ 8 μm de long sur 2 μm de large. Les kystes se retrouvent principalement au niveau des muscles (Peters et al., 2001) et du système nerveux central et font 20 à 100 μm de diamètre (Dubey and Lindsay, 1996). A la différence de *T. gondii*, les bradyzoïtes de *N. caninum* comporte des petits granules denses localisés entre le noyau et l'extrémité postérieure (Speer et al., 1999)

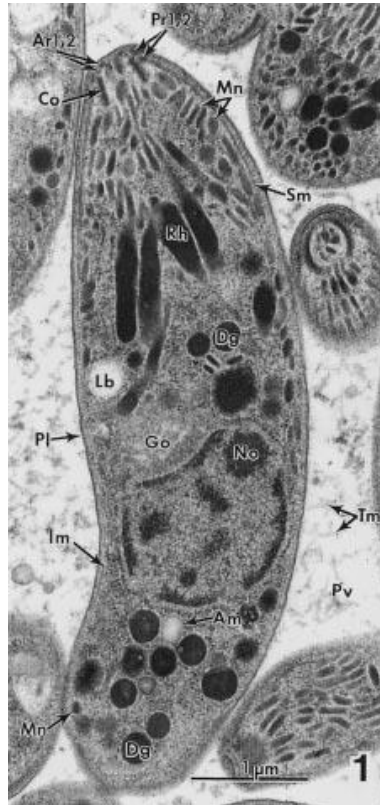


Figure 7. Ultrastructure d'un tachyzoïte de *N. caninum* en microscopie électronique à transmission (d'après Speer et al., 1999).

Comme pour *T. gondii*, les sporozoïtes de *N. caninum* se retrouvent au nombre de huit dans un oocyste sporulé (**Figure 9**). Les oocystes sont formés lors de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, tel que le chien. Des milliers d'oocystes non sporulés sont émis dans les fèces de l'animal. Après sporulation dans le milieu extérieur se forment deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes. Un oocyste mesure environ 12 μm de diamètre (Lindsay et al., 1999).

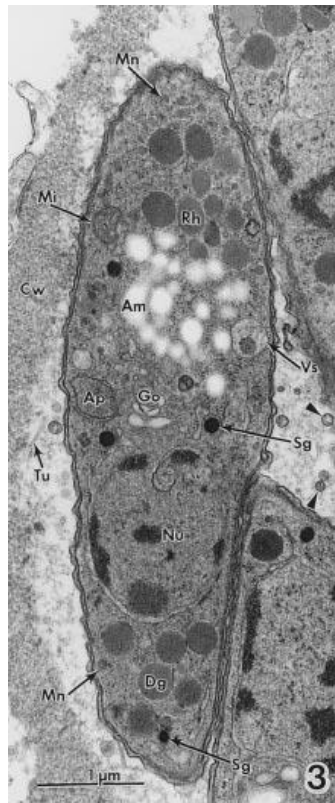


Figure 8. Ultrastructure d'un bradyzoïte de *N. caninum* en microscopie électronique à transmission (d'après Speer et al., 1999).



Figure 9. Oocyste de *N. caninum* (d'après Lindsay et al., 1999).

3) Le cycle parasitaire de *N. caninum*

Le cycle parasitaire de *N. caninum* (Dubey et al., 2007) semble être divisé en deux phases distinctes (**Figure 10**). La première est une phase de reproduction sexuée se déroulant exclusivement chez l'hôte définitif, les canidés (Donahoe et al., 2015; Gondim et al., 2004), et plus particulièrement le chien (McAllister et al., 1998). La seconde phase est une phase asexuée qui a lieu chez les hôtes intermédiaires, c'est-à-dire les bovins, ovins, équidés et certaines espèces appartenant à la faune sauvage (Donahoe et al., 2015). Il n'existe cependant que peu

d'informations concernant les différents stades parasitaires rencontrés au cours du cycle (Al-Qassab et al., 2010). De ce fait, les phases de gamétogonie et de schizogonie ne sont, pour l'heure, que supposées.

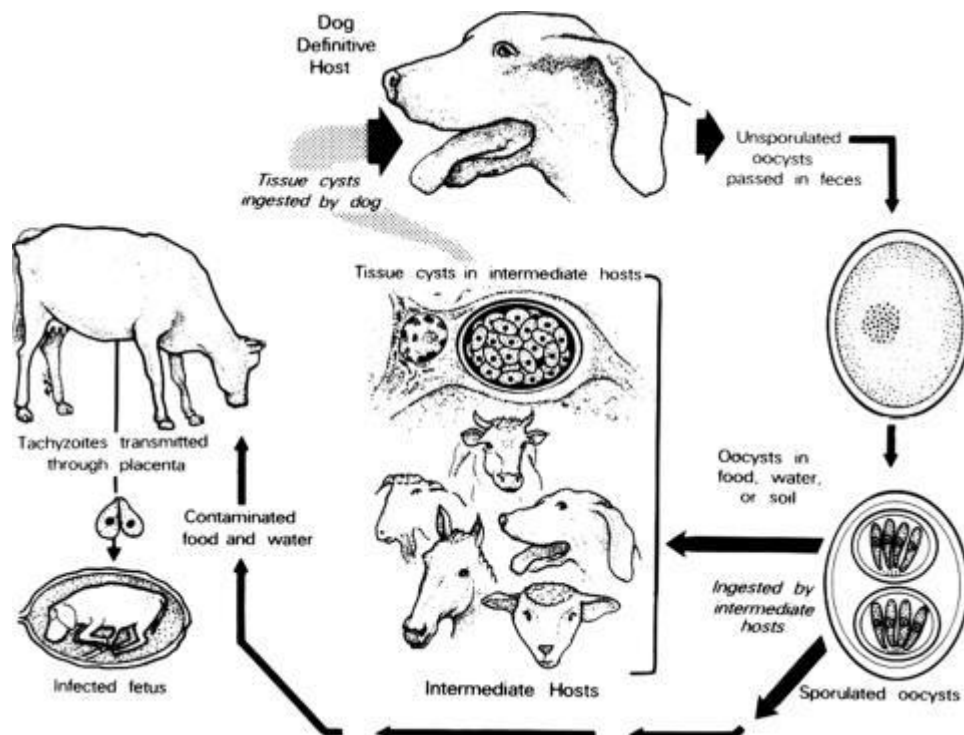


Figure 10. Cycle parasitaire de *N. caninum* (Dubey et al., 2007).

4) Les différentes souches de *N. caninum*

Dans certaines études consécutives à l'identification de *N. caninum*, certaines différences morphologiques avaient été décrites entre le parasite isolé chez le chien et le parasite isolé chez les bovins. Par la suite, il a été démontré que ces différences n'étaient en réalité pas avérées (Jardine, 1996). Cependant, il existe une grande variété de souches de *N. caninum*, identifiées à partir d'isolats (Al-Qassab et al., 2010; Schock et al., 2001). Des différences mineures peuvent exister entre ces différentes souches, notamment en ce qui concerne la morphologie et l'ultrastructure du parasite : la taille des tachyzoïtes, la taille et le nombre de kystes tissulaires ainsi que l'épaisseur de la paroi, le nombre de rhoptries et l'orientation des micronèmes (Al-Qassab et al., 2010). Les différentes souches peuvent également se caractériser par leur pathogénicité, comme cela a été démontré chez des modèles murins, de gerbilles, d'ovins et de bovins (Al-Qassab et al., 2010). De telles différences se retrouvent aussi au niveau génétique (Al-Qassab et al., 2010). La souche NC1 est la souche utilisée pour les expérimentations *in vivo* dans le modèle murin de néosporose aiguë.

5) Les protéines de *N. caninum*

A l'instar de *T. gondii* et d'autres organismes unicellulaires, *N. caninum* est composé d'une multitude d'antigènes immunogènes, membranaires ou cytoplasmiques ou faisant partie des composants structuraux. Parmi les protéines de surface et les protéines contenues dans les organelles sécrétoires du parasite (micronèmes, rhoptries et granules denses), certaines peuvent être communes à plusieurs stades évolutifs. Les protéines exprimées à un stade spécifique semblent contrôler les différences phénotypiques entre tachyzoïtes et bradyzoïtes. L'interconversion entre ces deux stades parasitaires se traduit par un changement d'expression des protéines (Fuchs et al., 1998; Marugán-Hernández et al., 2010). Le tachyzoïte est responsable de la dissémination et de complications lors des réactivations ou du passage transplacentaire au cours de la gestation, grâce à sa capacité à se multiplier rapidement dans l'organisme. A l'inverse, le bradyzoïte ne cause pas de dommage tissulaire significatif de par sa lente multiplication.

a. Les protéines de surface

La membrane plasmique du parasite est recouverte de nombreuses protéines. Plusieurs études ont montré le rôle de certaines de ces protéines dans les processus d'adhésion et d'invasion de la cellule-hôte par le parasite, telles que la protéine de surface NcSRS2 (Hemphill and Gottstein, 1996; Nishikawa et al., 2001) et la protéine p36, très proche de la protéine SAG1 de *T. gondii* (Sonda et al., 1998). L'inhibition de cette protéine par anticorps monoclonal altère l'invasion de la cellule-hôte (Nishikawa et al., 2000). Cette protéine est spécifique à la forme tachyzoïte de *N. caninum* (Hemphill and Gottstein, 1996), ce qui rejoint d'autres études sur la spécificité de l'expression de certaines protéines en fonction du stade parasitaire (Fuchs et al., 1998). Dans notre étude, un anticorps monoclonal anti-protéine p38, protéine proche de SAG1 de *T. gondii* (Schaes et al., 1999), a été utilisé pour le dosage ELISA.

b. Les protéines des organelles sécrétoires

Les protéines des organelles sécrétoires de *N. caninum* ont les mêmes rôles que celles qui sont retrouvées chez *T. gondii*. Les protéines MIC vont ainsi participer à l'adhésion (Naguleswaran et al., 2001), à la motilité (Li et al., 2015) et à la virulence du parasite (Dowse and Soldati, 2004). Les protéines RON ont un rôle central dans la formation de la jonction mobile (Besteiro et al., 2011), tandis que les protéines ROP sont principalement des facteurs de

virulence (Pastor-Fernández et al., 2016). Chez *N. caninum*, seule la protéine NcROP2 est clairement caractérisée. La protéine NcROP40 est en partie caractérisée mais son rôle dans le cycle lytique est encore à déterminer (Pastor-Fernández et al., 2016). Des vaccins expérimentaux mettant en jeu NcROP2 recombinée, seule ou en association avec NcROP40, ont montré des résultats encourageants quant à la survie de souris atteintes de néosporose (Debache et al., 2008; Pastor-Fernández et al., 2015). Enfin, les protéines GRA ont un rôle clé dans la formation de la vacuole parasitophore et du kyste tissulaire (Guionaud et al., 2010; Mercier et al., 2005).

III) Diagnostic et traitement de la néosporose

1) Le diagnostic histologique

A cause de sa multiplication dans les tissus de l'hôte, *N. caninum* provoque diverses lésions microscopiques nécrotiques et inflammatoires. Ces lésions sont essentiellement retrouvées au niveau du système nerveux (Dubey and Schares, 2006). Certaines lésions macroscopiques peuvent être mises en évidence dans le foie, le cœur et le cerveau des animaux atteints (Wouda et al., 1997), bien qu'il semblerait que ce dernier soit l'organe le plus fiable pour le diagnostic de la néosporose (Pescador et al., 2007).

L'examen des coupes histologiques est réalisé après une coloration des coupes à l'hématoxyline et à l'éosine (**Figure 11**). Cette méthode permet de mettre en évidence les lésions induites par la multiplication parasitaire mais elle peut également mettre en évidence la présence directe du parasite. *N. caninum* reste néanmoins difficile à identifier formellement avec cette technique, notamment à cause de sa forte ressemblance morphologique avec *T. gondii*.

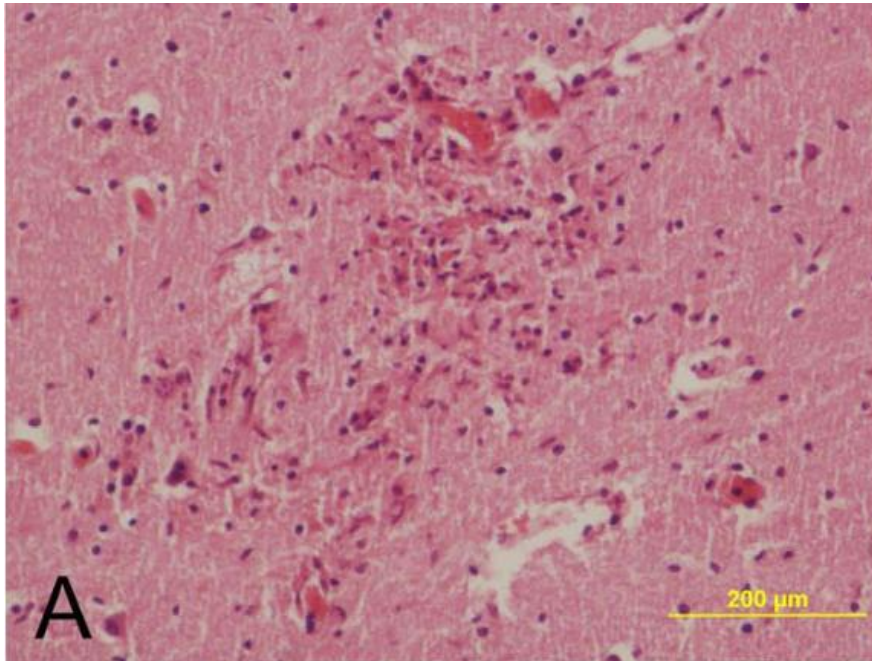


Figure 11. Nécrose cérébrale typique de la néosporose chez un fœtus bovin après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (d'après Dubey and Schares, 2006).

2) Le diagnostic immuno-histochimique

A l'inverse du diagnostic histologique, le diagnostic immuno-histochimique est plus approprié pour identifier *N. caninum*. En effet, cette méthode met en jeu des anticorps mono- ou polyclonaux pour mettre en évidence la présence d'antigènes du parasite au sein de coupes histologiques (Dubey and Schares, 2006). Avec ce type de diagnostic, *N. caninum* est surtout retrouvé dans le cœur et le cerveau. A l'inverse, il est moins retrouvé dans le placenta, probablement à cause de la concentration en peroxydase présente dans celui-ci. De ce fait, un traitement adéquat est nécessaire pour le diagnostic immuno-histochimique sur des coupes de placenta (Dubey and Schares, 2006).

3) Détermination de la viabilité du parasite

D'un point de vue pratique, ce troisième type de diagnostic consiste à digérer les tissus infectés dans la trypsine ou la pepsine avant de les centrifuger et de les laver dans du sérum physiologique. La solution ainsi obtenue est mise en culture cellulaire ou injectée à un modèle animal tel que la souris immunodéprimée, qui développe plus facilement la maladie que d'autres modèles animaux (Dubey and Schares, 2006).

Ce diagnostic a pour objectif de déterminer si les lésions observées sont dues à *N. caninum* puisqu'un certain nombre d'animaux atteints sont asymptomatiques. Cependant, les tentatives d'isolement du parasite viable par des essais chez la souris ou par culture cellulaire se sont souvent soldées par un échec (Dubey and Schares, 2006). L'une des raisons évoquées pour expliquer ces échecs serait que le parasite meurt au même moment que son hôte.

4) Le diagnostic par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Le diagnostic par PCR permet la détection directe du parasite à partir de tissus, des fluides amniotique et cérébrospinal (Dubey and Schares, 2006), ou de fèces de canidés (Gondim et al., 2004). Comme pour le diagnostic histologique, le cerveau est l'organe le plus fiable pour la détection du parasite par PCR, suivi des reins, des poumons et du cœur (Dubey and Schares, 2006). La majorité des diagnostics par PCR sont suffisamment spécifiques pour ne pas amplifier d'ADN de *T. gondii* (Dubey and Schares, 2006).

5) Le diagnostic sérologique

La sérologie est le diagnostic le plus courant pour diagnostiquer la néosporose. Elle peut se faire sur sang ou sur lait (Björkman et al., 1997). L'un des principaux avantages de cette méthode est de pouvoir les réaliser sur l'animal encore en vie et de déterminer à quel stade de l'infection parasitaire il se trouve. Les anticorps anti-*N. caninum* sont ainsi quantifiés, et sont les témoins indirects de l'infection. Chez les bovins expérimentalement infectés, les immunoglobulines M (IgM) présentent un pic à deux semaines post-infection et les immunoglobulines G (IgG) entre trois à six mois post-infection (Uggla et al., 1998). Le principal test utilisé pour ce diagnostic est l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

6) Les traitements de la néosporose

Classiquement, le principal traitement curatif mis en jeu pour traiter la néosporose consiste à associer la clindamycine à un ou plusieurs composé(s) antiprotozoaire(s) comme les sulfamides (Crookshanks et al., 2007; Hay et al., 1990). Il est très proche de celui mis en jeu pour traiter *T. gondii*. L'un des premiers traitements utilisés a été appliqué chez un chiot âgé de 12 semaines présentant une rigidité des muscles extenseurs des membres postérieurs. Le traitement consistait en une trithérapie à base de clindamycine, sulfadiazine et triméthoprime (Hay et al., 1990). Aucun effet sur la rigidité musculaire ne fut mis en évidence, mais le traitement permit d'atténuer des lésions neurologiques mineures (Hay et al., 1990). En

revanche, si la maladie est prise en charge précocement, le jeune chiot malade peut être traité avec succès avec ces mêmes composés thérapeutiques (Dubey et al., 1998b). Plus récemment, la buparvaquone a présenté des résultats prometteurs *in vitro* et chez la souris expérimentalement infectée en inhibant le passage transplacentaire des tachyzoïtes chez l'animal gestant (Müller et al., 2015, 2016).

Une autre approche thérapeutique est l'utilisation de vaccins préventifs chez le bétail (Monney et al., 2011; Romero et al., 2004). Un vaccin inactivé a été commercialisé, mais les résultats obtenus se sont révélés mitigés (Reichel and Ellis, 2009). Un autre vaccin, produit à partir de tachyzoïtes inactivés de *N. caninum*, a montré des résultats prometteurs mais son coût de production est relativement élevé (Reichel and Ellis, 2009). Par la suite, d'autres vaccins ont montré un effet significatif contre l'avortement et la transmission transplacentaire chez les bovins (Hemphill et al., 2016; Mazuz et al., 2015; Weston et al., 2012), alors que d'autres n'ont eu aucun effet bénéfique chez l'animal (Hecker et al., 2014).

Enfin, la prévention est la méthode la plus efficace pour empêcher le développement de la néosporose. Elle repose avant tout sur une bonne connaissance du cycle parasitaire et des voies de transmission de *N. caninum* aux hôtes. Cette méthode passe, par exemple, par la mise à l'écart des animaux malades après un diagnostic positif et par l'empêchement des chiens malades de pénétrer dans les zones réservées au bétail (Reichel and Ellis, 2009).

Le paludisme et *Plasmodium falciparum*

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un protozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant également au phylum des Apicomplexa. Ce protozoaire est transmis à l'Homme via la piqûre d'un moustique du genre *Anopheles*. Il est responsable de plus de 200 millions de nouveaux cas par an (OMS. Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Plus de 90% d'entre eux sont enregistrés en Afrique, les 10% restants sont partagés entre l'Asie et la Méditerranée orientale (OMS. Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Le paludisme sévit également dans certains pays d'Amérique du Sud (Rodríguez et al., 2011; Stefani et al., 2011). En 2015, le nombre de décès dus à cette maladie s'élevait à 429 000, principalement en Afrique, et 99% d'entre eux étaient dûs à *Plasmodium falciparum* (OMS. Organisation Mondiale de la Santé, 2017).

Les sujets les plus vulnérables à cette maladie sont les enfants et les femmes enceintes (OMS. Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Après sa transmission lors du repas sanguin d'un moustique du genre *Anopheles*, *Plasmodium falciparum* infecte dans un premier temps les cellules hépatiques de l'hôte puis gagne le sang pour y envahir et détruire les globules rouges en se multipliant. C'est l'une des maladies acquises les plus répandues dans le monde touchant les globules rouges (Greenwood et al., 2008).

D) Le paludisme

1) Historique

Le terme « paludisme » provient du latin *palus* ou *paludis* signifiant « marais ». En anglais, il s'agit de *malaria*, qui provient de l'italien *mala aria* signifiant « mauvais air ». Les signes cliniques ont été décrits pour la première fois il y a 2500 ans dans l'un des plus anciens traités égyptiens, le papyrus d'Ebers (Ebers and Stern, 1875). Au IV^{ème} siècle avant notre ère, Hippocrate décrit les symptômes du paludisme dans « Consultation » et « Livre des épidémies ». Il faut attendre 1880 pour qu'un médecin militaire, Charles Louis Alphonse Laveran, observe des parasites dans le sang d'individus atteints de fièvre en Algérie et en fasse leur description (**Figure 12**) avant de les nommer *Oscillaria malariae*. Par la suite, il remarque que ces parasites disparaissent après l'administration de quinine (Laveran, 1881). L'ensemble de ces travaux lui a valu le prix Nobel de Médecine en 1907. En 1885, Marchiafava et Celli confirment les

observations de Laveran (Ledermann, 2008). Ils donnent alors le nom de *Plasmodium* au parasite retrouvé dans le sang des malades.

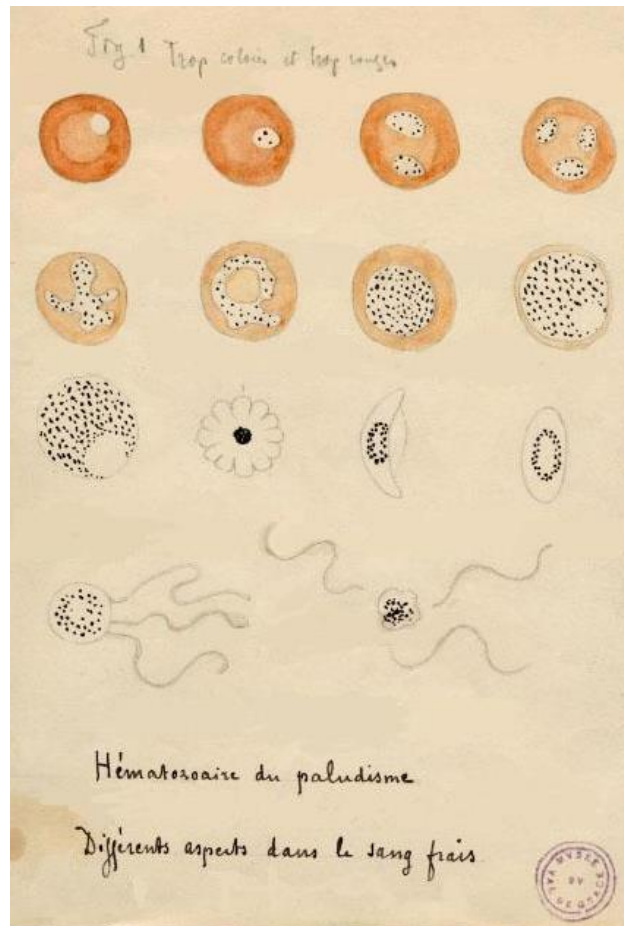


Figure 12. Première description d'*Oscillaria malariae*, ancienne dénomination de *Plasmodium falciparum*, d'après les observations de Laveran (Center for Disease Control and Prevention).

En 1897, Ronald Ross démontre l'implication des moustiques en tant que vecteur du paludisme aviaire en observant des sporozoïtes au niveau de l'estomac et des glandes salivaires du moustique (Bynum, 1999). Cette découverte lui valut le prix Nobel de Médecine en 1902. Entre 1898 et 1900, le rôle du moustique femelle du genre *Anopheles* dans la transmission du paludisme humain est mis en évidence par plusieurs scientifiques italiens : Grassi, Bignami, Bastianelli, Marchiafava, Celli et Golgi (Cox, 2010). Ces travaux aboutissent à la description du cycle de développement de *Plasmodium* chez le moustique anophèle en 1899 (Cox, 2010).

2) Les vecteurs du paludisme

Seuls les moustiques femelles du genre *Anopheles* (**Figure 13**) sont des vecteurs du paludisme. Parmi toutes les espèces retrouvées au sein de ce genre, seule une cinquantaine est impliquée dans la transmission de la maladie, mais une vingtaine seulement est responsable de

la majorité des cas à travers le monde (Pages et al., 2007). Cette transmission a lieu au cours d'un repas sanguin, le moustique étant hématophage. Le sang, et plus particulièrement le fer présent dans l'hémoglobine des hématies, est utilisé par ce diptère pour la maturation de ses œufs (Zhou et al., 2007). Les moustiques prennent leur repas sanguin principalement à partir du crépuscule et tout au long de la nuit. Ils sont attirés, entre autres, par le dioxyde de carbone (Takken and Kline, 1989), le sébum (Verhulst et al., 2016) et l'acide lactique (Murphy et al., 2001) produits par l'Homme ou les animaux.

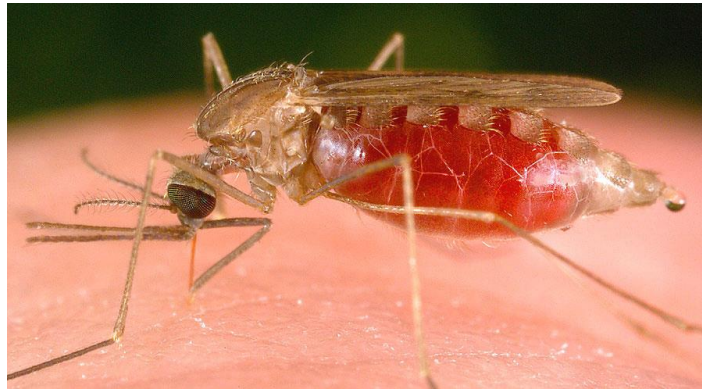


Figure 13. Femelle *Anopheles freeborni* prenant son repas sanguin sur un humain (Center for Disease Control and Prevention).

Comme tous les autres moustiques, les anophèles se reproduisent dans les milieux aquatiques (flaque d'eau, milieu marécageux, eau stagnante...). La transmission du parasite est d'autant plus importante que la durée de vie du vecteur est longue (Dawes et al., 2009). Les espèces d'anophèles vecteurs du paludisme les plus importantes sont *Anopheles gambiae*, *Anopheles darlingi* et *Anopheles stephensi*. Elles sont respectivement retrouvées en Afrique, en Amérique du Sud et en Asie.

3) Les modes de transmission du paludisme

a. La transmission vectorielle

La transmission vectorielle a lieu au moment de la piqûre de l'anophèle femelle lors de son repas sanguin sur l'Homme ou un animal à sang chaud. Le moustique infectieux porte les parasites, sous leur forme sporozoïte, dans ses glandes salivaires. Au cours de la piqûre, l'insecte va injecter de la salive, contenant des sporozoïtes, pour empêcher la coagulation du sang de son hôte. Le parasite va alors se mêler au sang ou à la lymphe et pénétrer dans l'organisme de l'hôte avant de s'y multiplier (**Figure 14**) (Ménard et al., 2013). C'est la voie de transmission la plus fréquente.

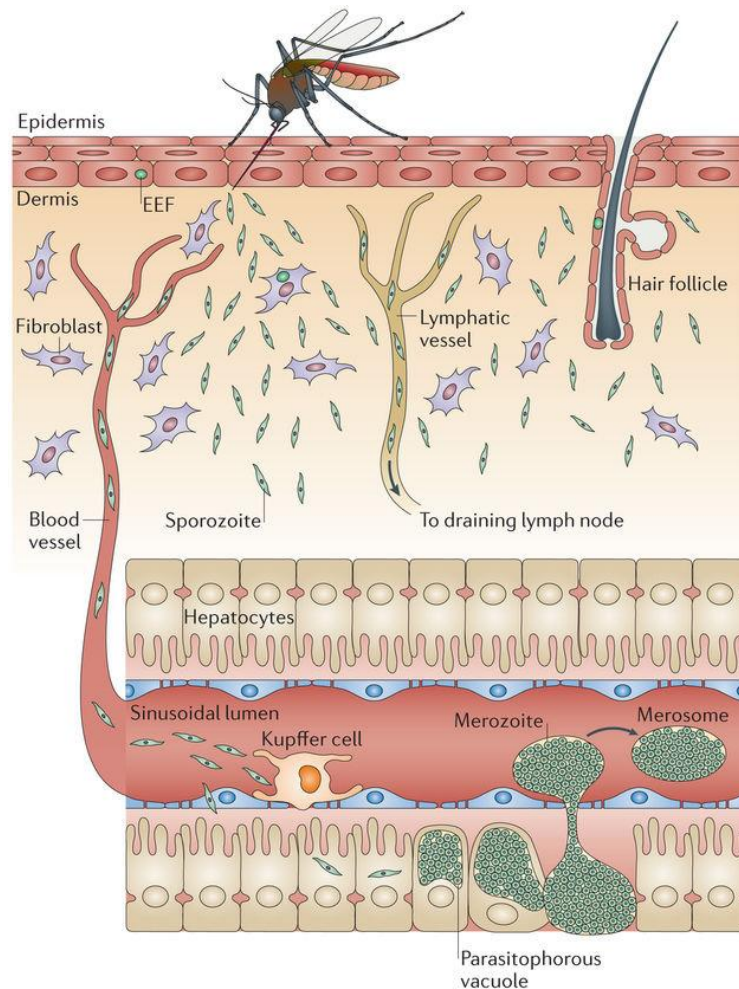


Figure 14. Phases précoces de la transmission vectorielle de *Plasmodium* spp. à l'hôte consécutivement au repas sanguin de la femelle anophèle (d'après Ménard et al., 2013).

b. La transmission par transfusion sanguine

Chaque espèce de *Plasmodium* pathogène pour l'Homme (voir **Tableau I**, page 41) peut être transmis *via* une transfusion (Owusu-Ofori et al., 2010). La transfusion de tout produit sanguin (concentré globulaire, plasma, plaquettes...) peut transmettre le parasite. A l'inverse, les produits dérivés du sang subissent un traitement particulier délétère pour le parasite au moment de leur conditionnement, ce qui l'empêche de rester viable. De nouveaux procédés ont été récemment décrits pour améliorer l'innocuité de ces produits dérivés du sang en cas de présence de pathogènes (Di Minno et al., 2017; Yonemura et al., 2017). Le premier cas de paludisme transfusionnel a été rapporté en 1911 (Bruce-Chwatt, 1982), et d'autres cas de contamination par transfusion sanguine ont été rapportés en 1919 (Gubb, 1919). La sérologie est systématique en cas de voyage en zone d'endémie pour les donneurs.

c. La transmission materno-fœtale

Le parasite est capable d'infecter le fœtus par passage transplacentaire au cours de la grossesse chez la mère déjà infectée. Les femmes enceintes sont particulièrement vulnérables au paludisme. En effet, les anémies maternelles sont plus fréquentes et plus sévères (Schantz-Dunn and Nour, 2009). Le paludisme congénital se traduit le plus souvent par des fausses couches, des avortements ou la mort du nouveau-né (Schantz-Dunn and Nour, 2009).

4) Les manifestations cliniques du paludisme

a. L'accès palustre

Il s'agit de la forme la plus fréquente du paludisme. L'accès palustre, ou fièvre périodique, se traduit par l'apparition d'une fièvre supérieure à 40 °C. Elle est associée à divers symptômes de types grippaux (courbatures, céphalées) et des troubles digestifs (vomissements, diarrhées). L'évolution de l'accès palustre consiste en une succession de phases de rémission et de recrudescence chez les sujets immunocompétents. Il peut aboutir à la forme grave du paludisme chez les sujets immunodéficients.

b. Le paludisme viscéral évolutif

Le paludisme viscéral évolutif touche essentiellement les enfants de 2 à 5 ans atteints de splénomégalie. Les symptômes du paludisme viscéral sont une fièvre intermittente, une anémie et une cytopénie. C'est une forme grave du paludisme. Il témoigne de la surcharge parasitaire présente dans le sang et les tissus contre laquelle l'organisme tente de se défendre (Cooke et al., 2004).

c. Le neuropaludisme

La forme la plus grave du paludisme est le neuropaludisme (Idro et al., 2010). Il est provoqué seulement par *Plasmodium falciparum*. Il touche les individus de tout âge, même si cette forme est plus fréquente chez les enfants en bas âge. Le neuropaludisme se manifeste par une fièvre importante, des convulsions et un coma : il s'agit là des trois symptômes caractéristiques de cette forme de paludisme. Le traitement est d'autant plus efficace que la maladie est prise en charge rapidement. En cas d'absence de traitement, le malade décède au bout de deux à trois jours.

d. Le paludisme de la femme enceinte

Il existe deux types de paludismes de la femme enceinte en fonction du taux de transmission de la maladie dans une région donnée. Dans les régions à forte endémie palustre, la parasitémie est faible chez les femmes enceintes, qui ne présentent pas de symptômes particuliers. Dans les zones à faible endémie palustre, les femmes enceintes sont sujettes à des infections sévères provoquées par une forte parasitémie et accompagnées d'une anémie, d'une hypoglycémie et d'œdèmes pulmonaires. Néanmoins, dans chacun des cas précités, ces femmes sont sujettes à des contractions prématurées, des avortements et des risques de mortalité pour le nouveau-né.

e. Autres formes de paludisme

i. La splénomégalie palustre hyper-immune

Cette forme de paludisme chronique se rencontre chez certains individus vivant dans une zone d'endémie où se retrouve essentiellement *Plasmodium falciparum*. Le système immunitaire de ces individus répond de façon exagérée à l'infection par ce parasite (Maazoun et al., 2015). Les symptômes qui en découlent sont, en dehors de la splénomégalie, une hépatomégalie, une hausse des IgM et des lymphocytes au niveau du foie (Makler et al., 1998). Ces symptômes sont accompagnés de douleurs abdominales violentes, d'une apparition d'une masse abdominale et d'une anémie. Dans les cas d'infections à répétition, les lymphocytes prolifèrent trop vite, aboutissant à un syndrome lymphoprolifératif malin.

ii. La fièvre bilieuse hémoglobinurique

Il s'agit d'une rare complication du paludisme à *Plasmodium falciparum* (Moretti et al., 1974). Elle se traduit par une hémolyse intravasculaire rapide provoquant une hémoglobinémie, une hémoglobinurie, une anurie, une anémie profonde et de la fièvre. Elle se termine le plus souvent par la mort de l'individu suite à une nécrose tubulaire aiguë liée à la destruction des tubules rénaux. Il semblerait que la quinine, utilisée en prophylaxie chez certains malades contre *Plasmodium*, joue un rôle important dans l'apparition de cette complication (Van den Ende et al., 1998).

II) *Plasmodium falciparum*

1) Les différentes espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'Homme

Plasmodium est un parasite protozoaire du phylum des Apicomplexa. Au sein de ce genre se trouvent cinq espèces pathogènes pour l'Homme. Ces espèces diffèrent notamment par des critères biologiques et cliniques et par leur distribution géographique (**Tableau I**).

Tableau I. Distribution géographique des cinq espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'Homme.

Espèces de <i>Plasmodium</i>	Distribution géographique
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Asie du Sud
<i>Plasmodium malariae</i>	Afrique
	Asie du Sud
<i>Plasmodium vivax</i>	Amérique du Sud
	Asie
<i>Plasmodium ovale</i>	Afrique
	Océanie
<i>Plasmodium falciparum</i>	Afrique
	Amérique du Sud
	Asie
	Océanie

a. *Plasmodium knowlesi*

Lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel, *P. knowlesi* sévit dans les zones forestières d'Asie du Sud. Il est proche de *P. malariae*. Il se distingue des autres espèces de *Plasmodium* par une fièvre quotidienne. L'infection par *P. knowlesi* peut être grave, voire mortelle (Singh and Daneshvar, 2013), et doit être traitée de la même façon qu'une infection par *P. falciparum*.

b. *Plasmodium malariae*

Cette espèce de *Plasmodium* se rencontre surtout en Asie du Sud et en Afrique, mais moins fréquemment que *P. falciparum*. L'espèce *P. brasilianum*, retrouvée en Amérique du Sud, proviendrait de *P. malariae* qui s'est adapté à un nouvel hôte intermédiaire, les singes, après la colonisation de l'Amérique du Sud par les Hommes il y a 500 ans (Collins and Jeffery, 2007). Sa période d'incubation est relativement longue, entre deux et trois semaines, et la fièvre qu'il

provoque a lieu tous les trois jours (Collins and Jeffery, 2007). Ce qui le distingue le plus des autres espèces de *Plasmodium* est qu'il est capable de provoquer des recrudescences plus de 20 ans après le retour d'une zone d'endémie (Collins and Jeffery, 2007). L'infection provoquée par *P. malariae* est bénigne mais peut aboutir à des complications rénales.

c. *Plasmodium vivax*

P. vivax est principalement retrouvé en Amérique du Sud et en Asie. Il est peu fréquent en Afrique. Sa période d'incubation est inférieure à deux semaines. La recrudescence peut avoir lieu trois à quatre ans après la contamination. *P. vivax* provoque une infection généralement bénigne mais qui peut être grave en zone d'endémie chez les enfants *via* l'apparition d'anémies sévères pouvant entraîner la mort (Anstey et al., 2012).

d. *Plasmodium ovale*

Retrouvé dans certaines zones du Pacifique et en Afrique, *P. ovale* est très proche de *P. vivax*. Tout comme ce dernier, il provoque une fièvre bénigne. Le temps d'incubation de *P. ovale* est de minimum deux semaines, mais elle peut aller jusqu'à quatre ans. Des recrudescences tardives peuvent avoir lieu quatre ans après (Collins and Jeffery, 2005). *P. ovale* et *P. vivax* occupent des niches complémentaires.

e. *Plasmodium falciparum*

P. falciparum est l'espèce la plus répandue dans le monde, avec des zones d'endémie retrouvées en Afrique, en Asie, en Amérique du Sud et en Océanie (Snow et al., 2005). C'est l'espèce la plus dangereuse pour l'Homme, avec des formes cliniques mortelles. Dans les régions équatoriales, il est transmis toute l'année, avec des recrudescences saisonnières tandis qu'il n'est transmis qu'en période chaude et humide dans les régions subtropicales. Sa période d'incubation est d'une à deux semaines. Contrairement aux autres espèces, il n'y a pas de recrudescence tardive : la majorité des accès palustres ont lieu dans les deux mois suivant le retour d'une zone d'endémie. Il est responsable de plus de 90% des cas de paludisme importé en France métropolitaine (Legros et al., 1997).

2) Les stades et le cycle parasites

Au cours de son cycle parasitaire (**Figure 15**), *Plasmodium spp.* se trouve sous différentes formes.

Paludisme

(*Plasmodium spp.*)

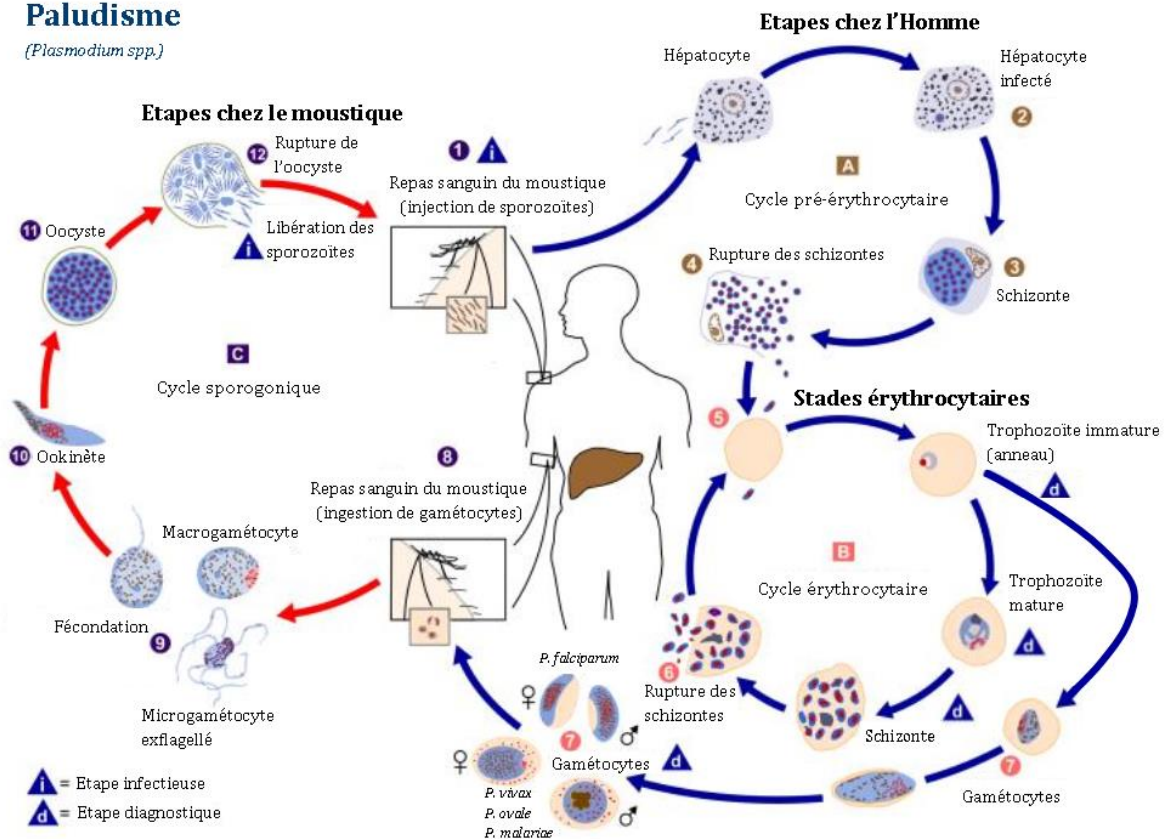


Figure 15. Cycle parasitaire de *Plasmodium spp.* (d'après Center for Disease Control and Prevention).

a. La schizogonie pré-érythrocytaire

i. Le gamétocyte

Les gamétocytes (**Figure 16**) ingérés par le moustique au cours d'un repas sanguin sur un individu infecté subissent une transformation en gamètes mâles (macrogamétocytes) et en gamètes femelles (microgamétocytes). Ils fusionnent ensuite en un œuf libre et mobile appelé ookinète. Celui-ci quitte la lumière du tube digestif du moustique avant de se fixer à la paroi externe de l'estomac pour se transformer en oocyste. Cet oocyste va ensuite produire des centaines de sporozoïtes qui vont migrer vers les glandes salivaires de l'insecte.

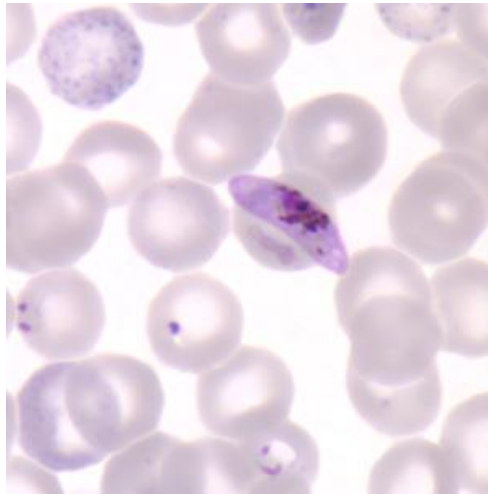


Figure 16. Gamétocyte de *P. falciparum* après coloration d'un frottis sanguin au May-Grünwald-Giemsa (Center for Disease Control and Prevention).

ii. Le sporozoïte

Le sporozoïte (**Figure 17**) est la forme infectante du parasite. Ils se trouvent au niveau des glandes salivaires du moustique. Ils sont inoculés à l'hôte au cours du repas sanguin via la salive de l'insecte. Ils restent environ 30 minutes au niveau de la peau, de la lymphe et du sang de l'hôte après l'inoculation. Bien que beaucoup d'entre eux soient détruits par les macrophages, les sporozoïtes atteignent rapidement le foie de l'hôte. Ils vont y subir une série de multiplications asexuées pendant une à deux semaines. Cette série de multiplications est appelée schizogonie hépatique ou schizogonie pré-érythrocytaire. A l'issue de celle-ci, les schizontes pré-érythrocytaires (plurinucléés) éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes (uninucléés) dans le sang de l'hôte.

Chez *P. vivax* et *P. ovale*, il existe des sporozoïtes particuliers appelés hypnozoïtes. Il s'agit de sporozoïtes intrahépatiques quiescents qui vont provoquer une schizogonie hépatique retardée (Markus, 2011). Celle-ci va aboutir à la libération de mérozoïtes plusieurs mois après la piqûre du moustique, ce qui explique pourquoi ces deux espèces entraînent des recrudescences tardives chez les sujets malades. Les hypnozoïtes ne sont pas présents chez *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. knowlesi*.

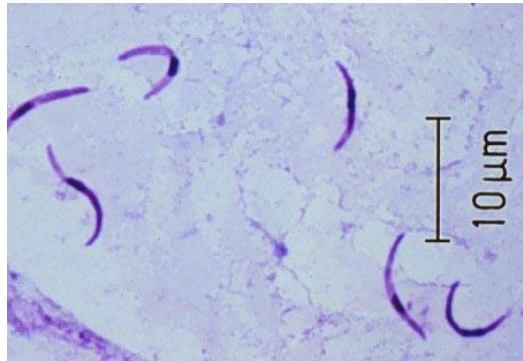


Figure 17. Sporozoïte de *P. falciparum* après coloration d'un frottis sanguin au MGG (Faculté de Médecine de Chian Mai, Thaïlande).

b. La schizogonie érythrocytaire

i. Le mérozoïte

A l'issue de leur formation, les mérozoïtes pénètrent rapidement dans les globules rouges de l'hôte. La multiplication des mérozoïtes et leur maturation en trophozoïtes puis schizontes dure au maximum trois jours et conduit à la destruction des globules rouges. Lors de ce processus, entre 8 et 32 mérozoïtes sont libérés dans le sang avant de pénétrer à nouveau d'autres globules rouges et débiter ainsi un nouveau cycle de multiplication. Cliniquement, il s'agit de l'accès palustre : la parasitémie augmente et le sujet commence à devenir fiévreux.

ii. Le trophozoïte

Le trophozoïte (**Figure 18**) est un stade intra-érythrocytaire au cours duquel le parasite synthétise ses macromolécules, dégrade l'hémoglobine et synthétise un pigment appelé hémozoïne. Il s'agit d'une forme cristalline insoluble (Sullivan, 2002) dont le rôle est de protéger le parasite de la toxicité de l'hème libre issu de la dégradation de l'hémoglobine (Coronado et al., 2014). Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains trophozoïtes subissent une maturation pendant environ 10 jours, sans division nucléaire. Cette maturation est suivie d'une différenciation sexuée qui aboutit à la formation de gamétocytes à potentiel mâle ou femelle. Ces gamétocytes restent dans la circulation sanguine pendant 10 à 15 jours. Ils sont ingérés par le moustique lors du repas sanguin chez un sujet malade.

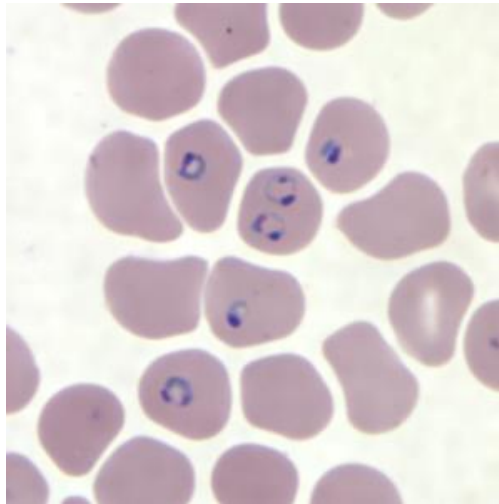


Figure 18. Trophozoïtes de *P. falciparum* après coloration d'un frottis sanguin au MGG (Center for Disease Control and Prevention).

iii. *Le schizonte érythrocytaire*

Le schizonte érythrocytaire (**Figure 19**) est la dernière forme intra-érythrocytaire du cycle de *Plasmodium*. Au terme d'une succession de divisions, le schizonte produit des mérozoïtes. Lorsque ceux-ci sont trop nombreux, le globule rouge éclate et libère les mérozoïtes qui vont envahir d'autres globules rouges et perpétuer ainsi la schizogonie érythrocytaire.

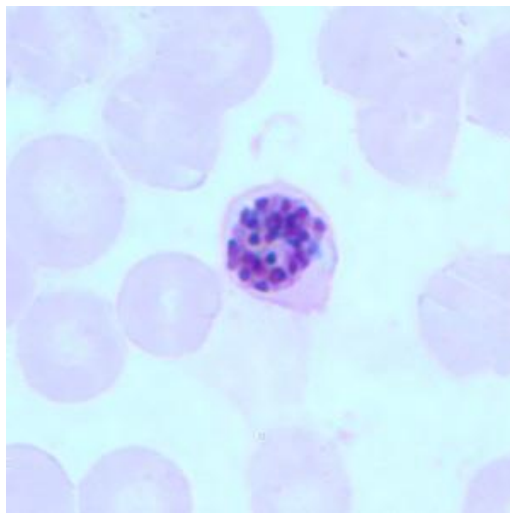


Figure 19. Schizonte érythrocytaire de *P. falciparum* après coloration d'un frottis sanguin au MGG (Center for Disease Control and Prevention).

3) Les différentes souches de *P. falciparum*

L'espèce *P. falciparum* est subdivisée en plusieurs souches. Ces souches sont caractérisées par plusieurs critères allant des protéines constituant le parasite à la localisation géographique

où la souche a été isolée pour la première fois. L'un des nombreux sujets d'étude concernant la diversité génétique de *P. falciparum* est la variabilité de l'antigène de surface majoritaire retrouvé lors de la phase érythrocytaire du cycle parasitaire, PfEMP1, qui est codé par la famille de gènes *var* (Day et al., 2017). D'autres protéines de surface, telles que les protéines de surface des mérozoïtes MSP1 et MSP2 sont utilisées pour caractériser les souches parasitaires (Mohammed et al., 2015). Elles peuvent également être caractérisées par leur origine géographique et leur résistance aux traitements antiparasitaires (Kidgell et al., 2006). Ainsi, la souche 3D7, isolée aux Pays-Bas, est résistante à la sulfadoxine, tandis que la souche W2, également résistante à la sulfadoxine mais aussi à d'autres antiparasitaires, a été isolée en Thaïlande (Kidgell et al., 2006).

4) Les protéines de *P. falciparum*

En dehors de l'apicoplaste et des protéines des organelles du pôle apical présentés précédemment pour *T. gondii* et *N. caninum*, et dont les rôles respectifs sont similaires chez les Apicomplexa, *P. falciparum* présente certains acteurs moléculaires caractéristiques.

a. La relation entre le parasite et le globule rouge

Comme dit précédemment, le globule rouge, ou érythrocyte, est la cellule-hôte de *Plasmodium spp.* Cette cellule a la particularité d'être dépourvue de tout organite intracellulaire, dont le noyau, et présente une forte concentration en hémoglobine. Elle est également capable de traverser les capillaires sanguins grâce à sa grande flexibilité conférée par un cytosquelette composé d'actines et de spectrines (Gratzer, 1981; Stokke et al., 1986). Une fois à maturité, le globule rouge ne possède pas de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Cette caractéristique permet au *Plasmodium* d'échapper au système immunitaire de l'hôte infecté après l'invasion du globule rouge. Là, le parasite se développe au sein de la vacuole parasitophore jusqu'au stade schizonte, à l'issue duquel le grand nombre de mérozoïtes intracellulaires va provoquer l'éclatement du globule rouge. Au cours de ce développement intracellulaire, un trafic vésiculaire d'hémoglobine va s'opérer entre la vacuole digestive du parasite et le cytoplasme du globule rouge (Cooke et al., 2004). La digestion de l'hémoglobine aboutit à la formation d'hémozoïne (Coronado et al., 2014), formée par couplage de groupements hémétiques. Le parasite va également exploiter ce trafic vésiculaire pour échapper au système immunitaire de l'hôte, notamment grâce à l'antigène de surface PfEMP1 (Day et al., 2017). Celui-ci va être exporté jusqu'à la surface du globule rouge et présenté au milieu

extracellulaire (Batinovic et al., 2017; McMillan et al., 2013), aboutissant à la modification des propriétés adhésives et antigéniques des globules rouges infectés (McMillan et al., 2013; Melcher et al., 2010). Ces modifications empêchent la reconnaissance des globules rouges infectés par le système immunitaire de l'hôte, ce qui confère à *Plasmodium* sa virulence (Melcher et al., 2010). Le trafic vésiculaire de l'antigène *PfEMP1* est présenté schématiquement dans la **Figure 20**.

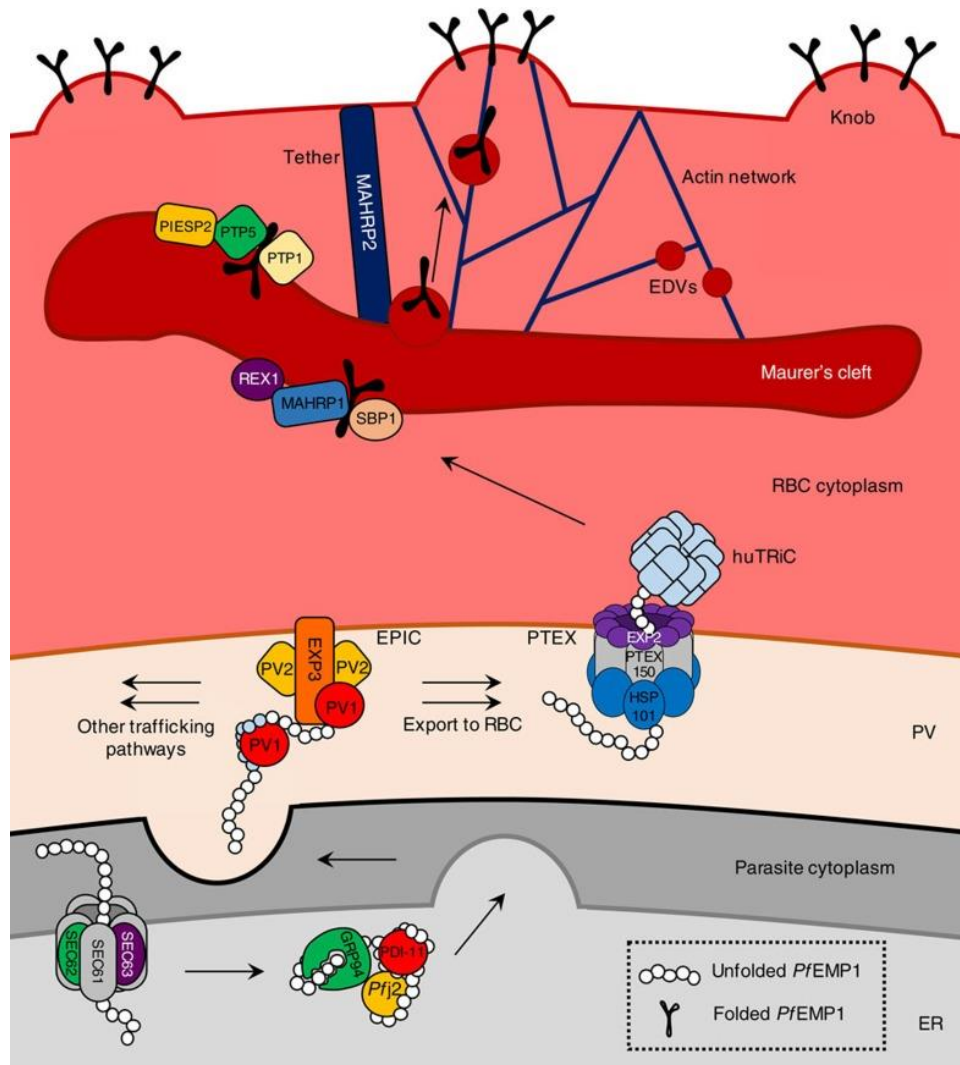


Figure 20. Représentation schématique des mécanismes d'exportation de l'antigène *PfEMP1* de *P. falciparum* (Batinovic et al., 2017).

b. Les antigènes de Plasmodium

i. L'antigène PfHRP2

L'antigène *PfHRP2* (*P. falciparum* Histidine Rich Protein 2) se retrouve chez les stades asexués et les gamétocytes de *P. falciparum*. C'est une protéine soluble spécifique de *P. falciparum*, riche en alanine (A) et en histidine (H). Elle est associée à la présence de

protubérances, appelées « knobs », à la surface des globules rouges infectés (Leech et al., 1984) et impliquées dans les accès palustres graves. L'antigène *PfHRP2* est utilisé dans le diagnostic de *P. falciparum* par TDR (Tests de Diagnostic Rapide) (Houzé, 2017).

ii. *L'aldolase plasmodiale*

La fructose-biphosphate aldolase, ou aldolase plasmodiale, est une enzyme de la glycolyse commune aux cinq espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'Homme. Il a été démontré que cette enzyme est capable d'induire une immunité partielle chez des singes infectés expérimentalement (Perrin et al., 1985). Elle est également utilisée pour le diagnostic de *Plasmodium* par TDR (Houzé, 2017).

iii. *La protéine PfMSP1*

La protéine *PfMSP1* (*P. falciparum* Merozoite Surface Proteine 1) est une protéine de surface majeure retrouvée chez les mérozoïtes. Elle joue un rôle prépondérant dans l'invasion des globules rouges par le parasite (Beeson et al., 2016). Elle est ancrée à la membrane du mérozoïte via une ancre GPI (Beeson et al., 2016). Une protéine chimérique MSP1-MSP3 a été démontrée comme étant immunogène et pouvant rentrer dans la composition d'un vaccin compatible avec les adjuvants utilisés chez l'Homme (Mazumdar et al., 2010).

iv. *La protéine PfAMA1*

La protéine *PfAMA1* (*P. falciparum* Apical Membrane Antigen 1) se retrouve chez toutes les espèces de *Plasmodium* aux stades mérozoïte et sporozoïte (Roestenberg et al., 2008). Elle tient un rôle-clé dans l'invasion des globules rouges et des hépatocytes (Roestenberg et al., 2008). Cette protéine est étudiée pour ses propriétés immunogènes lui permettant de rentrer dans la composition d'un vaccin antipaludique potentiel (Roestenberg et al., 2008).

v. *La protéine CSP1*

La protéine CSP1 (Circum Sporozoite Protein 1) est une protéine de surface majeure retrouvée au stade sporozoïte. Elle favorise l'adhésion du parasite aux hépatocytes et entérocytes du moustique (Sinnis and Nardin, 2002). C'est une cible de choix dans la mise au point d'un vaccin antipaludique (Kastenmüller et al., 2013).

vi. La pLDH

La pLDH (parasite Lactate Dehydrogenase) est une enzyme de la glycolyse présente chez toutes les espèces de *Plasmodium* sous forme d'isomère spécifique à chacune de ces espèces (Moody, 2002). Elle est synthétisée par les gamétocytes et les stades asexués au cours de la schizogonie érythrocytaire. La pLDH est considérée comme étant un marqueur précis de la présence du parasite dans le sang. Par conséquent, elle est largement utilisée pour le diagnostic du paludisme par TDR (Houzé, 2017). Cette protéine est également utilisée pour le dépistage de la maladie par la technique ELISA (Atchade et al., 2013; Martin et al., 2009).

III) Diagnostic et traitement du paludisme

1) Le diagnostic clinique

En fonction des espèces de *Plasmodium*, la période d'incubation, délai entre l'infection et l'apparition des symptômes, peut varier entre 9 jours et 12 mois. Généralement, la phase hépatique est asymptomatique. Les signes cliniques sont donc liés à la phase de schizogonie érythrocytaire. Les symptômes dépendent, entre autres, de l'espèce de *Plasmodium* impliquée, de la parasitémie ou encore de l'immunité de l'hôte. Le diagnostic clinique repose sur différents critères dans le cas du paludisme grave : troubles de la conscience, convulsions répétées, prostration, détresse respiratoire, ictère, hémoglobinurie, collapsus circulatoire, œdème pulmonaire, saignement anormal, anémie grave, hypoglycémie, acidose métabolique, hyperlactatémie, hyperparasitémie ou encore insuffisance rénale.

2) Le diagnostic de certitude : l'examen sanguin au microscope

Le diagnostic de certitude repose sur deux techniques d'observation microscopique : le frottis sanguin et la goutte épaisse. Le frottis sanguin permet d'identifier l'espèce plasmodiale tandis que la goutte épaisse permet de concentrer les parasites présents dans l'échantillon sanguin même en cas de parasitémie faible. Ces techniques requièrent néanmoins un matériel spécifique tel qu'un microscope, des lames en verre et des colorants. Elles dépendent également fortement de la qualité de l'examen et de l'expérience du manipulateur (Tangpukdee et al., 2009).

3) Les tests de diagnostic rapide (TDR)

Le principe de ces tests repose sur la détection de protéines spécifiques de *Plasmodium* telles que la PfHRP2, l'aldolase ou encore la pLDH par chromatographie sur support solide. Ces tests sont rapides et simples d'utilisation. Ils ont une bonne sensibilité mais ne permettent pas de quantifier la parasitémie. Certains de ces tests restent encore positifs plusieurs jours après la disparition des parasites dans le sang. Ces tests sont avant tout une aide au diagnostic et non un moyen de le remplacer. Dans les zones d'endémie, les TDR sont utilisés lorsque l'examen microscopique n'est pas possible.

4) Le diagnostic par biologie moléculaire

Le diagnostic par biologie moléculaire passe par l'utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction), qui consiste à amplifier le matériel génétique du *Plasmodium*. Sa sensibilité est excellente et permet d'identifier l'espèce de *Plasmodium* impliquée. En contrepartie, ces tests sont longs à réaliser et coûteux. Généralement, la cible de l'amplification est une partie ou la totalité du gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (ARNr) (Mangold et al., 2005; Murphy et al., 2012).

5) Le diagnostic sérologique

La présence d'anticorps anti-*Plasmodium* dans le sang témoigne d'un contact antérieur avec le parasite (Drakeley et al., 2005). La sérologie n'est donc d'aucune utilité pour le diagnostic d'urgence de l'accès palustre. Elle est toutefois utilisée dans quatre contextes précis : le diagnostic rétrospectif d'un accès palustre, le diagnostic d'un paludisme viscéral évolutif ou d'une splénomégalie palustre hyper-immune, les enquêtes épidémiologiques ou encore le contrôle de donneurs de sang à risque. Les tests sérologiques sont principalement effectués par immunofluorescence ou par ELISA (Tangpukdee et al., 2009).

6) Les traitements du paludisme

a. Les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine

Les dérivés quinoléiques sont constitués de deux familles de molécules : les amino-alcools (méfloquine, luméfántrine...) et les amino-4-quinoléines (quinine, chloroquine,

amodiaquine...). Ces molécules thérapeutiques (**Figure 21**) inhibent la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole digestive et donc la synthèse d'hémozoïne (Foley and Tilley, 1998). L'artémisinine, dont l'utilisation contre *P. falciparum* a fait l'objet du Prix Nobel de Médecine en 2015 du Professeur Youyou Tu, peut être sous la forme de dérivés (artésunate, artéméther...). Ce sont des composés de type peroxyde (**Figure 21**). Ils vont également agir en inhibant la digestion de l'hémoglobine par la libération de radicaux libres toxiques pour le parasite (Klonis et al., 2011). En plus de cette inhibition, ces dérivés ont un effet gamétocytocide, empêchant la transmission du parasite (Kiszewski, 2010).

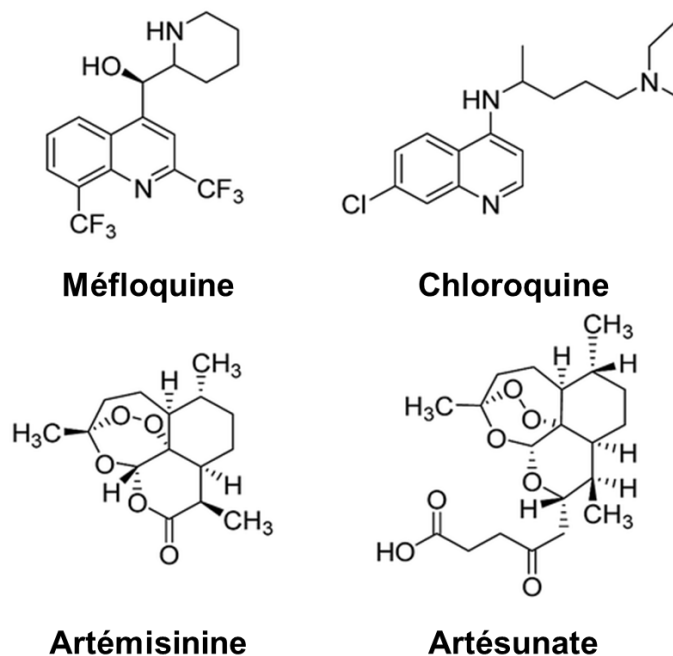


Figure 21. Formules semi-développées de la méfloquine, de la chloroquine, de l'artémisinine et de son dérivé, l'artésunate (d'après Aneja et al., 2016). Ces molécules sont communément utilisées en thérapie dans le cadre d'un traitement antipaludique.

b. Les antifolates

Comme décrit précédemment pour *T. gondii* et, de façon générale pour d'autres parasites protozoaires du phylum des Apicomplexa, les antifolates sont largement utilisés en tant qu'antiparasitaires. Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques du parasite *via* l'inhibition de deux enzymes : la DHPS et la DHFR (**Figure 6**).

c. Les naphtoquinones

Les naphtoquinones, dont fait partie l'atovaquone, sont des inhibiteurs d'une enzyme mitochondriale de la chaîne de transport des électrons : la dihydroorotate déshydrogénase

(Phillips and Rathod, 2010). Les naphthoquinones sont généralement utilisées en association avec d'autres traitements antiparasitaires à cause du faible impact thérapeutique qu'elles induisent lorsqu'elles sont utilisées seules (Srivastava and Vaidya, 1999).

d. Les antibiotiques

Parmi les antibiotiques utilisés contre le paludisme se trouvent les tétracyclines (doxycycline...) et les macrolides (clindamycine, érythromycine...). Ces traitements antiparasitaires inhibent la synthèse protéique au niveau de l'apicoplaste (Dahl et al., 2006; Gaillard et al., 2016).

Les résistances médicamenteuses chez ces protozoaires

Le terme « résistance médicamenteuse » se définit par la « capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'une drogue à des doses supérieures ou égales à celles qui sont habituellement recommandées, mais dans les limites de tolérance du patient ». Cette définition officielle de l'Organisation Mondiale de la Santé a été établie en 1973 dans le contexte de la chimiothérapie antipaludique (Basco and Ringwald, 2000). A l'heure actuelle, cette définition s'applique également à d'autres espèces de parasites. De nombreuses études portent sur le sujet et reflètent l'inquiétude des autorités sanitaires face à l'émergence de telles résistances et leur impact sur la santé publique.

I) La chimiorésistance chez *T. gondii* et *N. caninum*

1) *Toxoplasma gondii*

Très peu de cas de résistance naturelle ont été décrits chez *T. gondii*. En effet, la majorité des études qui se focalisent sur les mécanismes de résistance font état de l'utilisation de souches résistantes induites *in vitro* (Doliwa et al., 2013; Fox et al., 1999; Reynolds et al., 2001). Toutefois, il a été démontré qu'à l'état naturel, les différentes souches de *T. gondii* présentent une variabilité de sensibilité aux traitements thérapeutiques (Meneceur et al., 2008). De plus, une étude clinique a décrit le cas d'une toxoplasmose cérébrale chez un patient malade du SIDA qui ne répondait pas à l'association de pyriméthamine et de sulfadiazine aux doses recommandées, supposant que le parasite y était résistant (Huber et al., 1995). Récemment, une équipe brésilienne a mis en évidence, à partir d'isolats prélevés chez des animaux destinés à la consommation humaine puis inoculés à des souris, l'existence de souches atypiques de *T. gondii* naturellement résistantes à la sulfadiazine (Oliveira et al., 2016).

Ces phénomènes de résistance sont majoritairement induits par des mutations. En effet, la résistance à la clindamycine est due à une mutation au niveau de l'ARNr de l'apicoplaste (Camps et al., 2002) et la résistance à l'atovaquone liée à une mutation du gène codant pour le cytochrome b de la mitochondrie (McFadden et al., 2000). De la même façon, la résistance aux antifolates, notamment les sulfonamides, peut s'expliquer par une mutation du gène codant pour la dihydroptéroate synthase (DHPS) (Aspinall et al., 2002).

2) *Neospora caninum*

La résistance médicamenteuse chez *Neospora caninum* n'a pas encore fait l'objet de publications scientifiques. Seule une équipe fait état de la mise au point d'une souche de *N. caninum* résistante à la pyriméthamine après transfection d'un gène muté codant pour la dihydrofolate réductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) (Pereira et al., 2014). Cette étude confirme également que la forme mutée de la DHFR est responsable de la résistance aux antifolates, comme c'est également le cas chez *T. gondii* (Reynolds et al., 2001).

II) **La chimiorésistance chez *P. falciparum***

L'usage massif des traitements antipaludiques, notamment la chloroquine, a entraîné l'émergence de la chimiorésistance de *Plasmodium* à partir des années 1960 en Asie du Sud et en Amérique du Sud, et à partir des années 1980 en Afrique. Elle s'étend aujourd'hui à toutes les régions du monde touchées par ce pathogène (Sidhu et al., 2002). Face à cette situation, d'autres traitements antipaludiques ont été utilisés, tels que l'association sulfadoxine/pyriméthamine et méfloquine, ou encore l'utilisation de l'artémisinine et de ses dérivés. Néanmoins, *Plasmodium* est capable de devenir résistant à ces traitements : c'est le cas pour les antifolates (Sibley et al., 2001), la méfloquine (Price et al., 2004), l'artémisinine (Fairhurst and Dondorp, 2016) mais également la quinine (Jelinek et al., 1995) ou encore l'association atovaquone/proguanil (Cottrell et al., 2014). Le manque de renouvellement des traitements antipaludiques et leur utilisation courante participent à l'émergence de ces résistances.

Les causes des résistances aux traitements antipaludiques sont généralement des mutations, similaires à celles décrites pour *T. gondii*, puisque les traitements utilisés sont très proches pour ces deux parasites. En effet, des mutations induisent la résistance à l'atovaquone (Schwöbel et al., 2003), à la quinine (Jelinek et al., 1995), aux antifolates (Sibley et al., 2001) ou encore à l'artémisinine (Fairhurst and Dondorp, 2016). Certaines résistances, par exemple la résistance à la méfloquine, peuvent également s'expliquer par la surexpression d'un gène (Price et al., 2004). Les pompes à efflux peuvent également avoir un rôle dans la chimiorésistance chez *Plasmodium* (Nogueira et al., 2006).

III) Contourner les chimiorésistances : un objectif à portée de main ?

A l'heure actuelle, la chimiorésistance des protozoaires aux traitements antiparasitaires est un enjeu de santé publique d'autant plus important que de multiples résistances font leur apparition. A défaut de solutionner cette problématique à court terme, il existe cependant des moyens permettant de limiter l'apparition de ces résistances médicamenteuses (Tanwar et al., 2014). Ces moyens sont présentés dans la **Figure 22**.



Figure 22. Moyens possibles pour limiter et contourner l'apparition des chimiorésistances des parasites protozoaires (d'après Tanwar et al., 2014).

L'alternative la plus prometteuse, mais également la plus difficile à atteindre, est la découverte et la mise au point de nouvelles drogues antiparasitaires. Cette approche passe par

le criblage d'un grand nombre de composés, naturels ou synthétiques, sur un panel le plus important possible de pathogènes. Dans le cas des parasites protozoaires, ce genre d'outil a été proposé en 2011 par la fondation Medicines for Malaria Venture (MMV) qui a mis en place la Malaria Box, outil de criblage de molécules chimiques potentiellement antipaludiques (Spangenberg et al., 2013). Son usage a été par la suite étendu à *T. gondii* et *Entamoeba histolytica* (Boyom et al., 2014) avant d'aboutir à la constitution de la Pathogen Box, applicable à tout type de pathogènes dont les parasites protozoaires (Duffy et al., 2017).

Une approche similaire est possible en utilisant des produits d'origine naturelle. L'idée que des solutions, ici thérapeutiques, soient présentes dans la nature est reprise plusieurs fois par Aristote *via* sa fameuse citation « la Nature ne fait rien en vain ». La médecine traditionnelle illustre ces propos de façon concrète. En effet, il existe de nombreux composés utilisés en médecine traditionnelle dont l'efficacité est scientifiquement avérée contre diverses maladies parasitaires (Freiburghaus et al., 1996; Ndjonka et al., 2013; Willcox and Bodeker, 2004). De plus, certains traitements thérapeutiques actuellement utilisés contre diverses pathologies, parasitaires ou non, ont une origine naturelle tels que les traitements à base d'artémisinine (Nosten et al., 1998) ou de quinine (Achan et al., 2011) contre le paludisme, ou encore le paclitaxel contre le cancer (Weaver, 2014). Au vu de la biodiversité de notre environnement, il est intéressant, voire essentiel, d'en explorer les multiples facettes dans le but de découvrir des alternatives thérapeutiques nous permettant de contrer l'émergence des chimiorésistances.

ii) Méthodes de screening

Les parasites apicomplexes, de par leur ubiquité et leur infectiosité, sont responsables de pathologies humaines et animales ayant des conséquences parfois graves pour les organismes touchés tout en engendrant un certain coût, par exemple lors de la perte d'animaux d'élevage atteints par l'un de ces parasites. Par conséquent, la prévention et le traitement de ces maladies parasitaires sont primordiaux pour limiter ces pertes humaines, animales et économiques.

Dans cette optique, la prévention est en première ligne. Toutefois, dans le cas de la prévention par vaccination, celle-ci n'est souvent que partiellement efficace et est souvent supplantée par la chimiothérapie antiparasitaire (Müller and Hemphill, 2013). Malheureusement, cette dernière est sujette à des interrogations quant aux drogues utilisées qui peuvent s'accumuler dans l'organisme (Müller and Hemphill, 2013). En plus de cet aspect sanitaire, il n'existe, dans certains cas, que peu de traitements disponibles. Ceux-ci peuvent également être totalement inefficaces dans le cas où le pathogène ciblé développe une résistance médicamenteuse. Il est donc important d'avoir à disposition des outils et méthodologies de screening (ou criblage) permettant d'identifier de nouveaux composés d'intérêt, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, tout en suivant un cheminement précis et optimal (**Figure 23**) (Cos et al., 2006).

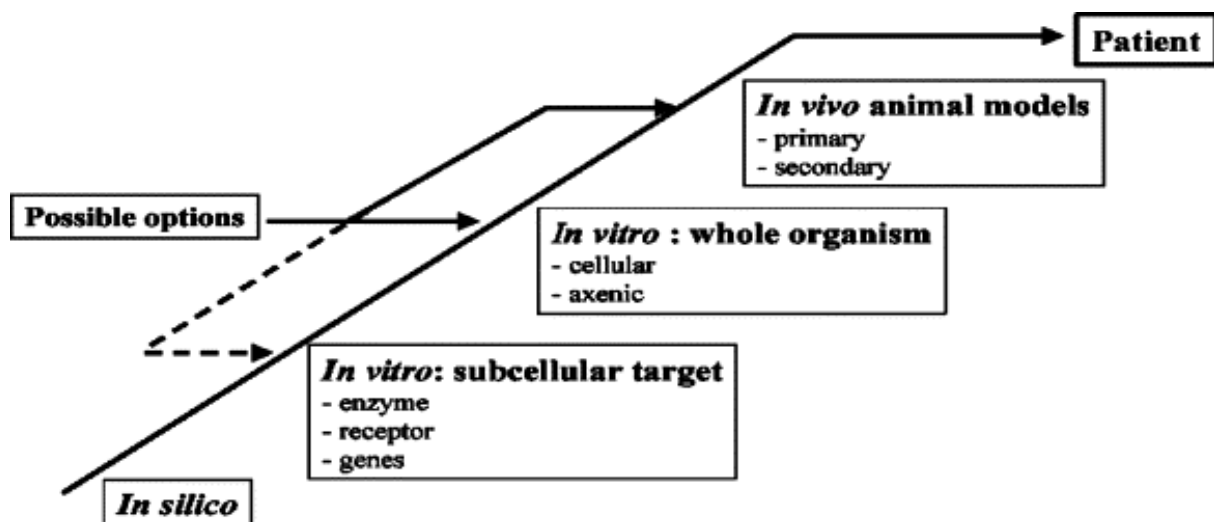


Figure 23. Approche globale appliquée lors du screening de composés actifs (Cos et al., 2006).

I) Les méthodes de screening *in silico*

Le screening *in silico* met en œuvre des outils informatiques et ne nécessite aucun matériel biologique. Il s'agit donc d'un screening théorique, utilisé la plupart du temps pour pré-identifier des composés potentiels et les molécules ciblées. Les connaissances acquises dans les domaines de la génomique et de la protéomique permettent de simuler informatiquement l'effet d'un composé actif, hypothétique ou non, sur une cible moléculaire donnée. Ce principe, appelé docking moléculaire, est largement utilisé dans les screenings à haut débit puisqu'il permet de pré-visualiser l'effet d'un grand nombre de composés en un minimum de temps sur un certain nombre de cibles, tout en étant partiellement automatisé. Le docking moléculaire est également une approche *in silico* mise en application pour la conception de composés actifs, appelée *drug design* (Figure 24) (Kitchen et al., 2004).

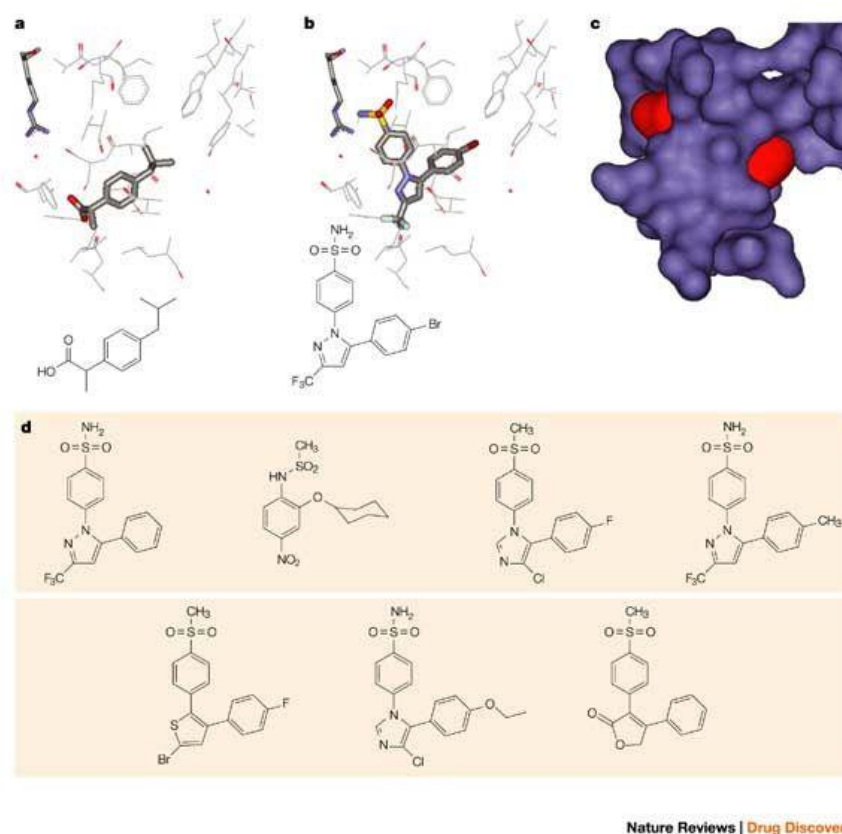


Figure 24. Exemple de *drug design* dans le cas de la recherche d'inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) (Kitchen et al., 2004). Un inhibiteur non sélectif (a), un inhibiteur sélectif (b), une représentation du site de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme (c) et différents inhibiteurs potentiels (d) sont ainsi présentés dans cette étude.

En revanche, cette technique a montré ses limites lors de screenings à grande échelle, puisque la méthode se focalisait principalement sur la cible et non sur le composé actif en tant

que tel, dont l'étude *in silico* ne prend pas en considération un certain nombre de paramètres physiologiques pouvant influencer son action (Sams-Dodd, 2005). Cette problématique s'avère d'autant plus importante lorsqu'il s'agit de cribler des produits naturels, qui consistent généralement en un mélange complexe de plusieurs composés, rendant ainsi l'approche *in silico* désuète et non pertinente (Cos et al., 2006).

II) Les méthodes de screening *in vitro*

Le screening *in vitro* repose sur la notion de « système cellulaire complet », c'est-à-dire que l'expérimentation est réalisée sur un modèle cellulaire vivant plus représentatif des conditions physiologiques que l'approche *in silico*, mais moins que l'approche *in vivo*. En effet, cette approche *in vitro* consiste en l'utilisation d'un ou plusieurs modèles cellulaires afin de se rapprocher au mieux des conditions réelles retrouvées chez l'Homme ou l'animal tout en s'affranchissant des contraintes techniques et éthiques inhérentes à ceux-ci.

Dans le cas des parasites protozoaires apicomplexes, l'approche *in vitro* fait partie intégrante de la découverte de nouveaux composés antiparasitaires. Plusieurs techniques ont été ainsi décrites (Jin et al., 2012; Müller and Hemphill, 2013) et peuvent être mises en œuvre pour le criblage de composés actifs (**Tableau II**).

Tableau II. Exemples de méthodes de screening *in vitro* dans le cas de parasites protozoaires apicomplexes (d'après Müller and Hemphill, 2013).

Technique	Méthode	Organisme
Microscopie	Coloration de cellules infectées et/ou de frottis sanguins + comptage des vacuoles parasitophores ou des parasites	<i>Babesia sp.</i>
		<i>Eimeria spp.</i>
		<i>Neospora caninum</i>
		<i>Toxoplasma gondii</i>
		<i>Sarcocystis neurona</i>
Tests immunologiques	Test ELISA sur cellules infectées	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Quantification d'acides nucléiques	qRT-PCR pour détecter l'ADN génomique du parasite dans des cellules infectées	<i>Besnoitia besnoitii</i>
		<i>C. parvum</i>
		<i>N. caninum</i>
	Incorporation d'un précurseur radioactif dans l'ADN du parasite	<i>T. gondii</i>
		<i>Babesia divergens</i>
Souches transgéniques	Activité du gène rapporteur de la β -galactosidase	<i>Theileria sergenti</i>
		<i>N. caninum</i>
		<i>T. gondii</i>
	Quantification d'une protéine fluorescente	<i>S. neurona</i>
		<i>T. gondii</i>
Viabilité	Quantification d'un colorant absorbé par les parasites vivants par cytométrie en flux	<i>T. gondii</i>
	Quantification des niveaux d'expression d'ARN spécifiques du parasite	<i>S. neurona</i>
		<i>Babesia bovis</i>
		<i>Eimeria tenella</i>
		<i>N. caninum</i>

1) Les tests morphologiques

Les tests morphologiques sont les tests de référence pour l'étude de la prolifération parasitaire. Les structures spécifiques du parasite, telles que la vacuole parasitophore, sont directement visibles après coloration avant comptage. Ces tests sont simples à mettre en œuvre et apportent des informations claires et précises quant à l'efficacité antiparasitaire d'une drogue testée. Cependant, ces expérimentations nécessitent du temps, puisque la croissance cellulaire et la multiplication du parasite sont limitantes. De plus, elles ne sont pas automatisées, à l'inverse de méthodes davantage orientées sur la quantification.

Ces tests sont particulièrement adaptés pour l'étude de drogues anti-*T. gondii*, mais ne le sont pas pour le screening à haut débit. En effet, le screening à haut débit implique une automatisation au moins partielle du procédé (Pereira and Williams, 2007), liée à divers domaines tels que la bio-informatique, la génomique ou la protéomique. Néanmoins, une technique de criblage à haut débit basée sur les tests morphologiques a été décrite pour *T. gondii* (Jin et al., 2009).

2) Les précurseurs radioactifs

Les tests basés sur l'incorporation de précurseurs radioactifs d'acides nucléiques ou de protéines sont essentiellement utilisés pour l'étude de parasites en culture axénique mais aussi dans le cas de parasites dont la croissance est très rapide (Müller and Hemphill, 2013). Cependant, il est possible que l'utilisation de précurseurs radioactifs ne soit pas adaptée au screening *in vitro*. Par exemple, l'uracile tritié (^3H -uracile), qui s'incorpore dans l'ARN, n'est pas pertinent pour le screening *in vitro* de drogues qui pourraient impacter la synthèse d'ARN de la cellule hôte. A l'inverse, dans l'étude de modèles parasitaires tels que *Plasmodium*, qui parasitent les globules rouges, l'utilisation de tels précurseurs est envisageable puisque ces derniers sont dénués d'acides nucléiques (Baniecki et al., 2007).

3) La Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les tests d'incorporation de précurseurs radioactifs sont le plus souvent remplacés par des méthodes faisant appel à la PCR. En effet, au-delà des risques de radioactivité et des contraintes techniques (matériel et locaux adaptés, personnels formés...), les techniques de PCR sont applicables à une grande variété de parasites protozoaires. De plus, ces techniques sont spécifiques et peuvent être utilisées pour quantifier n'importe quel organisme dont des

séquences d'acides nucléiques sont connues. Elles sont souvent utilisées pour l'évaluation de l'efficacité d'une drogue sur un grand nombre de parasites apicomplexes. Bien qu'initialement utilisée à des fins diagnostiques (Costa et al., 2013), la qRT-PCR est parfaitement adaptée au criblage à haut débit de drogues antiparasitaires (Zhang and Zhu, 2015). Néanmoins, ces techniques ont un coût relativement élevé, en plus de comprendre de nombreuses étapes dans leur réalisation.

4) Les souches parasitaires transgéniques

Une autre approche mise en œuvre pour le screening *in vitro* de composés actifs est l'utilisation de souches parasitaires transgéniques (Murata et al., 2017). Ces modèles sont conçus de façon à exprimer des gènes rapporteurs sous le contrôle d'un promoteur. Les gènes rapporteurs les plus courants sont la β -galactosidase, la glucuronidase et la luciférase (Müller and Hemphill, 2013). D'autres modèles transgéniques font appel à des marqueurs fluorescents, tels que la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ou la protéine YFP (Yellow Fluorescent Protein). Ces marqueurs fluorescents permettent de contrôler la croissance parasitaire sans effet délétère pour le parasite ou la cellule hôte et peuvent être appliqués au screening à haut débit (Gubbels et al., 2003).

Les souches sauvages (non transgéniques) de parasites protozoaires sont considérées comme des agents biologiques de classe 2, tandis que les souches parasitaires transgéniques font partie de la classe 3. Ce changement de classe implique également des conditions expérimentales adaptées en termes d'équipements et de consignes de sécurité.

5) Les tests de viabilité

Dans le cas des parasites protozoaires, la majorité d'entre eux nécessite d'être cultivée en présence de cellules hôtes. Par conséquent, des tests de viabilité à base de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) ou de résazurine ne sont pas adaptés pour le screening *in vitro* (Müller and Hemphill, 2013). En effet, ces tests permettent de déterminer la viabilité de tout organisme présent dans l'expérimentation, cellules hôtes incluses. Les résultats obtenus ne sont donc pas représentatifs d'un quelconque effet d'une drogue sur les parasites uniquement. Ces tests peuvent néanmoins être utilisés pour le screening *in vitro* de composés sur des parasites cultivés en conditions axéniques (Serenio et al., 2001).

6) Les tests immunologiques

Enfin, les tests immunologiques sont la dernière catégorie de tests utilisés sur les parasites protozoaires apicomplexes pour les screenings *in vitro* de composés actifs. Ce type de tests a été mis au point sur *T. gondii* pour la première fois en 1985 (Merli et al., 1985). Dans cette étude, le test a été réalisé pour évaluer la croissance de *T. gondii* au sein d'une culture cellulaire. Les auteurs ont également conclu que le test immunologique ainsi développé pouvait être appliqué pour déterminer l'activité *in vitro* de composés anti-*T. gondii*. Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permet de quantifier un antigène parasitaire, défini par l'anticorps utilisé au cours de l'expérimentation, présent dans une culture cellulaire infectée ou dans le milieu de culture. Bien que ces tests soient adaptés au criblage à haut débit, ils nécessitent toutefois un certain nombre d'étapes et des anticorps spécifiques (Müller and Hemphill, 2013).

Dans notre étude, l'outil de criblage moléculaire est basé sur le test ELISA. Malgré ses avantages certains en termes de gain de temps et de nombre de composés pouvant être testés, le criblage à haut débit n'a pas été envisagé ici en regard de la quantité de composés à tester. De même, les souches transgéniques n'ont pas été utilisées du fait de leur appartenance à la classe 3 des risques biologiques, ce qui aurait nécessité un réaménagement complet des salles de culture et du matériel nécessaire pour assurer la sécurité du manipulateur.

III) Les méthodes de screening *in vivo*

Classiquement, les tests *in vivo* sont l'étape consécutive aux tests *in silico* et *in vitro*. La finalité de cette démarche habituelle est d'identifier ou de synthétiser un composé très actif contre le pathogène ciblé tout en restant le moins cytotoxique pour la cellule hôte (notion de sélectivité), et d'obtenir une activité significative chez l'animal, avant de passer aux tests cliniques dans le meilleur des cas.

Cependant, en regard du temps nécessaire et du coût financier qu'engendre le processus classique de découverte d'un composé actif, une nouvelle approche peut être mise en œuvre. Celle-ci consiste en effet à cribler des molécules directement sur des modèles *in vivo*, en évitant les expérimentations *in silico* et *in vitro* (Carroll and Houghten, 2009). Bien que présentant des questionnements relatifs au bien-fondé d'une telle approche d'un point de vue éthique, plusieurs composés démontrés comme étant actifs contre *Plasmodium* ont été mis en évidence par ce

criblage *in vivo* (Calderón et al., 2012; Rueda et al., 2011; Sanz et al., 2011). La faisabilité de cette approche a été évaluée pour la découverte de molécules antipaludiques (Jiménez-Díaz et al., 2013). La démarche scientifique de ce processus de screening a également été détaillée (**Figure 25**) (Jiménez-Díaz et al., 2013).

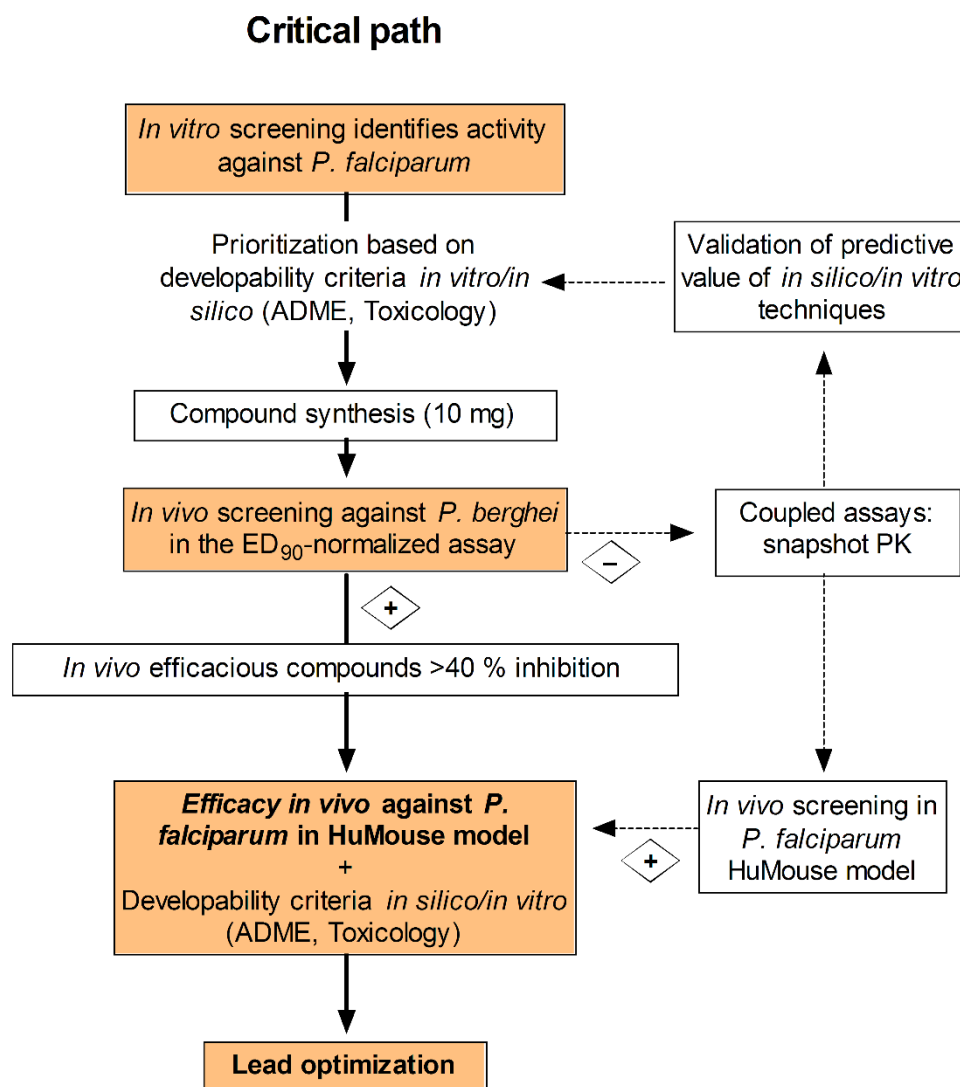


Figure 25. Principe du screening *in vivo* proposé pour le processus de découverte de composés antipaludiques (Jiménez-Díaz et al., 2013).

iii) Ressources naturelles étudiées pour leurs actions antiparasitaires : *Anogeissus leiocarpus* et dix arbres de la région Champagne-Ardenne

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques a toujours existé chez l'Homme et les animaux. Ces derniers peuvent utiliser les plantes de façon instinctive pour traiter ou prévenir une maladie (Bakhiet and Adam, 1995; Russo et al., 2009). Chez l'Homme, la plus ancienne preuve écrite d'utilisation des plantes à usage médicinal date d'il y a 5000 ans en Inde, où une douzaine de préparations à base de 250 espèces de plantes y est décrite (Kelly, 2009). Plus récemment, il a été démontré que l'Homme de Néandertal, ayant vécu entre 300 000 et 28 000 ans avant notre ère, utilisait déjà les plantes pour se soigner (Weyrich et al., 2017). A l'heure actuelle, la médecine traditionnelle est encore très présente dans certaines régions du globe, notamment dans le traitement de maladies parasitaires en Afrique (Freiburghaus et al., 1996) et en Inde (Bhat and Surolia, 2001).

L'utilisation empirique des plantes à des fins thérapeutiques a soulevé la question des molécules responsables de ces effets bénéfiques pour l'Homme. Ainsi, les métabolites secondaires font partie des nombreux composés à potentiel thérapeutique présents dans les différentes parties des plantes, et notamment des arbres. L'écorce constituant une interface entre l'organisme végétal et le milieu extérieur potentiellement hostile, les métabolites extraits des écorces sont potentiellement de bons candidats pour trouver des agents protecteurs face à divers pathogènes ou agressions. Parmi eux se retrouvent des terpénoïdes, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des stilbènes, des tanins et d'autres composés phénoliques (Croteau et al., 2000).

Il est important de souligner que la biomasse forestière représente la biomasse la plus importante sur la planète (Dajoz, 2006). De ce fait, les enjeux écologiques et économiques qui découlent de cette biomasse sont très importants. La valorisation de sous-produits de la filière bois, dans des secteurs à haute valeur ajoutée tels que l'industrie cosmétique ou pharmaceutique, permettrait d'améliorer davantage la compétitivité de cette filière tout en s'inscrivant dans les problématiques environnementales auxquelles nous sommes confrontés quotidiennement (déforestation, gaspillage des ressources naturelles...).

I) Le bouleau d'Afrique (*Anogeissus leiocarpus*)

1) Généralités

Anogeissus leiocarpus (DC) Guill. et Perr., ou bouleau d'Afrique, est un arbre de la famille des Combretaceae. Il se retrouve principalement dans les zones boisées et la savane d'Afrique de l'Ouest, du Sénégal au Cameroun. Cet arbre peut mesurer jusqu'à 18 mètres de hauteur pour un mètre de diamètre (**Figure 26A**). L'écorce est grise et d'aspect écailleux (**Figure 26B**). Les feuilles sont alternes, caduques, de forme lancéolée. Les fleurs sont jaunes, en forme de globe et dénuées de pétale (**Figure 26C**). Elles sont hermaphrodites.

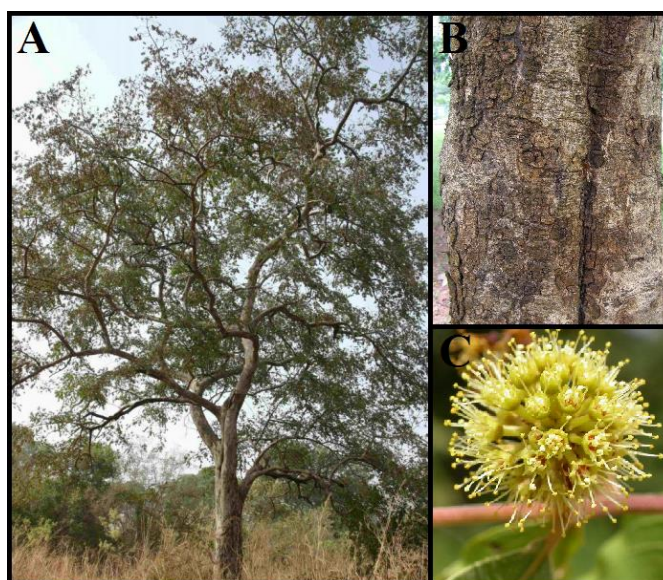


Figure 26. Caractéristiques morphologiques d'*Anogeissus leiocarpus*. Le port de l'arbre (A), l'écorce (B) (© Ralf Biechele) et une fleur (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le bois d'*Anogeissus leiocarpus* est un bois dur imputrescible et résistant aux insectes. Ces propriétés font de lui un matériau prisé en menuiserie et en construction (CTFT, 1989). Son pouvoir calorifique est très élevé, d'où son utilisation répandue comme bois de chauffage particulièrement apprécié (von Maydell, 1983). Cet arbre est aussi et surtout largement utilisé en médecine traditionnelle africaine. Par exemple, au Soudan, une décoction à base d'écorce d'*A. leiocarpus* est utilisée pour lutter contre la toux, les vomissements et les rhumatismes, tandis qu'au Nigeria, des bâtonnets d'écorce sont utilisés comme pâte à mâcher pour l'hygiène buccodentaire (Arbab, 2014; Taiwo et al., 1999). Il est également intéressant de souligner qu'il est utilisé pour traiter des maladies parasitaires, telles que le paludisme (Ndjonka et al., 2012),

la maladie du sommeil et la leishmaniose (Okpekon et al., 2004), ainsi que d'autres pathologies (Okpekon et al., 2004; Taiwo et al., 1999). Au Togo, la décoction de ses feuilles est utilisée pour lutter contre diverses infections fongiques (Arbab, 2014).

3) Caractérisation chimique

Au sein de l'écorce se trouvent de nombreux constituants chimiques dont la plupart sont des métabolites secondaires. D'après plusieurs criblages phytochimiques, l'écorce est riche en tanins, en flavonoïdes, en terpènes et en saponines (Hubert et al., 2014). A l'inverse, elle est dépourvue d'alcaloïdes (Arbab, 2014). Des composés polyphénoliques ont également été identifiés tels que les acides 3,4,3'-tri-*O*-méthyflavellagique et 3,3'-di-*O*-méthylellagique, l'acide ellagique, l'acide séricique ou encore l'acide gallique (Arbab, 2014; Hubert et al., 2014). De nombreux autres composés sont également présents dans l'écorce d'*A. leiocarpus* (Arbab, 2014; Hubert et al., 2014).

II) **Le hêtre commun (*Fagus sylvatica*)**

1) Généralités

Fagus sylvatica L., ou hêtre commun, est un arbre appartenant à la famille des Fagaceae. Il constitue la majorité des forêts européennes, avec une distribution s'étalant du nord du Portugal à la Suède en passant par le sud de l'Angleterre et l'Ukraine. Le hêtre commun peut atteindre une hauteur de 35 mètres pour une circonférence de presque deux mètres pour les arbres centenaires (**Figure 27A**). L'écorce du hêtre commun est facilement reconnaissable de par son aspect lisse et régulier (**Figure 27B**). Elle est de couleur gris-noir mais apparaît le plus souvent gris argenté à cause de la présence de lichens à la surface du tronc. C'est une écorce relativement mince qui persiste durant toute la vie de l'arbre. Les feuilles sont alternes, caduques, de forme ovale. Les fleurs ne disposent pas de pétale (**Figure 27C**). Le hêtre commun est une espèce monoïque.

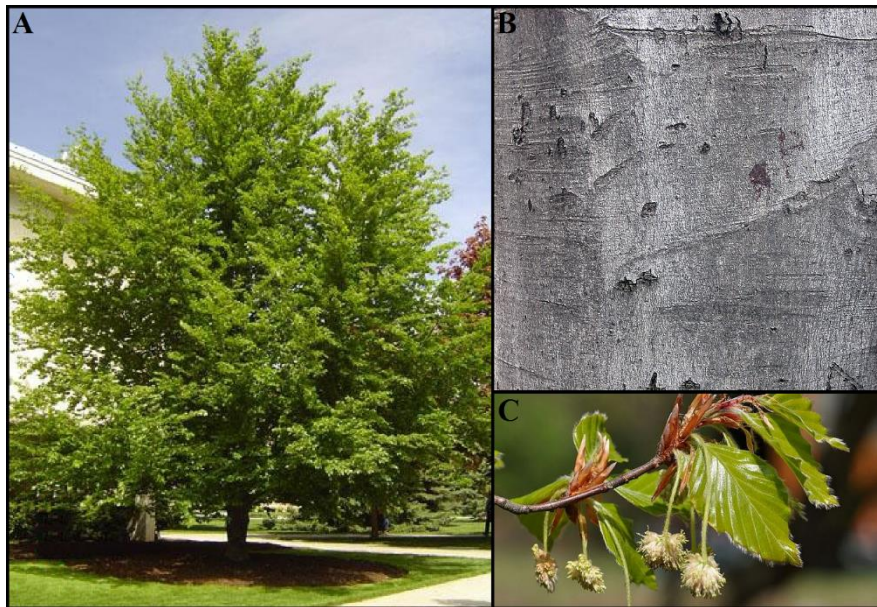


Figure 27. Caractéristiques morphologiques de *Fagus sylvatica*. Le port de l'arbre (A), l'écorce (B) et les feuilles et fleurs (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le hêtre commun est utilisé dans de nombreux domaines par l'Homme. Il est la principale source de bois de chauffage en Europe centrale, et son bois est utilisé comme matériau dans la fabrication de meubles ou d'ustensiles. C'est également une source de fibres pour la fabrication du papier. Ses fruits, les fânes, sont parfois utilisés dans une moindre mesure dans l'alimentation humaine et animale. En médecine traditionnelle, la décoction d'écorce séchée est utilisée comme antipyrétique (Fleury de la Roche, 1937). L'écorce est également utilisée sous forme de poudre dans le traitement de la goutte, des rhumatismes et de diverses affections cutanées (Fleury de la Roche, 1937). Récemment, les propriétés anti-herpétiques et antitussives de sulfates de glucuronoxylanes extraits à partir de poudre de sciure ont été mises en évidence (Nosál'ova et al., 2014; Pujol et al., 2016). De plus, l'extrait de feuilles de hêtre aurait un effet antibactérien vis-à-vis d'*Escherichia coli* (Nicu et al., 2016). L'extrait méthanol de l'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Peu de données scientifiques détaillent la caractérisation chimique des différentes parties du hêtre commun après extraction. Ainsi, plusieurs publications font part de la présence de glucuronoxylanes (Nosál'ova et al., 2014; Pujol et al., 2016), qui sont des polymères d'acide glucuronique et de xylose. Une étude plus récente décrit également la présence de polyphénols,

d'acides gras et de triterpènes (Hubert et al., 2016). Des composés phénoliques ont été identifiés dans la sciure du hêtre commun (Mämmelä, 2001).

III) Le chêne pédonculé (*Quercus robur*)

1) Généralités

Quercus robur L., ou chêne pédonculé, est un arbre de la famille des Fagaceae. Il est très répandu en Amérique du Nord et en Europe, sauf sur le littoral méditerranéen, dont le climat est peu adapté à son développement. En France, environ 30% de la superficie des forêts est recouverte par le chêne pédonculé, soit 1,35 millions d'hectares. Cet arbre peut atteindre une hauteur de 40 mètres et au-delà (**Figure 28A**). Son écorce est sombre, épaisse et crevassée (**Figure 28B**). Ses feuilles sont caduques, alternes et lobées. Les fleurs ne possèdent pas de pétale (**Figure 28C**). Le chêne pédonculé est une espèce monoïque.



Figure 28. Caractéristiques morphologiques de *Quercus robur*. Le port de l'arbre (A) (© Gilles Montavon), l'écorce (B) et les feuilles et fleurs (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le chêne fournit un bois très utilisé par l'Homme dans de nombreux domaines. Il sert à la fabrication de bateaux, de meubles, des tonneaux de vin, de structures et d'ustensiles divers et variés mais aussi de charpente dans les constructions domestiques ou de grands monuments. Il est également utilisé comme bois de feu et les fibres du bois servent à la préparation de pâte à

papier. En médecine traditionnelle, l'extrait aqueux de chêne est utilisé dans le traitement externe des lésions cutanées pour ses propriétés antibactériennes (Brantner and Grein, 1994). En tisane, il confère des effets anti-diarrhéiques et améliore la digestion.

Récemment, plusieurs études ont démontré l'efficacité d'extraits de chêne pédonculé dans différentes problématiques de santé. Ainsi, l'extrait d'écorce permet d'améliorer les performances sportives et la récupération après un effort intense (Vinciguerra et al., 2015). Les polyphénols présents dans cet extrait aident les patients dépressifs à surmonter leur dépression (Trebatická and Ďuračková, 2015). De plus, les triterpénoïdes contenus dans le bois possèdent une activité anticancéreuse sur des cellules de cancer du sein (Pérez et al., 2017). Enfin, l'extrait aqueux d'écorce de chêne pédonculé est capable d'inhiber l'activité cytotoxique de l'hémolysine produite par *Vibrio cholerae*, agent pathogène responsable du choléra (Markina et al., 2013). L'extrait méthanol de l'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Peu d'études ont été entreprises pour caractériser chimiquement les métabolites présents dans l'écorce du chêne pédonculé. Toutefois, comme tout arbre, des polyphénols sont retrouvés dont des ellagitannins, des triterpènes et des flavonoïdes (Zhang et al., 2015a). Une étude fait également l'inventaire des catéchines et proanthocyanidines présentes chez le chêne pédonculé (Kuliev et al., 1997).

IV) **L'aune glutineux (*Alnus glutinosa*)**

1) Généralités

Alnus glutinosa L., ou aune glutineux, appartient à la famille des Betulaceae. Cet arbre se retrouve dans toute l'Europe, y compris les îles britanniques, l'ouest de la Russie et la Scandinavie, ainsi qu'en Turquie sur le pourtour de la mer Noire et au nord du Maroc et de la Tunisie. Le tronc peut atteindre une hauteur comprise entre 20 et 30 mètres (**Figure 29A**). Son écorce est brune et crevassée (**Figure 29B**). Les feuilles sont caduques, alternes, ovales, légèrement dentelées et tronquées en pointe. Les fleurs, appelées chatons, sont dépourvues de pétale (**Figure 29C**). L'aune glutineux est une espèce monoïque.

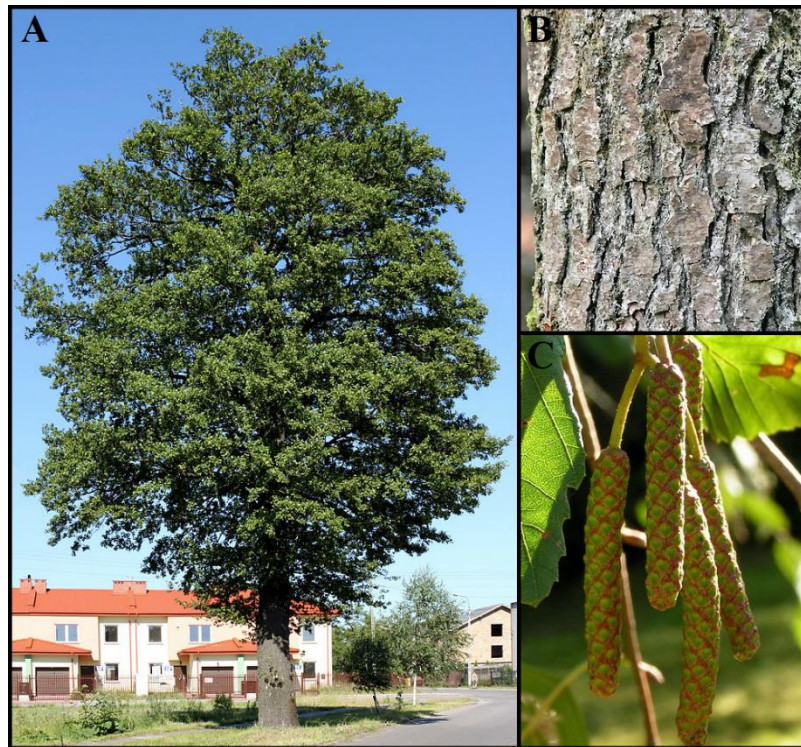


Figure 29. Caractéristiques morphologiques d'*Alnus glutinosa*. Le port de l'arbre (A), l'écorce (B) et les feuilles et chatons mâles (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

L'aulne glutineux est utilisé par l'Homme pour la stabilisation et la consolidation des rives des cours d'eau. En effet, son système racinaire est particulièrement développé, ce qui permet de maintenir une bonne cohésion du sol. Il est également utilisé pour l'assainissement et l'enrichissement des sols précédant toute plantation forestière ou agricole. Au siècle dernier, son bois servait surtout aux verriers et aux boulangers pour fournir un feu rapide, intense, avec très peu de fumée. Son imputrescibilité dans l'eau a été mise à profit pour la construction de Venise, dont une partie de la ville serait bâtie sur des pilotis en aulne (Houston-Durrant et al., 2016). La décoction d'écorce d'*Alnus glutinosa* est utilisée en médecine traditionnelle pour lutter contre la fièvre, les inflammations bucco-pharyngées et les rhumatismes, entre autres (Sati et al., 2011). Les propriétés anti-inflammatoires d'extrait d'écorce d'aulne glutineux, *via* l'inhibition du TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) pro-inflammatoire, ont récemment été démontrées (Acero and Muñoz-Mingarro, 2012). Les feuilles et l'écorce d'aulne glutineux contiennent des diarylheptanoïdes, molécules dont les propriétés anti-tumorales (Dinić et al., 2014, 2016; León-Gonzalez et al., 2014), régénératives (Dinić et al., 2015) et antibactériennes (Abedini et al., 2016; Sati et al., 2011) ont été mises en évidence.

3) Caractérisation chimique

De par ses nombreuses propriétés bénéfiques, la composition des différentes parties de la plante a été largement étudiée et chimiquement caractérisée. Ainsi, Sati et al. décrivent la présence d'espèces chimiques de type terpènes, flavonoïdes, diarylheptanoïdes (orégonine), phénols, stéroïdes et tanins, entre autres (Sati et al., 2011). Parmi les terpènes se retrouvent, par exemple, l'acide bétulinique, la lupénone et l'alnusénone (Abedini et al., 2016). D'autres études font état de phénols et terpènes retrouvés dans les feuilles et l'écorce (Dahija et al., 2014).

V) **Le merisier (*Prunus avium*)**

1) Généralités

Prunus avium L., ou merisier, est un arbre appartenant à la famille des Rosaceae. Il se retrouve essentiellement en Europe, mais aussi en Afrique du nord et en Asie occidentale. Le tronc peut atteindre une hauteur de 25 mètres, pour un diamètre inférieur à un mètre (**Figure 30A**). L'écorce est fine, de couleur grise pouvant aller vers le rouge-brun pour les jeunes spécimens, et présentant des exfoliations horizontales (**Figure 30B**). Les feuilles sont caduques, alternes, dentées et ont une forme elliptique. Les fleurs sont blanches et disposées en petits bouquets (**Figure 30C**). Le merisier est une espèce allogame.

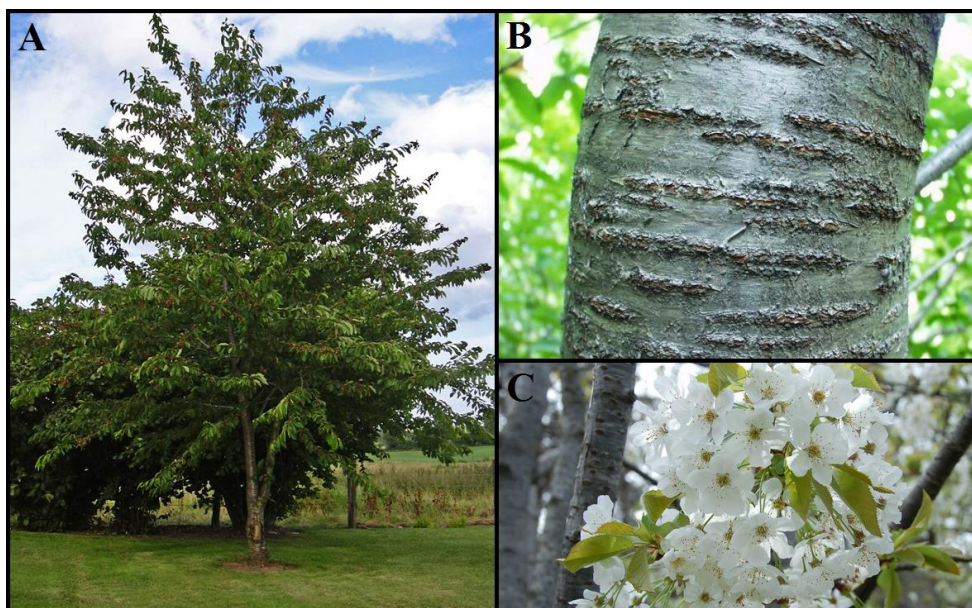


Figure 30. Caractéristiques morphologiques de *Prunus avium*. Le port de l'arbre (A) (© Eric Lhote), l'écorce (B) et les feuilles et fleurs (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le bois du merisier est utilisé comme bois d'ameublement. Autrefois, il servait aussi à la fabrication de divers objets, allant des rampes d'escaliers aux tonneaux, en passant par des bobines de soieries. Il sert également de protecteur d'espèces cultivées puisque les oiseaux sont attirés par ses fruits, les merises, laissant les autres arbres à proximité libres de se développer. Les merises sont également appelées « cerises douces » et sont largement consommées par l'Homme. En décoction, elles présentent des propriétés cicatrisantes, diurétiques et toniques (Bown, 1995; Chiej, 1984; Grieve, 1984). La résine issue du tronc du merisier est utilisée en inhalation comme antitussif (Chiej, 1984). Récemment, il a été démontré que l'extrait éthanol de pétioles avait un effet antibactérien sur une souche d'*Escherichia coli* résistante aux antibiotiques (Radojica Rovčanin et al., 2015), de même que la tige des merises sur une souche sensible aux antibiotiques (Aires et al., 2017). L'extrait méthanol de l'écorce, quant à lui, a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Plusieurs études récentes ont permis de caractériser différentes espèces chimiques présentes dans les merises, telles que les flavonoïdes et des composés phénoliques (Aires et al., 2017; Commisso et al., 2017). Une caractérisation chimique globale des espèces chimiques retrouvées dans l'écorce de l'arbre a également été réalisée récemment, révélant la présence de polyphénols, d'acides gras et de triterpènes (Hubert et al., 2016).

VI) **L'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*)**

1) Généralités

Acer pseudoplatanus L., ou érable sycomore, appartient à la famille des Aceraceae. Cet arbre se retrouve en Europe de l'ouest et centrale jusqu'en Russie occidentale, ainsi que sur le pourtour méditerranéen et en Turquie. L'érable sycomore peut atteindre une hauteur de 40 mètres pour un diamètre maximal de 3,5 mètres (**Figure 31A**). L'écorce a un aspect lisse et gris, d'autant plus foncée et craquelée que l'arbre est âgé (**Figure 31B**). Les feuilles sont caduques, alternes et palmées (**Figure 31C**). Les fleurs sont verdâtres, groupées entre elles (**Figure 31C**) et leur particularité repose sur le fait qu'elles apparaissent au même moment que les feuilles.

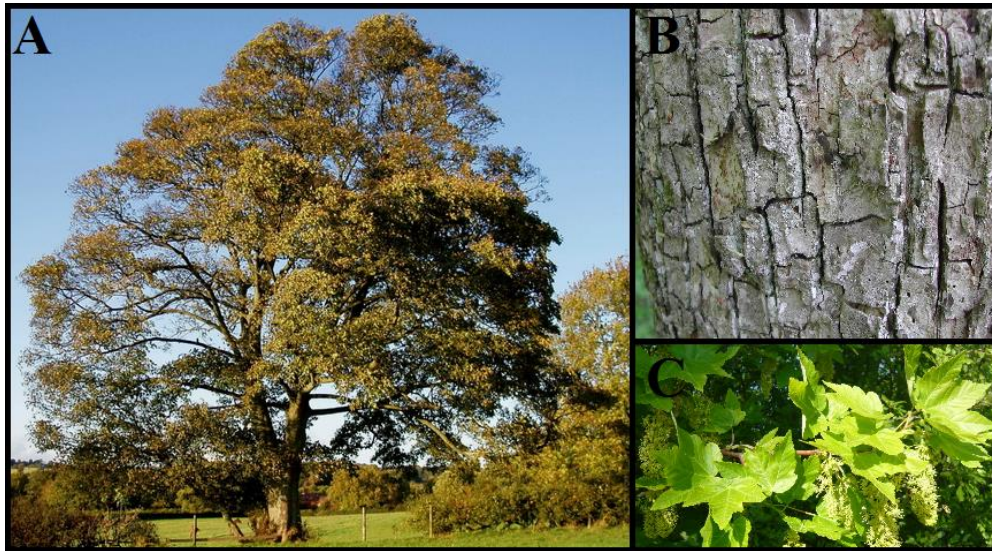


Figure 31. Caractéristiques morphologiques d’*Acer pseudoplatanus*. Le port de l’arbre (A), l’écorce (B) (© Roland Gissinger) et les feuilles et fleurs (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l’Homme

L’érable sycomore est utilisé comme arbre d’ornement, essentiellement aligné le long des routes ou dans les parcs. C’est une essence très répandue dans les zones de reboisement de par sa croissance rapide. Son bois est utilisé en ébénisterie et en lutherie pour la fabrication des violons. C’est également un bois de chauffage très apprécié. En médecine traditionnelle, l’écorce de l’érable sycomore aide à la cicatrisation (Lust, 1983). Il a été démontré que l’extrait méthanol de l’écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Très peu d’études scientifiques se sont focalisées sur la caractérisation chimique des différentes parties de l’érable sycomore. Seule une étude portant sur les espèces chimiques présentes dans les feuilles a été réalisée, montrant ainsi la présence de tanins, flavonoïdes, terpènes et autres (Zhang et al., 2015b). Plus récemment, une caractérisation chimique globale des composés retrouvés dans l’écorce de l’arbre a également été réalisée (Hubert et al., 2016).

VII) Le frêne commun (*Fraxinus excelsior*)

1) Généralités

Fraxinus excelsior L., ou frêne commun, est un arbre de la famille des Oleaceae. Son aire de répartition s'étend des îles britanniques à l'ouest de la Russie, en passant par le nord de l'Espagne et de la Turquie. Il peut mesurer jusqu'à 70 mètres de hauteur (**Figure 32A**). Son tronc est lisse, de couleur grise, et présente des crevasses à mesure que l'arbre vieillit (**Figure 32B**). Les feuilles sont caduques, opposées et composées. Les fleurs sont rouges et composées, regroupées en grappes appelées panicules (**Figure 32C**).

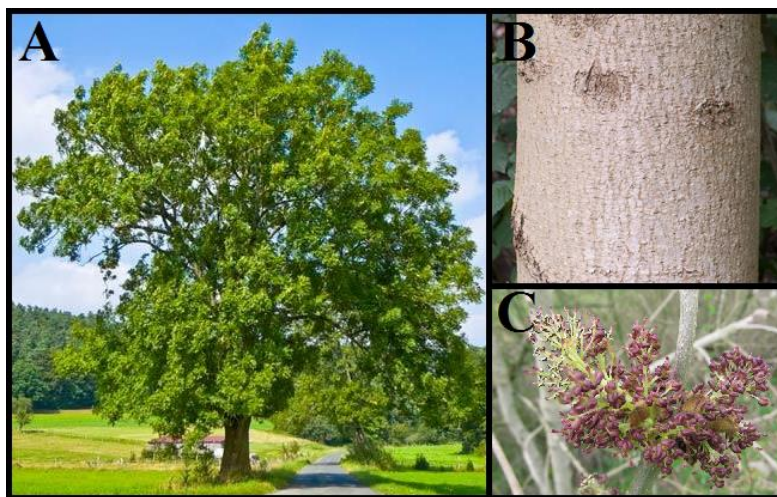


Figure 32. Caractéristiques morphologiques de *Fraxinus excelsior*. Le port de l'arbre (A), l'écorce (B) (© Paul Kirtley) et les fleurs (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Tout comme l'érable sycomore, le frêne commun est un arbre d'ornement et reboisement. Particulièrement souple et résistant, son bois sert à la fabrication d'outils résistants aux chocs (râteaux, crosses de hockey...). Il est également apprécié en tant que bois chauffage. Les feuilles sont utilisées en fourrage pour les animaux de ferme. En médecine traditionnelle, les feuilles et l'écorce ont des propriétés laxatives, antipyrétiques, diurétiques et anti-inflammatoires. Ces dernières ont été prouvées scientifiquement (Schempp et al., 2000; Wright et al., 2007). L'extrait aqueux de graines de frêne commun a une activité hypoglycémiant chez des souris diabétiques (Maghrani et al., 2004) et obèses (Montó et al., 2014) mais également chez des patients en bonne santé (Visen et al., 2009). Des propriétés anticancéreuses ont été mises en évidence *in vitro* sur différents modèles de carcinomes humains (Sardari et al., 2009). L'extrait méthanol d'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al.,

2016). Les extraits éthanol et toluène d'écorce sont capables d'inhiber la prolifération de *Plasmodium falciparum* (Aydin-Schmidt et al., 2010). L'extrait éthanol d'écorce inhibe l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR) (Strehl et al., 1995).

3) Caractérisation chimique

Une étude a permis de mettre en lumière la présence de composés phénoliques dans la sciure de frêne commun (Mämmelä, 2001). Plus récemment, une caractérisation chimique globale des composés retrouvés dans l'écorce de l'arbre a également été réalisée, tels que des polyphénols, des acides gras et des triterpènes (Hubert et al., 2016).

VIII) Le peuplier robusta (*Populus robusta*)

1) Généralités

Populus robusta Schneid., ou peuplier robusta, appartient à la famille des Salicaceae. Il se retrouve principalement en Europe occidentale, au sud de la Scandinavie et en Amérique du nord. Sa hauteur peut atteindre les 30 mètres (**Figure 33A**). L'écorce est de couleur pâle, lisse chez les jeunes spécimens mais qui devient crevassée avec le temps (**Figure 33B**). Les feuilles sont caduques, alternes et triangulaires. Comme pour l'aulne glutineux, les fleurs sont sous forme de chatons (**Figure 33C**).

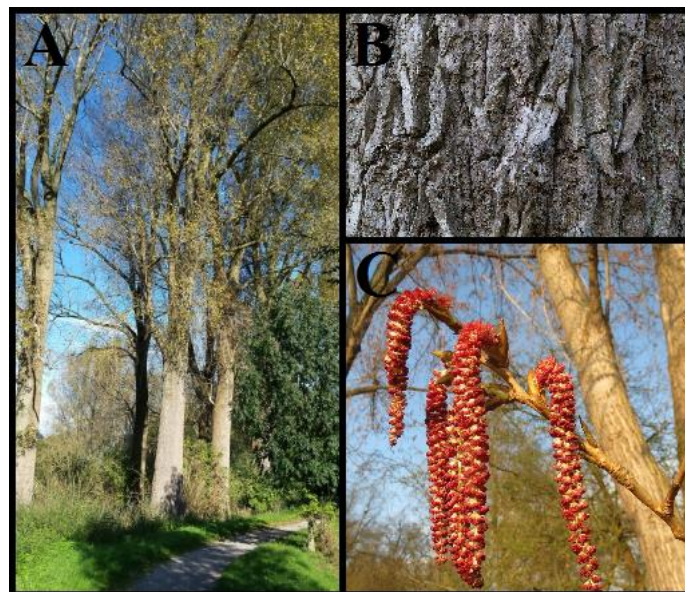


Figure 33. Caractéristiques morphologiques de *Populus robusta*. Le port de l'arbre (A), l'écorce (B) (© Alex Hyde) et les chatons (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le bois de peuplier était autrefois utilisé comme bois de charpente. De nos jours, il sert à la fabrication de panneaux de contreplaqué, d'emballages à destination de l'alimentation (fromages, fruits et légumes, fruits de mer), de palettes de transport et de pâte à papier. En médecine traditionnelle, l'écorce est utilisée comme antidouleur, anti-inflammatoire et antipyrétique notamment grâce à la présence de salicine qui se transforme en acide salicylique dans l'organisme (Bown, 1995). L'extrait méthanol d'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Récemment, une caractérisation chimique globale des composés retrouvés dans l'écorce de l'arbre a été réalisée, mettant en évidence la présence de polyphénols, d'acides gras et de triterpènes (Hubert et al., 2016). Aucune autre donnée scientifique n'est disponible quant à la composition de l'écorce, bien que d'anciennes études aient pu mettre en évidence la présence de composés antifongiques hydrosolubles (Grosjean, 1950).

IX) **Le mélèze d'Europe (*Larix decidua*)**

1) Généralités

Larix decidua Mill., ou mélèze d'Europe, est un arbre appartenant à la famille des Pinaceae. Il se retrouve essentiellement dans les zones montagneuses d'Europe centrale, mais l'Homme l'a implanté dans les plaines. Sa répartition s'étend donc des îles britanniques à l'Ukraine jusqu'au Danemark. Il peut atteindre une hauteur de 40 mètres de haut pour 1,50 mètre de diamètre (**Figure 34A**). Son écorce est grisâtre, crevassée et particulièrement épaisse chez les vieux spécimens (**Figure 34B**). Les feuilles sont des aiguilles insérées en rosette et concentrées en touffes le long des rameaux. Contrairement aux autres conifères d'Europe, les aiguilles du mélèze chutent en hiver. Dépourvu de fleur, l'appareil reproducteur consiste en des cônes mâles (jaunes) et femelles (roses-bruns) (**Figure 34C**).

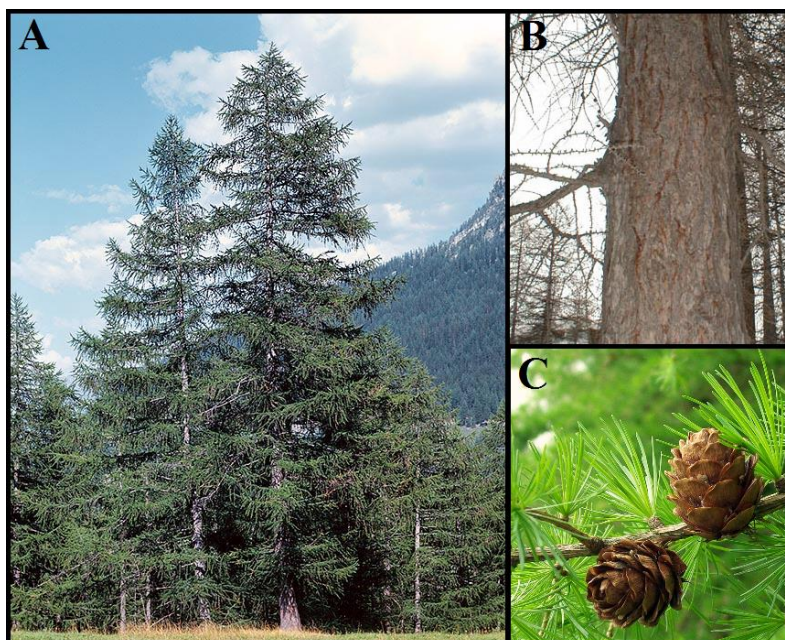


Figure 34. Caractéristiques morphologiques de *Larix decidua*. Le port de l'arbre (A) (© Giuseppe Mazza), l'écorce (B) et les aiguilles et cônes (C) (© Peter O'Connor) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le bois du mélèze d'Europe est utilisé dans la construction de charpente, panneaux à particules, clôtures mais aussi en menuiserie. L'écorce est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter la cystite (Bown, 1995; Grieve, 1984). Elle présente également des propriétés cicatrisantes, balsamiques, laxatives, expectorantes, diurétiques et favorise la production de globules blancs (Bown, 1995; Grieve, 1984; Lust, 1983). Cette propriété se retrouve également dans la « manne de Briançon », un suintement provenant des aiguilles du mélèze en été (Grieve, 1984). La résine est antiseptique, balsamique, diurétique, hémostatique et vermifuge (Bown, 1995; Grieve, 1984). Des études scientifiques ont démontré *in vitro* les effets anti-inflammatoires de la sciure (Pferschy-Wenzig et al., 2008) et anticancéreux de l'écorce sur des cellules cancéreuses de colon, de prostate et de glioblastome (Frédérich et al., 2009). L'extrait méthanol de l'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Des composés phénoliques, tanins et carbohydrates présents dans l'extrait aqueux d'écorce de mélèze d'Europe ont été caractérisés (Bianchi et al., 2015). Récemment, une caractérisation chimique globale des composés retrouvés dans l'écorce de l'arbre a été réalisée, mettant en évidence la présence de terpènes, d'acides gras et de polyphénols (Hubert et al., 2016).

X) L'épicéa commun (*Picea abies*)

1) Généralités

Picea abies L., ou épicéa commun, appartient à la famille des Pinaceae. Au même titre que le mélèze d'Europe, l'épicéa commun est un conifère qui se retrouve dans les zones montagneuses, bien que l'Homme l'ait introduit dans les plaines. Son aire de distribution s'étend de l'Europe de l'Ouest à la Russie et la Scandinavie. Le tronc peut atteindre environ 50 mètres pour 1,50 mètre de diamètre (**Figure 35A**). L'écorce est brune et écaillée (**Figure 35B**). Ses feuilles sont des aiguilles solitaires disposées en brosse. Les cônes mâles sont jaunes et les cônes femelles rouges-bruns. (**Figure 35C**). L'épicéa commun est une espèce monoïque.



Figure 35. Caractéristiques morphologiques de *Picea abies*. Le port de l'arbre (A), l'écorce (B) (© Glenn Dreyer) et les aiguilles et cônes (C) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Dans la culture populaire, l'épicéa commun est utilisé comme arbre d'ornement, notamment lors des festivités de Noël, sous l'appellation de « sapin de Noël ». Son bois sert à la construction de charpentes, de poteaux, d'emballages, de panneaux à particules et à l'élaboration de pâte à papier. Les chutes de scierie sont transformées en granulés pour le chauffage domestique ou en plaquettes pour le chauffage industriel. En médecine traditionnelle, l'épicéa commun est utilisé pour ses propriétés antiseptiques, balsamiques, expectorantes, sédatives et antibiotiques (Chiej, 1984). Ces propriétés ont été démontrées dans différentes études scientifiques (Cosentino et al.,

2010; Fyhrquist et al., 2017; Rautio et al., 2007, 2012, Sipponen et al., 2008, 2012). L'extrait méthanol de l'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Plusieurs études font état des différentes espèces chimiques présentes dans l'écorce et le bois de l'épicéa commun. Ainsi, la présence de terpènes (Granström, 2010), de polysaccharides (Shakhmatov et al., 2017) et de composés phénoliques (Pan and Lundgren, 1995) a été mise en évidence. La présence de différents métabolites présents dans l'extrait méthanol d'écorce, tels que des flavonoïdes, stilbènes et autres composés phénoliques, a été décrite (Angelis et al., 2016).

XI) Le tremble d'Europe (*Populus tremula*)

1) Généralités

Populus tremula L., ou tremble d'Europe, appartient à la famille des Salicaceae. Cet arbre est extrêmement répandu en Eurasie. Sa hauteur peut atteindre 30 mètres de haut (**Figure 36A**). L'écorce est lisse, blanche, parsemée de lenticelles en forme de losange et présente des crevasses à mesure que l'arbre vieillit (**Figure 36B**). Ses feuilles sont caduques, alternes, arrondies et crénelées. Les fleurs sont groupées en chatons, gris-rouges pour les mâles et verts pour les femelles (**Figure 36C**). Le tremble d'Europe est un arbre dioïque.

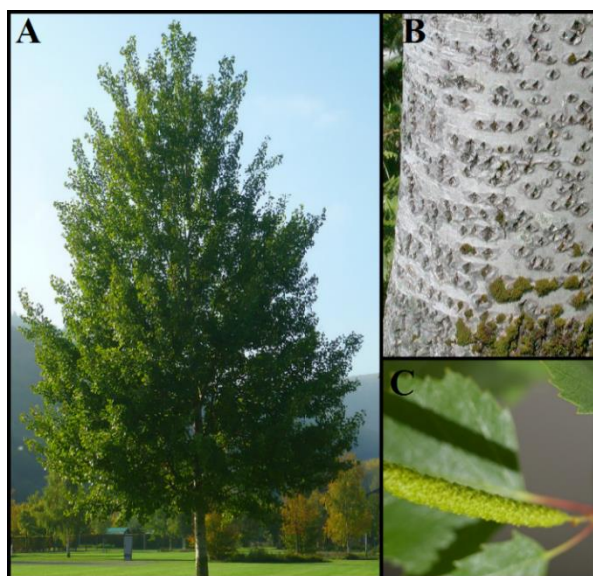


Figure 36. Caractéristiques morphologiques de *Populus tremula*. Le port de l'arbre (A) (© Jörg Paul Kaspari), l'écorce (B) (© Carl Farmer), les feuilles et un chaton femelle (C) (© Michel Pourchet) sont ainsi présentés.

2) Utilisation par l'Homme

Le bois de tremble d'Europe est utilisé pour la fabrication de pâte à papier, d'allumettes, de panneaux de meubles et d'emballages. L'écorce est utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés antipyrétiques, anti-inflammatoires, analgésiques, diurétiques et expectorantes (Launert, 1981). Diverses études scientifiques font état de l'activité anti-oxydante (Meyer et al., 1995), antibactérienne (Faustova et al., 2006), antiulcéreuse (Krylova et al., 2000) et anticancéreuse (Razina et al., 1998) d'extraits aqueux ou alcools d'écorce de tremble d'Europe. L'extrait éthanol d'écorce inhibe l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR) (Strehl et al., 1995). L'extrait méthanol de l'écorce a un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Hubert et al., 2016).

3) Caractérisation chimique

Peu d'études se sont penchées sur la composition et la caractérisation chimique de l'écorce de *Populus tremula*. Ainsi, une étude fait mention de la présence de composés phénoliques et de carbohydrates (Repas and Nikolin, 1968) tandis qu'une autre s'est focalisée sur l'identification de certains glycosides (Jossang et al., 1994). Plus récemment, une caractérisation chimique globale des composés retrouvés dans l'écorce de l'arbre a été réalisée, décrivant la présence de terpènes, de polyphénols et d'acides gras (Hubert et al., 2016).

XII) Récapitulatif des dix essences de la région Champagne-Ardenne

Le **Tableau III** récapitule, d'après les données recueillies dans la littérature, les différentes propriétés antimicrobiennes des dix essences étudiées ainsi que certains types de métabolites retrouvés dans les écorces et ayant été caractérisés chimiquement.

Tableau III. Récapitulatif des propriétés antimicrobiennes des dix essences de la région Champagne-Ardenne étudiées, focalisé sur certains métabolites primaires et secondaires caractérisés au sein de leurs écorces respectives.

Essence de la région Champagne-Ardenne		Famille	Activité antimicrobienne <i>in vitro</i> avérée (bactéries, parasites, virus)	Métabolites caractérisés (écorce)	Références
Nom latin	Nom vernaculaire				
<i>Fagus sylvatica</i> L.	Hêtre commun	Fagaceae	<i>Escherichia coli</i> (feuilles) <i>Herpes simplex virus</i> (tronc) <i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Catéchine et dérivés, taxifoline et dérivés, quercétine et dérivés, acides gras, terpènes	Hubert et al., 2016 Mämmeli, 2001
<i>Quercus robur</i> L.	Chêne pédonculé	Fagaceae	<i>Vibrio cholerae</i> (écorce) <i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Vescalagine, castalagine, roburine et autres ellagtanins, catéchine et dérivés, acide gallique, acide gentisique et autres polyphénols et terpènes	Kuliev et al., 1997 Zhang et al., 2015a
<i>Alnus glutinosa</i> L.	Aulne glutineux	Betulaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Orégonine, acide bêtaulique, acide glutinique, alhusénone, hirsutanonol, genkwanine, rhododendrine, autres polyphénols, terpènes et flavonoïdes	Abedini et al., 2016 Dahija et al., 2014 Sati et al., 2011
<i>Prunus avium</i> L.	Merisier	Rosaceae	<i>Escherichia coli</i> (pétiole, pédoncule) <i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Polyphénols, acides gras et terpènes	Hubert et al., 2016
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Erable sycomore	Aceraceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Polyphénols, acides gras et terpènes	Hubert et al., 2016
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Frêne commun	Oleaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (écorce) <i>Plasmodium falciparum</i> (écorce)	Polyphénols, acides gras et terpènes	Hubert et al., 2016
<i>Populus robusta</i> Schneid.	Peuplier robuste	Salicaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Polyphénols, acides gras et terpènes	Hubert et al., 2016
<i>Larix decidua</i> Mill.	Méleze d'Europe	Pinaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Catéchine et dérivés, robinétinidol, et autres polyphénols, acides gras et terpènes	Bianchi et al., 2015 Hubert et al., 2016
<i>Picea abies</i> L.	Epicéa commun	Pinaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (aiguilles et écorce) <i>Enterococcus faecalis</i> (aiguilles et écorce) <i>Candida glabrata</i> (aiguilles et écorce) <i>Candida albicans</i> (aiguilles et écorce) <i>Bacillus cereus</i> (aiguilles et écorce) <i>Salmonella enterica</i> (aiguilles et écorce) <i>Staphylococcus aureus</i> (aiguilles et écorce)	Catéchine et dérivés, taxifoline et dérivés, acide déshydroabiétique, stilbènes et autres polyphénols, acides gras et terpènes	Angelis et al., 2016 Granström, 2010 Pan and Lundgren, 1995
<i>Populus tremula</i> L.	Tremble d'Europe	Salicaceae	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (écorce) <i>Haemophilus influenzae</i> (écorce) <i>Staphylococcus aureus</i> (écorce)	Polyphénols, acides gras et terpènes	Hubert et al., 2016 Repas and Nikolin, 1968

iv) Présentation de la Pathogen Box

I) Historique

La fondation Medicines for Malaria Venture (MMV) a pour objectif initial de développer et de faciliter la distribution de nouvelles drogues antipaludiques potentielles à un coût abordable pour les pays touchés par cette pathologie.

Pour aider à atteindre cet objectif, MMV a mis en place la Malaria Box en 2011 (**Figure 37**). Ce concept se traduit par la distribution gratuite de 400 molécules de synthèse, regroupées sur un ensemble de cinq plaques 96 puits, dont la cible potentielle est *P. falciparum*. Ces 400 molécules ont été sélectionnées par les laboratoires GSK (Glaxo Smith Kline), Novartis et le St. Jude Hospital parmi un panel de 20 000 molécules. La sélection des 400 molécules a été réalisée en fonction des disponibilités commerciales, de la capacité de la molécule à être prise oralement et à son potentiel thérapeutique (« drug-like ») en opposition aux molécules destinées à la Recherche sur le parasite (« probe-like »). Les 400 molécules ont ainsi été retenues en raison de leur activité antipaludique intéressante sur la souche 3D7, leur CI_{50} pouvant aller jusqu'à 4 μ M pour un indice de sélectivité supérieur à 10 (Spangenberg et al., 2013).



Figure 37. Présentation de la Malaria Box. Celle-ci consiste en cinq plaques 96 puits au sein desquelles sont regroupées 400 molécules potentiellement antipaludiques.

En 2014, Boyom et al. présentent une étude dans laquelle la Malaria Box a été testée sur *T. gondii* et *Entamoeba histolytica* (Boyom et al., 2014), étendant ainsi l'usage de la Malaria Box à des pathogènes autres que *P. falciparum*. Ces travaux font partie d'une série d'études dont l'objectif était de tester la Malaria Box sur différents modèles de pathologies tels que des cellules cancéreuses, des protozoaires et des bactéries (Bessoff et al., 2014; Spangenberg et al., 2013; Van Voorhis et al., 2016). Ces différentes études ont abouti, en décembre 2015, à la

création et à la mise en place par MMV de la Pathogen Box, dont le principe est le même que la Malaria Box, cette fois-ci appliqué à différents pathogènes. Plus récemment, la Malaria Box a été criblée sur *T. gondii* et plusieurs composés ont eu un effet antiparasitaire, notamment *via* l'inhibition de la ségrégation de l'apicoplaste, de l'invasion et de l'égression du parasite (Subramanian et al., 2018).

II) Principe

A l'instar de la Malaria Box, la Pathogen Box consiste en cinq plaques 96 puits regroupant un ensemble de 400 molécules de synthèse (**Figure 38**). En revanche, celles-ci sont différentes de celles initialement proposées dans la Malaria Box. De plus, l'objectif de la Pathogen Box se veut plus large, avec un panel de molécules à destination d'une grande variété de pathogènes responsables de maladies telles que la tuberculose, le paludisme, la maladie du sommeil, la leishmaniose, la schistosomiase, l'ankylostomiase, la toxoplasmose et la dengue (**Figure 38**).

Pathogen Box composition (number of compounds)

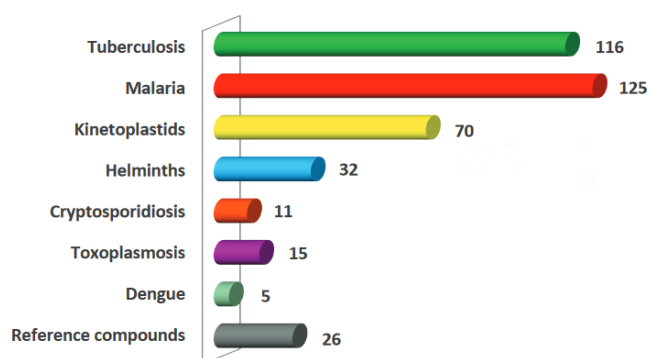


Figure 38. Présentation de la Pathogen Box. Celle-ci consiste en cinq plaques 96 puits au sein desquelles sont regroupées 400 molécules destinées à être testées sur une grande variété de pathogènes (d'après <https://www.pathogenbox.org>).

Parmi les 400 molécules présentes dans la Pathogen Box, 26 sont des composés de référence présentant une activité contre au moins l'un des pathogènes ciblés.

III) Données scientifiques actuelles

A l'heure actuelle, la Pathogen Box a permis la découverte d'un certain nombre de molécules actives contre divers pathogènes. En effet, plusieurs études font état d'une activité

contre *Haemonchus contortus* (Preston et al., 2016), *Candida albicans* (Vila and Lopez-Ribot, 2017), *Cryptococcus neoformans* (Mayer and Kronstad, 2017), *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium avium* (Low et al., 2017), *Neospora caninum* (Müller et al., 2017) ainsi que *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma cruzi* et *Plasmodium falciparum* (Duffy et al., 2017).

L'objectif de ce travail de thèse a été de cribler un certain nombre de composés naturels et synthétiques sur différents modèles parasitaires (*T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum*), dans le but de mettre au point un outil de criblage moléculaire *in vitro* permettant la découverte de nouveaux composés antiparasitaires.

Dans une première partie, nous avons confirmé de précédents résultats obtenus au laboratoire quant à l'efficacité *in vitro* d'extraits et fractions issus de l'extrait d'écorce d'*A. leiocarpus* sur *T. gondii*. Nous avons également testé ces différents extraits et fractions sur *N. caninum* et certains d'entre eux sur *P. falciparum*. Nous avons ensuite cherché à identifier le mécanisme d'action des extraits et fractions les plus actifs sur *T. gondii*. Enfin, l'efficacité *in vivo* de ces derniers a été évaluée sur plusieurs modèles de toxoplasmose et de néosporose aiguës et chroniques.

Dans une seconde partie, nous avons appliqué notre outil de criblage moléculaire à 30 extraits d'écorces de dix arbres de la région Champagne-Ardenne sur *T. gondii* et *N. caninum* dans le but de mettre en évidence de nouveaux composés naturels antiparasitaires, et ce dans une optique de valorisation des sous-produits de la filière bois.

Dans une troisième partie, un criblage de 400 composés de synthèse fournis dans la Pathogen Box par la fondation Medicines for Malaria Venture a été réalisé sur *T. gondii* et *N. caninum*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Partie I. Extraits naturels

D) Origine des extraits naturels d'écorces d'arbres

1) Ecorce d'*Anogeissus leiocarpus*

L'extrait brut d'écorce d'*Anogeissus leiocarpus* a été obtenu par extraction d'une poudre d'écorce récoltée en Afrique subsaharienne dans l'éthanol 99%. Il a été fourni par la société Givaudan (Pomacle, France). Cet extrait est actuellement utilisé en cosmétique comme ingrédient actif nommé « Anogelline » dans une gamme de produits commercialisés par Christian Dior en France.

2) Ecorces d'arbres provenant de la région Champagne-Ardenne

a. *Origine des arbres*

Les écorces d'arbres locaux utilisées dans cette étude proviennent du département des Ardennes. Environ deux kilogrammes d'écorces d'arbres ont ainsi été récoltés manuellement dans les forêts ardennaises en novembre 2014 au niveau du tronc de l'arbre deux mois après leur abattage dans le cadre d'activités professionnelles forestières. Les échantillons ont été séchés pendant trois jours à l'étuve à 30°C avant d'être broyés par un broyeur à marteaux (VEM Motors GmbH, Allemagne). L'identification botanique est réalisée d'après les caractéristiques phénotypiques des arbres telles que la forme, la disposition et les contours des feuilles. Dix essences d'arbres ont ainsi été sélectionnées (**Tableau III**).

b. *Obtention des extraits naturels*

Chaque poudre d'écorce a subi par la suite trois extractions solide-liquide consécutives avec des solvants de polarité croissante. La première extraction a été réalisée à partir de 100 g de poudre d'écorce dans 1,5 L d'heptane pendant 18 heures à température ambiante et sous agitation magnétique avant de filtrer sous vide à l'aide d'un filtre en verre fritté 0,4 µm. Le filtrat est récupéré et évaporé à l'aide d'un Rotavapor R-124 (Buchi, France) couplé à un bain-marie Waterbath B-480 (Buchi, France), d'un Vacuum Controller V-850 (Buchi, France) et d'une pompe à vide Vacuum Pump V-700 (Buchi, France). Les résidus secs obtenus sont solubilisés dans l'heptane avant d'être transférés dans un pilulier puis mis à sécher à température ambiante. L'extrait ainsi obtenu est l'extrait *n*-heptane, comprenant les composés

naturels les plus apolaires. Les poudres d'écorces épuisées par l'heptane sont séchées puis de nouveau soumises à une étape d'extraction solide-liquide dans 1,5 L de méthanol pendant 18 heures à température ambiante et sous agitation magnétique. Les résidus secs obtenus après évaporation du méthanol dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus sont solubilisés dans l'acétone à l'aide d'un bain à ultrasons et transférés dans un pilulier. Le solvant est évaporé à température ambiante jusqu'à obtention d'un résidu sec. Il s'agit là de l'extrait méthanol. Les poudres d'écorces épuisées par le méthanol (et précédemment par l'heptane) sont soumises à une troisième étape d'extraction, cette fois dans 1,5 L de méthanol/eau 50/50 (v/v). L'extrait solide-liquide, repris dans l'acétone, est obtenu de manière identique à celle décrite pour l'heptane et le méthanol. Le produit sec obtenu est l'extrait méthanol 50%. Trente extraits (trois extraits \times dix essences) sont ainsi obtenus.

II) Fractionnement des extraits naturels par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

1) Principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge (EPC)

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique d'extraction liquide-liquide dénuée de support solide. Elle est basée sur la distribution et le transfert de solutés entre au moins deux liquides non miscibles en fonction de leur coefficient de distribution (K_d) (**Figure 39**).

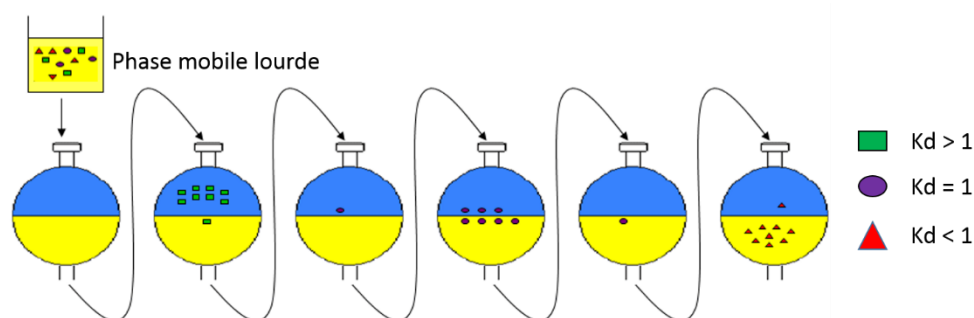


Figure 39. Principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge, basé sur le coefficient de distribution (K_d) des solutés à extraire (d'après Kromaton Technology, France).

L'équipement utilisé dans ce travail est un Extracteur de Partage Centrifuge FCPE300® (Rousselet-Robatel-Kromaton, Annonay, France) (**Figure 40**) : la seule différence avec les équipements de CPC classiques réside dans le fait que, à volume égal, la colonne EPC comporte moins de cellules de partage (231 cellules de partage réparties sur 7 disques empilés, pour un

volume total de la colonne utilisée de 303 mL), ces dernières étant donc de plus grand volume (1 mL/cellule). Elles sont par ailleurs reliées par des canaux de section augmentée (0,8 mm de diamètre, pour un volume total des canaux de 73 mL) par rapport aux colonnes CPC classiques.

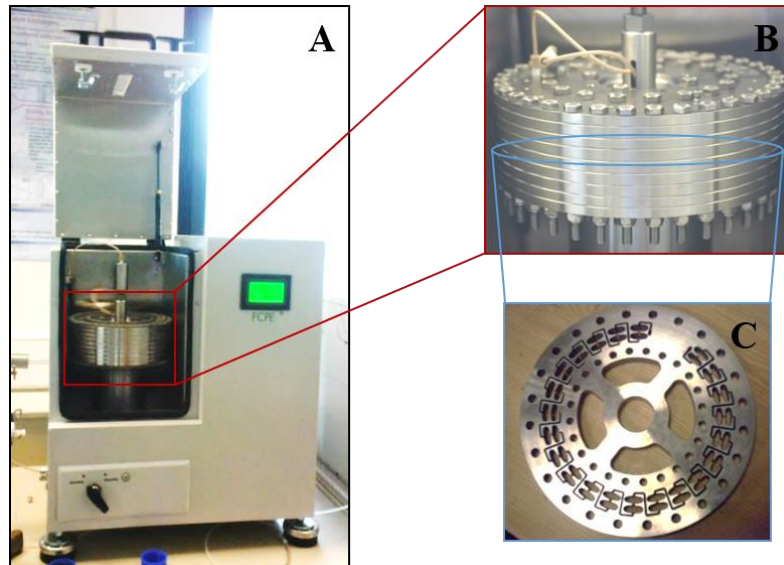


Figure 40. Aperçu de l'extracteur FCPE300® utilisé pour l'Extraction de Partage Centrifuge. L'extracteur (A), la colonne EPC contenant les sept disques de partage (B) et l'un de ces disques (C) sont ainsi présentés.

Ceci permet d'augmenter la quantité d'échantillon à fractionner et le débit, optimisant ainsi la productivité du processus d'extraction (**Figure 41**), et ce au détriment de l'efficacité chromatographique, notamment en mode élution.

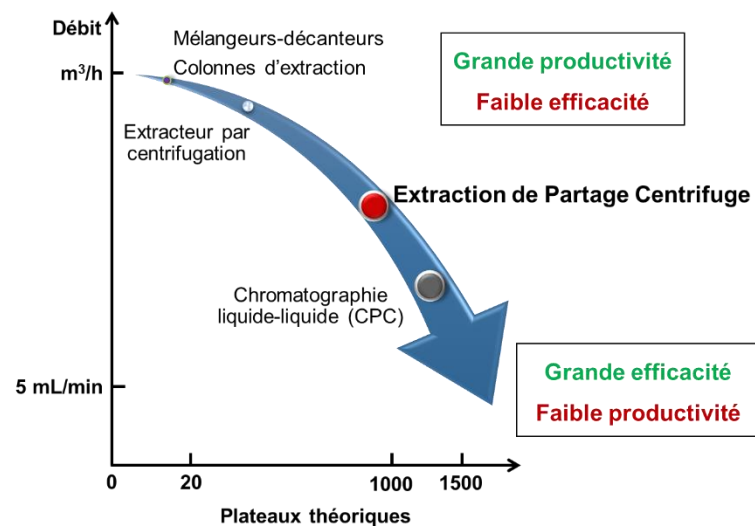


Figure 41. Comparaison des différentes techniques d'extraction (d'après Jane Hubert, présenté lors de l'AFERP & STOLON International Symposium à Bruxelles en 2013).

2) Fractionnement des extraits par CPC (Hamzaoui et al., 2013a)

Dans une ampoule à décanter, 700 mL d'eau distillée, 700 mL d'acétonitrile (Carlo ErbaReactifs SDS, France), 700 mL de *n*-heptane (Carlo ErbaReactifs SDS, France) et 700 mL de méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) (Carlo ErbaReactifs SDS, France) sont mélangés. Le mélange est mis à décanter jusqu'à l'obtention de 3 phases, la moins polaire (nommée phase 1, 1036 mL) étant riche en *n*-heptane et MTBE, celle de polarité moyenne (nommée phase 2⁰, 476 mL) riche en acétonitrile et en MTBE, enfin la plus polaire (nommée phase 3⁰, 1288 mL) riche en eau et dans une moindre mesure en acétonitrile. Les phases 2⁰ et 3⁰ sont collectées et introduites dans une ampoule à décanter avec 700 mL de MTBE. Les deux phases résultantes sont séparées et gardées avant que leurs volumes respectifs ne soient mesurés. Ainsi, le volume de la phase supérieure (nommée 2) est de 1371 mL et celui de la phase inférieure (nommée 3) de 841 mL. La rotation de la colonne peut être ajustée de 200 rpm à 2000 rpm, produisant une accélération centrifuge pouvant atteindre 437 g. les phases liquides sont pompées à l'aide d'une pompe KNAUER Preparative Pump 1800® V7115 (KNAUER, Allemagne). Le suivi de l'effluent est réalisé online par un détecteur UVD 170S (Dionex, Etats-Unis) en sélectionnant deux longueurs d'onde : 210 nm et 254 nm, le signal étant traité *via* le logiciel Chromeleon version 6.11 (Dionex, Etats-Unis). Les fractions sont collectées à l'aide d'un collecteur de fractions Superfrac (Pharmacia, Suède), équipé de tubes de collecte de 20 mL.

La colonne est remplie initialement avec la phase 3 (phase aqueuse) à 200 rpm en mode ascendant, puis la rotation est augmentée à 1000 rpm. L'échantillon (4 g d'extrait d'écorces dissous dans un mélange de 15 mL de phase 3, 7 mL de phase 2 et 7 mL de phase 1 dans le cas d'*Anogeissus leiocarpus*) est introduit dans la colonne via une boucle d'injection reliée à une vanne d'injection, la phase mobile initiale correspondant à la phase 1 (riche en *n*-heptane) étant pompée en mode ascendant avec une rampe de débit allant de 0 à 20 mL/min en 3 min. La phase 1 est pompée après le volume mort (apparition de la phase mobile en sortie de colonne) pour éluer les composés les moins polaires. La phase 2 (moyennement polaire, riche en acétonitrile et MTBE) est alors pompée également en mode ascendant, toujours à un débit de 20 mL/min pour éluer les composés de polarité intermédiaire. Enfin, et dans le but de collecter les composés les plus polaires, les phases mobile et stationnaire sont interverties (mode dual) et la phase aqueuse est donc pompée en mode descendant à 20 mL/min, la colonne tournant toujours à 1000 rpm.

3) Obtention du profil chromatographique des différentes fractions par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les différentes fractions obtenues dans les tubes du collecteur sont ensuite analysées par CCM en utilisant des plaques de silice phase normale Merck 60 F254 (Merck, France) et comme éluant un mélange acétate d'éthyle/toluène/acide acétique/acide formique 70/30/11/11 (v/v). La révélation se fait sous lumière UV (254 et 365 nm), puis par pulvérisation d'une solution de vanilline à 5% (m/v) dans de l'éthanol 95% suivi d'une solution d'acide sulfurique 50% (v/v) dans du méthanol avant chauffage de la plaque à environ 110°C pendant une minute. Les fractions présentant le même profil de chromatographie sont finalement regroupées en vue de leur analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), ces regroupements étant également destinés aux expérimentations *in vitro* sur les parasites.

4) Analyse des fractions CPC par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Un échantillon de chaque fraction (environ 20 mg) est solubilisé dans 600 µL de DMSO DMSO-*d*₆ et analysé par spectroscopie RMN à 298 K sur un spectromètre Bruker Avance AVIII-600 (Bruker, Wissembourg, France). Les spectres de l'hydrogène ¹H et du carbone ¹³C sont respectivement enregistrés à 600,15 MHz et 150,04 MHz pour déterminer la composition globale de chaque fraction (Hubert et al., 2014). Des analyses supplémentaires en RMN 2D homo- (COSY) et hétéro-nucléaires (Heteronuclear Single-Quantum Coherence - HSQC, Heteronuclear Multiple Bond Correlation - HMBC) sont réalisées en utilisant les microprogrammes Bruker standards pour confirmer si besoin la structure du ou des composé(s) majeur(s) présent(s) dans chaque fraction (**Figure 42**).

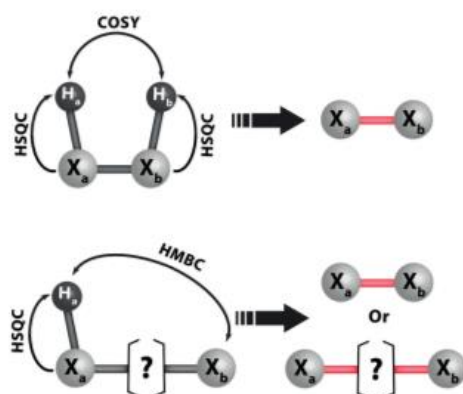


Figure 42. Dédiction des liaisons et des relations de proximité possibles à partir des données des spectres RMN COSY, HSQC ou HMBC. Dans le cas des couplages 3J H-X, l'atome noté « ? » peut être n'importe quel hétéro-atome de la molécule, tel que l'oxygène ou l'azote.

Un spectre HSQC permet de connecter les ^1H et les atomes ^{13}C (ou les ^{15}N) directement liés. Une expérience ^1H - ^1H COSY permet de mettre en évidence principalement les couplages magnétiques entre les noyaux des protons à travers 2 (2J , dans le cas de protons méthyléniques non équivalents) ou 3 liaisons (3J) dans certains cas particuliers (systèmes comportant des électrons π , dispositions particulières dans l'espace, etc) des couplages à plus longue distance peuvent apparaître. Enfin, un spectre HMBC révèle les couplages 2J , 3J ou 4J entre les ^1H et les atomes ^{13}C (ou les ^{15}N). Ces différentes informations permettent alors de « construire » la structure chimique de la molécule isolée.

III) Solubilité des fractions d'*Anogeissus leiocarpus* et des dix arbres de la région Champagne-Ardenne dans le DMSO

1) Critères de sélection du DMSO en tant que solvant « universel »

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) (**Figure 43**) est une molécule amphiphile contenant un domaine hautement polaire et deux groupements méthyl apolaires (MacGregor, 1967).

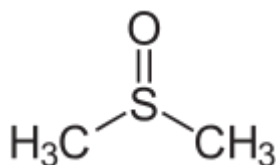


Figure 43. Formule semi-développée du DMSO.

Cette caractéristique lui permet d'être soluble dans des solvants polaires ou apolaires. Cela le rend également capable de solubiliser un grand nombre de composés organiques (Balakin et al., 2004) ou inorganiques (Trammell et al., 1990).

Ces capacités de solubilisation ainsi que ses propriétés amphiphiles ont rendu l'utilisation du DMSO prépondérante en tant qu'agent de solubilisation pour les expérimentations *in vivo* et *in vitro* (Santos et al., 2003). Au cours des travaux présentés ici, le DMSO a été choisi pour solubiliser les différentes fractions CPC obtenues à partir des extraits d'*Anogeissus leiocarpus* et des dix arbres provenant de la région Champagne-Ardenne. Cela permet d'utiliser le même solvant pour des extraits de compositions chimiques et de polarités variées.

2) Mode opératoire

Pour évaluer la solubilité des différentes fractions à tester et pouvoir ainsi déterminer les concentrations maximales des fractions, des tests de solubilité ont été réalisés. Pour ce faire, entre 1 mg et 2 mg (noté $M_{\text{pesée}}$) de chaque extrait a été pesé dans un tube 1,5 mL à l'aide d'une balance de précision Sartorius MC210P (Sartorius, France). Ensuite, un volume de 10 μL de DMSO a été ajouté. En cas d'absence de solubilisation, le tube est mis dans un bain à ultrasons Elmasonic S10H (Elma, Allemagne) chauffé à 30°C pendant 5 minutes. Si le composé n'est toujours pas solubilisé, l'opération est répétée jusqu'à sa solubilisation totale dans le volume de DMSO déposé (noté V_{max}). La concentration massique maximale en fraction, exprimée en mg/mL, est ainsi déduite par la formule suivante :

$$C_{\text{max}} = \frac{M_{\text{pesée}}}{V_{\text{max}}} \times 1000$$

Partie II. Cultures cellulaires et parasitaires

I) Origine et caractéristiques des souches parasitaires utilisées

Les souches de *Toxoplasma gondii* utilisées lors de cette étude proviennent du centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma* (CRB *Toxoplasma*, France) et celles de *Neospora caninum* proviennent de l'équipe de Recherche (Laboratoire de Parasitologie – Mycologie, EA 3800). Les souches de *Plasmodium falciparum* ont été fournies par l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (IPPTS, France).

1) Souches de *Toxoplasma gondii*

La souche **RH** est une souche de référence de génotype I. A l'origine, elle a été isolée en 1939 aux Etats-Unis chez un enfant mort d'encéphalite à l'âge de six ans (Sabin, 1941). Le surnageant de broyats de cerveau inoculé à des souris a provoqué la mort de celles-ci entre le 17^{ème} et le 21^{ème} jour. De nouvelles souris infestées avec des broyats d'organes des animaux morts ont survécu entre sept et huit jours. Depuis 1939, la souche RH a fait l'objet de multiples passages intrapéritonéaux de tachyzoïtes chez la souris, tous les trois à quatre jours. Elle a été utilisée dans de nombreux travaux réalisés sur *T. gondii*. C'est une souche virulente sensible à la pyriméthamine et à la sulfadiazine sur cellules fibroblastiques MRC-5 (Meneceur et al., 2008).

La souche **ME49** est une souche de référence de génotype II, isolée pour la première fois en Californie chez un ovin (Lunde and Jacobs, 1983). C'est une souche kystogène. Les souris inoculées par cette souche présentent une ascite discrète et survivent sans manifestation clinique. Cette souche est la plus fréquemment retrouvée dans les cas de toxoplasmose humaine (Howe and Sibley, 1995). Elle est très utilisée dans les études portant sur *T. gondii* et est décrite comme étant sensible aux sulfamides sur cellules MRC-5 (Meneceur et al., 2008).

2) Souche de *Neospora caninum*

La souche **NC1** est une souche couramment utilisée dans les travaux portant sur *Neospora caninum*. Elle a été isolée en 1988 aux Etats-Unis à partir de tissu cérébral de chien infecté congénitalement (Dubey et al., 1988b). C'est une souche virulente responsable d'avortements chez les Bovins et sensible à la pyriméthamine (Lindsay and Dubey, 1989a).

3) Souches de *Plasmodium falciparum*

La souche **3D7** est une souche de référence dérivée de la souche NF54 (Walliker et al., 1987) isolée chez un patient néerlandais en 1979 et qui n'a jamais voyagé (Delemarre and van der Kaay, 1979). C'est une souche sensible à la chloroquine (Ponnudurai et al., 1981) et à la pyriméthamine (Chen et al., 1987).

La souche **7G8** est une souche de référence clonée à partir de la souche IMTM22 (Hadley et al., 1987), elle-même isolée chez un enfant de douze ans en 1980 au Brésil (Burkot et al., 1984). C'est une souche résistante à la pyriméthamine (Chen et al., 1987).

II) Cultures cellulaires et parasitaires

1) Culture cellulaire liée à *T. gondii* et à *N. caninum*

a. Lignée cellulaire Vero

Les cellules Vero constituent une lignée cellulaire isolée à partir de cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique, le *Chlorocebus aethiops* (anciennement *Cercopithecus aethiops*). Cette lignée cellulaire est répertoriée dans l'ATCC sous la référence CCL-81. Elle a été développée en 1962 à l'Université de Chiba au Japon (Yasumura and Kawakita, 1963). Son nom provient de « *Verda Reno* », qui signifie « rein vert » en espéranto. Les cellules Vero sont des cellules adhérentes fusiformes qui se multiplient en formant un tapis cellulaire. C'est une lignée très utilisée en virologie mais aussi en recherche clinique pour développer des vaccins. Il a également été démontré que les cellules Vero sont un excellent hôte pour la multiplication rapide de tachyzoïtes de *T. gondii* (Saadatnia et al., 2010). Cette caractéristique nous a donc amené à utiliser ce modèle de cellule-hôte pour notre étude sur *T. gondii* et *N. caninum*.

b. Entretien des cellules Vero

Les cellules Vero sont cultivées dans du milieu *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, Invitrogen, France) contenant de la glutamine stabilisée, le GlutaMAX[®], et supplémenté de 5% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Biowest, France) décomplémenté et additionné de 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen, France). Les cellules sont cultivées initialement dans des flasques de culture de 25 cm² (T25) à raison de 1 million de cellules dans 5 mL de milieu de culture. Les cultures sont maintenues à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂ sous

atmosphère humide. A 90% de confluence, les cellules subissent un « passage », stérilement sous un Poste de Sécurité Microbiologique II (PSMII) (FluFrance, France) : après rinçage au PBS 1X sans magnésium et sans calcium, elles sont détachées de la boîte par ajout de Trypsine/EDTA (Invitrogen, France), à raison de 1 mL pour une flasque T25, pendant 5 minutes à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée par ajout de milieu complet IMDM supplémenté de 5% de SVF. Les cellules sont ensuite comptées par la méthode d'exclusion au bleu trypan : les cellules mortes, perméables, sont colorées en bleu tandis que les cellules viables excluent le bleu trypan et restent incolores (Boyse et al., 1964). La viabilité cellulaire doit être de 90% minimum. Après numération des cellules viables grâce à une cellule Kova[®] Slide, le nombre de cellules désiré estensemencé dans les boîtes de culture et les plaques 96 puits.

c. Congélation et décongélation

Dans le but d'assurer la meilleure reproductibilité possible en termes de résultats, les cellules Vero et les parasites sont régulièrement congelés et décongelés afin que les expérimentations soient réalisées sur des parasites de passages identiques. Les protocoles de congélation et de décongélation sont semblables pour les modèles cellulaires et parasitaires (Mzabi et al., 2015).

Antérieurement à la congélation, les parasites et les cellules sont centrifugés à 800 g pendant 10 minutes. Ils sont remis en suspension dans 1 mL de milieu de culture IMDM/GlutaMAX[®] puis comptés sur cellule Kova[®] Slide. Ils sont ensuite répartis dans des cryotubes à une concentration de 8 millions pour les parasites et 2 millions pour les cellules Vero dans un volume de 1,5 mL de milieu de congélation. Celui-ci contient du milieu de culture IMDM/GlutaMAX[®] supplémenté de 1% de pénicilline/streptomycine, 10% de SVF et 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde). Les cryotubes ainsi préparés sont ensuite placés dans une boîte d'isopropanol à -80°C pendant 48 heures avant d'être stockés dans une cuve d'azote liquide, ce qui permet une congélation lente qui n'altère pas le matériel biologique. Les cryotubes peuvent rester dans la boîte d'isopropanol à -80°C si la décongélation se fait dans les mois qui suivent l'étape de congélation.

En ce qui concerne la décongélation, les cryotubes sont transférés, depuis l'azote liquide ou le congélateur à -80°C, directement dans un bain-marie à 37°C afin d'obtenir une décongélation rapide. Le contenu des cryotubes est transféré dans une flasque de culture T25 contenant 5 mL de milieu de culture IMDM/GlutaMAX[®] pour les cellules. Pour les parasites, le contenu des cryotubes est transféré dans une flasque de culture T25 contenant 1 million de cellules Vero.

Les milieux de culture sont changés 24 heures après décongélation des cryotubes. Par la suite, la culture des cellules et des parasites se fait comme indiqué précédemment.

d. Multiplication des parasites sur cellules Vero

Les tachyzoïtes de la souche RH de *T. gondii* sont cultivés sur les cellules Vero en IMDM/GlutaMAX[®] supplémenté de 2% de SVF décomplémenté, filtré et additionné de 1% de pénicilline/streptomycine (**Figure 44**).

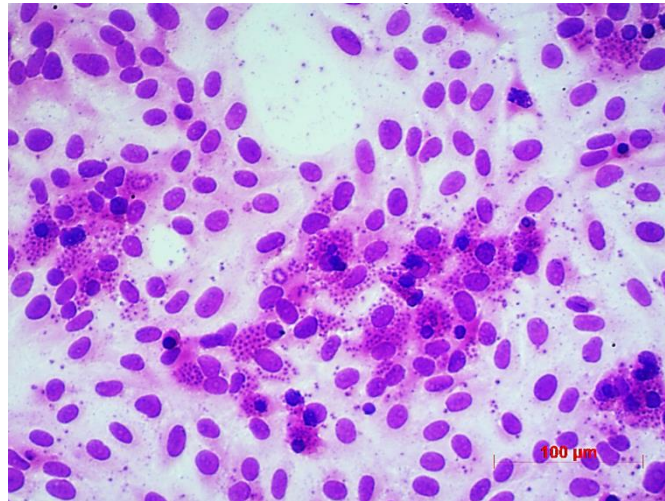


Figure 44. Observation au microscope optique de cellules Vero infestées par des tachyzoïtes de *T. gondii* (G : X 40) après coloration à l'éosine et au bleu de méthylène.

Les tachyzoïtes de la souche NC1 de *N. caninum* sont aussi cultivés sur les cellules Vero, mais cette fois-ci en IMDM/GlutaMAX[®] supplémenté de 5% de SVF, décomplémenté, filtré et additionné de 1% de pénicilline/streptomycine (**Figure 45**).

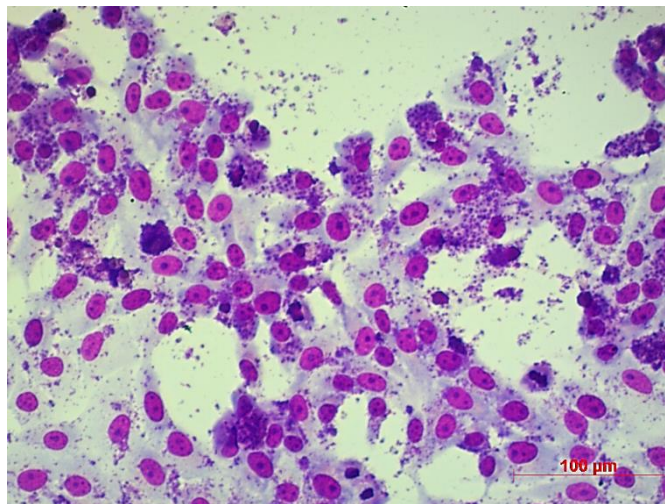


Figure 45. Observation au microscope optique de cellules Vero infestées par des tachyzoïtes de *N. caninum* (G : X 40) après coloration à l'éosine et au bleu de méthylène.

Selon la souche parasitaire utilisée (RH, ME49 ou NC1), le rapport tachyzoïtes/cellules a été déterminé afin d'obtenir une sortie des parasites en 3 à 4 jours entre deux passages successifs (**Tableau IV**).

Tableau IV. Rapports tachyzoïtes/cellules utilisés pour la culture cellulaire.

Souche	Rapport tachyzoïtes/cellules
RH	1/2
ME49	2/1
NC1	2/1

Un entretien est effectué lorsque les tachyzoïtes, après éclatement des cellules, se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Les cellules Vero sontensemencées dans des flasques de culture (1 million de cellules dans une T25, 2 millions dans une T75 et 5 millions dans une T180), comme décrit précédemment. Elles sont ensuite incubées 3 heures à 37°C, ce qui permet aux cellules d'adhérer avant infestation par les tachyzoïtes. Après numération par cellule Kova® Slide, le nombre de tachyzoïtes voulu estensemencé dans les flasques de culture contenant les cellules Vero adhérees au substrat. La croissance parasitaire s'effectue à 37°C en atmosphère saturée en humidité et à 5% de CO₂. En regard des risques de dérive phénotypique, les tachyzoïtes et les cellules Vero ne sont utilisés que jusqu'aux 15^{ème} et 30^{ème} passages, respectivement. Toutes les manipulations sont réalisées stérilement sous un PSMII (Flufrance, France).

Afin de s'assurer de l'absence de contamination par des mycoplasmes, les cultures cellulaires et parasitaires sont régulièrement testées par PCR en temps réel (Ishikawa et al., 2006). Ces tests sont réalisés par la Plateforme Régionale de Biologie Innovante (PRBI, Centre Hospitalier Universitaire de Reims).

2) Culture cellulaire liée à *P. falciparum*

a. *Poche de sang total et conservation du sang*

Les hématies sont, avec les hépatocytes, les seules cellules de l'organisme que *Plasmodium* peut envahir et au sein desquelles il peut se multiplier chez les Mammifères. Dans l'optique de cultiver *in vitro* la forme trophozoïte (ou « ring », à cause de sa forme en anneau dans l'hématie) de ce parasite, il est nécessaire d'utiliser des hématies.

Après l'établissement d'une convention (numéro d'agrément DC-2016-2645) et l'accord du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, celles-ci ont été fournies par

l'Etablissement Français du Sang (EFS, France), directement après prélèvement de sang périphérique auprès d'un donneur ne souffrant ni d'anémie ni d'hémoglobinopathie et qui n'a pas voyagé en zone d'endémie palustre.

Dès leur réception, les hématies sont additionnées de milieu SAGM (Saline Adénine Glucose Medium) pour leur conservation, à raison de 2,5 volumes d'hématies pour 1 volume de milieu SAGM. Ce milieu est composé de 4,385 g de chlorure de sodium NaCl (Sigma, France), 0,134 g d'adénine hydrochloride (Sigma, France), 2,73 g de D-mannitol (Sigma, France) et 0,185 g de D-glucose (Sigma, France) pour un volume total de 500 mL d'eau MilliQ à pH 5,6. Les hématies peuvent ainsi être conservées à +4°C pendant 40 jours environ pour leur utilisation en culture cellulaire.

b. Préparation du Milieu de Culture Malaria (MCM)

Le Milieu de Culture Malaria (MCM) est essentiel pour la préparation des globules rouges dans l'optique de cultiver *Plasmodium falciparum*. Le milieu de culture RPMI 1640 contenant de la L-glutamine à 0,3 g/L (Invitrogen, France) est supplémenté de 1,19 g d'HEPES à 1 M (Invitrogen, France), 500 µL d'hypoxanthine (Sigma, France) à 1 mg/mL de NaOH 1 N, 500 µL de sodium pyruvate (Sigma, France) à 110 mg/mL de RPMI 1640, 5 mL de glutamine à 100 mM (Invitrogen, France) et 50 mL de SVF (Biowest, France) décomplémenté et filtré. L'ensemble du MCM ainsi préparé est ensuite filtré sur 0,2 µm et conditionné dans un récipient stérile avant d'être stocké à +4°C.

c. Préparation des hématies pour la culture de *P. falciparum*

Pour leur utilisation en culture parasitaire, les hématies doivent être lavées et ramenées à 50% d'hématocrite. La première étape consiste en une centrifugation des hématies contenues dans le milieu SAGM à 2000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé. Le volume d'hématies (culot) est déterminé puis le même volume de MCM est ajouté pour remettre le culot en suspension. La suspension globulaire est centrifugée à 2000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est à nouveau éliminé, tout comme la fine couche de globules blancs se trouvant au-dessus des hématies. Deux nouveaux lavages sont ensuite réalisés, tout en éliminant le maximum de globules blancs restants. Enfin, après élimination du surnageant, le volume d'hématies est déterminé avant d'ajouter le même volume de MCM pour remettre le culot en suspension. Les hématies ainsi préparées sont conservées à +4°C jusqu'à leur utilisation. Elles

peuvent être stockées pendant 5 jours maximum environ, période au-delà de laquelle une hémolyse fera son apparition.

d. Congélation et décongélation des parasites

Dans le but d'assurer la meilleure reproductibilité possible en termes de résultats et de générer un stock constant de cryotubes, les parasites sont régulièrement congelés et décongelés. Les protocoles de congélation et de décongélation sont identiques pour les deux souches parasitaires 3D7 et 7G8.

Antérieurement à la congélation, la parasitémie est déterminée. Elle doit être supérieure à 5% pour pouvoir préparer des cryotubes. Seuls les trophozoïtes sont pris en compte lors de la numération, dans la mesure où les schizontes ne seront pas capables de reprendre leur multiplication au moment de la décongélation du cryotube. Les hématies parasitées sont ensuite diluées dans une solution de congélation, à raison de 1 volume d'hématies parasitées pour 1 volume de solution de congélation. Celle-ci est composée de 28% (v/v) de glycérol (Sigma, France), 3% (m/v) de sorbitol (Sigma, France) et 0,65% (m/v) de chlorure de sodium NaCl (Sigma, France) dans de l'eau MilliQ stérile. La solution ainsi préparée est ensuite filtrée sur 0,2 μm . La suspension parasitaire est ensuite aliquotée à raison de 500 μL par cryotube. Les cryotubes sont finalement stockés directement dans l'azote liquide, ce qui permet de limiter le phénomène d'hémolyse observé lorsqu'ils sont préalablement stockés à -80°C .

Concernant la décongélation, les cryotubes sont transférés, depuis la cuve d'azote liquide, dans un bain-marie à 37°C pendant 1 à 2 minutes. Le sang est ensuite transféré stérilement dans un tube à centrifuger de 50 mL et son volume est mesuré (= V). Un volume de $0,1 \times V$ de solution de décongélation A stérile (12% NaCl) est ajouté au sang, goutte à goutte, lentement et en agitant doucement le tube. Celui-ci est incubé 5 minutes à température ambiante. Un volume de $10 \times V$ de solution de décongélation B stérile (1,6% NaCl) est ajouté de la même façon que précédemment. Le tube est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes à 20°C . A l'issue de la centrifugation, le surnageant est aspiré et éliminé. Le culot d'hématies parasitées est remis en suspension dans un volume de MCM supplémenté de 15% de SVF équivalent à 10 volumes de culot, goutte à goutte, lentement et en agitant doucement le tube. Celui-ci est centrifugé de nouveau à 1500 g pendant 5 minutes à 20°C puis le surnageant est éliminé. Enfin, le culot est remis en suspension dans 5 mL de MCM supplémenté de 15% de SVF et transféré dans une flasque de culture T25. Des hématies fraîches non parasitées et du milieu MCM supplémenté de 15% de SVF sont ajoutés de manière à obtenir 1% d'hématocrite. La flasque

est incubée à 37°C, 5% de CO₂. A noter que, pour obtenir plus rapidement une multiplication parasitaire correcte, il est possible de mettre la flasque de culture dans un système de type Candle Jar. En effet, la concentration en dioxygène présent dans l'atmosphère est nocive pour le parasite, ce qui peut être évité par l'utilisation de ce système (Briolant et al., 2007; Scheibel et al., 1979).

e. Multiplication des parasites

Les trophozoïtes des souches 3D7 et 7G8 de *P. falciparum* sont cultivés sur les hématies en MCM (**Figure 46**). Quelle que soit la souche, la culture du parasite est strictement la même. Elle subit un « passage » tous les 2 à 3 jours maximum. Toutes les manipulations décrites ci-dessous sont réalisées sous un PSMII (FluFrance, France) et constituent un « passage ».

Le lendemain de la mise en culture du cryotube en flasque T25, 8 mL de milieu de culture sont retirés en prenant soin de ne pas aspirer le tapis d'hématies sédimentées au fond de la flasque. Le milieu restant et les hématies sont mélangés pour remettre ces dernières en suspension. A l'aide d'une pipette, une goutte de suspension parasitaire est déposée sur une lame puis un frottis est réalisé. En parallèle, 8 mL de milieu MCM supplémenté de 15% de SVF sont ajoutés dans la flasque. Celle-ci est ensuite placée dans l'incubateur ou la Candle Jar à 37°C. La lame du frottis est colorée au May-Grunwäld-Giemsa puis la parasitémie est déterminée (nombre d'hématies parasitées par rapport au nombre total d'hématies) sur trois champs microscopiques différents. En fonction de la parasitémie, la remise en culture est différente. Le milieu de culture MCM est changé à raison de 10 mL dans une T25 lorsque la parasitémie atteint 1% à 5%, avec une dominance du stade trophozoïte et 1% à 2% de schizontes. Dans le cas où les schizontes sont prédominants et que la parasitémie est supérieure à 2%, la suspension parasitaire est transférée dans une nouvelle flasque de culture et la parasitémie et l'hématocrite sont ramenés à 1%.

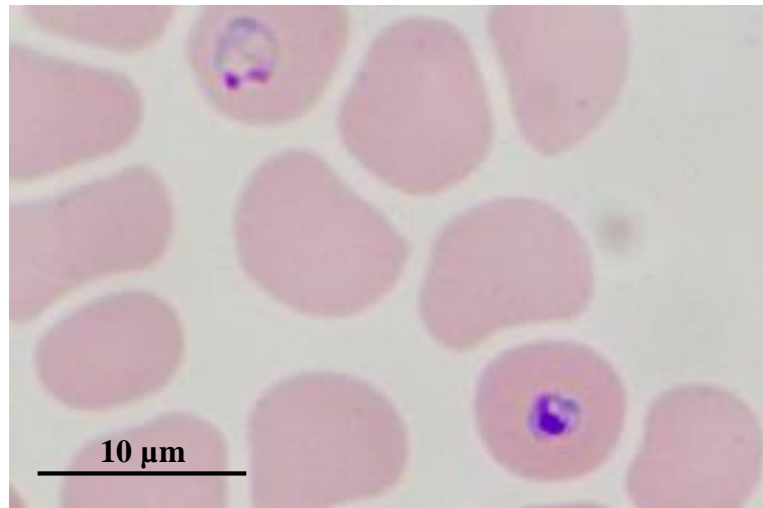


Figure 46. Observation au microscope optique d'un frottis sanguin d'hématies infestées par des trophozoïtes (« rings ») de *P. falciparum* après coloration au May-Grünwald-Giemsa (d'après l'Institut de Parasitologie et Pathologie Tropicale de Strasbourg).

Pour passer à une culture parasitaire à plus grande échelle, 8 mL de milieu de culture de la flasque T25 sont enlevés, tout en faisant attention à ne pas aspirer le tapis d'hématies au fond de la flasque. De la même façon que précédemment, un frottis est réalisé en parallèle afin de déterminer la parasitémie. Si celle-ci est comprise entre 1 et 10%, avec des trophozoïtes majoritaires, le milieu de culture MCM est simplement renouvelé. Il en va de même si les schizontes représentent moins de 2% de parasitémie. Si celle-ci est supérieure à 2% avec des schizontes majoritaires, la parasitémie et l'hématocrite sont ramenés à 1%. Les flasques ainsi préparées sont remises dans l'incubateur ou la Candle Jar à 37°C.

Les volumes totaux de milieu de culture dépendent de la taille de la flasque : 10 mL pour une T25, de 50 à 100 mL pour une T75 et de 100 à 300 mL pour une T180.

III) Evaluation du potentiel antiparasitaire *in vitro* des extraits d'écorces d'arbres sur *T. gondii* et *N. caninum*

1) Préparation des cellules Vero pour l'évaluation de la cytotoxicité

Les cellules Vero sontensemencées sur une plaque 96 puits, à raison de 200 µL de suspension cellulaire contenant 20 000 cellules par puits. Les puits ainsi préparés permettront d'obtenir par la suite un tapis cellulaire adapté à l'infestation par les tachyzoïtes lors des tests de chimiosensibilité de *T. gondii* et de *N. caninum*. Les plaques sont ensuite incubées 4 heures à 37°C et à 5% de CO₂, permettant aux cellules de sédimenter et d'adhérer au support.

2) Cytotoxicité des extraits naturels

a. *Screening*

Après les 4 heures d'incubation nécessaires à l'adhésion des cellules Vero sur leur support, 50 µL de milieu de culture IMDM à 2% de SVF sont ajoutés dans chaque puits. Ce volume est le même que celui qui sera ajouté lors des tests de chimiosensibilité lors de l'ajout des tachyzoïtes dans les puits. Ensuite, 25 µL de chaque extrait naturel à une concentration finale de 200 µg/mL sont déposés dans les puits, à raison de 3 puits par extrait à tester. Les plaques sont ensuite mises à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 72 heures pour ensuite être utilisées pour la révélation à l'UptiBlue (Interchim, France). En cas de forte cytotoxicité d'une majorité d'extraits criblés à cette concentration, celle-ci est divisée par deux jusqu'à l'atténuation de ce phénomène pour l'ensemble des extraits concernés. Un extrait est considéré comme cytotoxique lorsque la viabilité cellulaire est inférieure à 80%.

b. *Détermination de la Concentration Cytotoxique à 50% (CC₅₀)*

De la même façon que pour le screening décrit précédemment, 50 µL de milieu de culture IMDM à 2% de SVF sont ajoutés dans chaque puits après les 4 heures d'incubation des plaques 96 puits. Les extraits d'écorces d'arbres solubilisés dans le DMSO sont ensuite ajoutés à raison de 25 µL par puits après avoir préparé une gamme de concentrations par une série de dilutions au ½ en fonction de la concentration maximale non cytotoxique déterminée lors du screening (**Tableau V**). Après 72 heures à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂, les plaques sont utilisées pour la révélation à l'UptiBlue (Interchim, France). Chaque expérimentation est réalisée en triplicate.

Tableau V. Concentrations utilisées en fonction des différents arbres à tester lors de la détermination de la CC₅₀.

Arbres	Concentration minimale (µg/mL)	Concentration maximale (µg/mL)
<i>Anogeissus leiocarpus</i>	1,562	200
	0,781	100
Arbres ardennais	0,781	100

c. *Révélation à la résazurine*

La cytotoxicité est évaluée par l'utilisation d'UptiBlue (Interchim, France), qui est un réactif à base de résazurine. C'est un agent d'oxydoréduction qui utilise les capacités oxydantes de la

mitochondrie et le NADH (**Figure 47**) sans être toxique pour la cellule et qui présente un certain nombre d'avantages par rapport au test WST-1 (O'Brien et al., 2000). La concentration en résazurine peut être mesurée par spectrophotométrie ou par fluorimétrie.

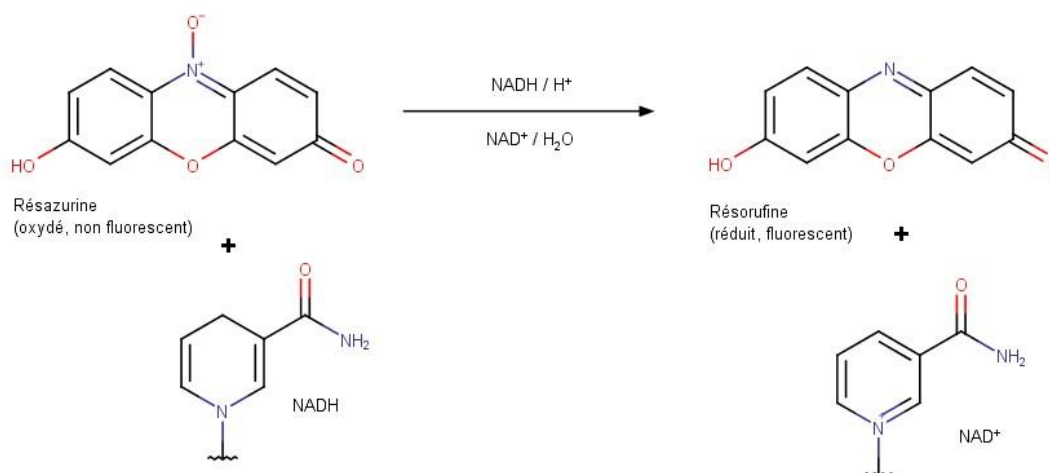


Figure 47. Réaction d'oxydoréduction de la résazurine (© Pierre Darme).

La révélation à l'UptiBlue (Interchim, France) est la même pour le screening ou pour la détermination de la CI₅₀ des extraits d'écorces d'arbres. Après 72 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de culture contenu dans les plaques 96 puits est aspiré stérilement. Du milieu de culture frais IMDM à 2% de SVF et supplémenté de 10% d'UptiBlue est ensuite ajouté à raison de 100 µL par puits. Les plaques sont mises à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 3 heures (**Figure 48**). L'absorbance est finalement lue à 570 nm avec une référence à 600 nm au spectrophotomètre (FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech, France).



Figure 48. Coloration à la résazurine obtenue après 3 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂. Les puits roses témoignent de la présence de cellules viables, tandis que les puits violets et bleus témoignent d'une mortalité cellulaire importante.

d. Analyse des données

L'effet cytotoxique des différents extraits naturels testés est représenté par une courbe de régression linéaire. La moyenne des valeurs de Densité Optique (DO) pour les témoins est estimée comme représentant une viabilité cellulaire de 100%. La courbe de régression linéaire représente le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du logarithme népérien (Ln) de la concentration en extrait naturel testé en $\mu\text{g/mL}$. La courbe obtenue peut être exprimée de différentes façons. Soit il s'agit d'un plateau, auquel cas la viabilité cellulaire est constante, aux alentours de 100%, signifiant que l'extrait naturel n'a aucun effet cytotoxique sur les cellules Vero. Soit il s'agit d'une sigmoïde, présentant trois droites de régression linéaire de type $y = ax + b$ construites sur Excel à partir du nuage de points. Dans ce modèle graphique, y représente la DO, reflet de la viabilité cellulaire et x représente le logarithme de la concentration en extrait naturel. La première droite (d1) indique l'absence d'effet cytotoxique, la seconde droite (d2) indique l'apparition de la cytotoxicité et son augmentation, et la troisième et dernière droite (d3) témoigne de l'effet cytotoxique résiduel des concentrations les plus élevées. Le calcul de la CC_{50} est illustré dans la **Figure 49**.

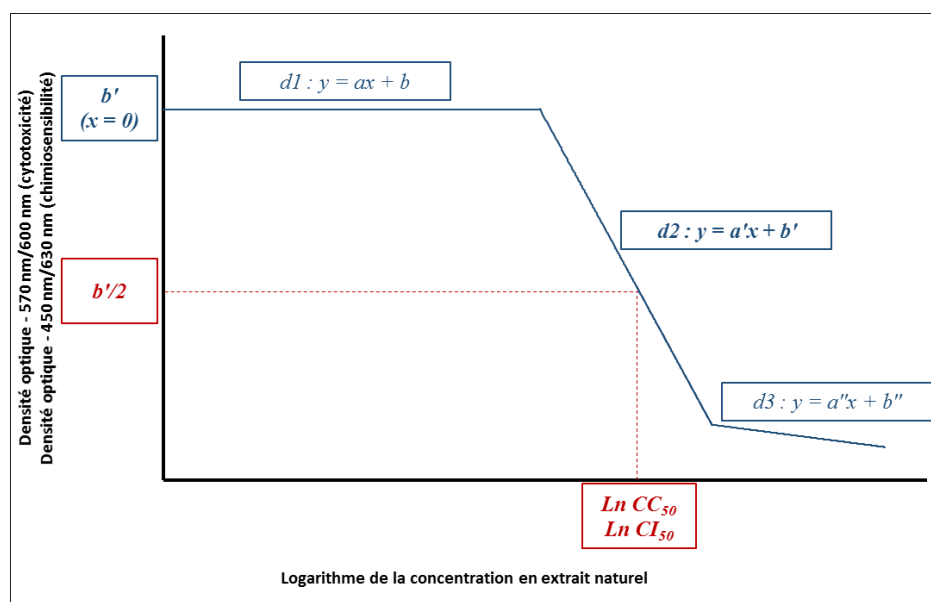


Figure 49. Obtention du logarithme de la CC_{50} ou de la CI_{50} à partir des DO et des droites de régression linéaire.

3) Préparation des cellules Vero pour l'évaluation de la chimiosensibilité

Les cellules Vero sontensemencées sur une plaque 96 puits, à raison de 200 μL de suspension cellulaire contenant 20 000 cellules par puits. Les puits ainsi préparés permettront d'obtenir par la suite un tapis cellulaire adapté à l'infestation par les tachyzoïtes. Les plaques

sont ensuite incubées 4 heures à 37°C et à 5% de CO₂, permettant aux cellules de sédimenter et d'adhérer au support avant leur infestation par les parasites.

4) Chimiosensibilité de *T. gondii* et de *N. caninum* aux extraits naturels

a. Screening

Les tachyzoïtes entretenus sur cellules Vero sont comptés sur cellule Kova[®] Slide comme décrit précédemment. Chaque puits est inoculé avec 50 µL de suspension parasitaire contenant 10 000 tachyzoïtes de la souche RH de *T. gondii* (milieu IMDM à 2% de SVF) ou 40 000 tachyzoïtes de la souche NC1 de *N. caninum* (milieu IMDM à 5% de SVF), sauf 8 puits. Ceux-ci serviront de témoins et ne comporteront que des cellules seules et dans lesquels sont rajoutés 50 µL de milieu IMDM à 5% de SVF. Les plaques 96 puits sont ensuite incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 3 heures. Ce laps de temps permet aux parasites de sédimenter et d'envahir les cellules Vero. Ensuite, 25 µL d'extrait naturel solubilisé dans le DMSO à tester sont déposés dans chacun des puits comme décrit précédemment pour la cytotoxicité. La concentration testée dépend des résultats obtenus lors du screening en cytotoxicité. De la même façon, 3 puits sont utilisés pour chaque extrait naturel dont l'action antiparasitaire est à déterminer. Les plaques sont incubées 72 heures à 37°C et 5% de CO₂ avant d'être fixées au méthanol froid en vue de leur révélation par dosage immuno-enzymatique ELISA.

b. Détermination de la Concentration Inhibitrice à 50% (CI₅₀)

De la même façon que pour le screening décrit précédemment, 50 µL de suspension parasitaire sont ajoutés dans chaque puits, sauf 8 puits témoins (cellules seules) après les 4 heures d'incubation des plaques 96 puits. Les extraits d'écorces d'arbres solubilisés dans le DMSO sont ensuite ajoutés à raison de 25 µL par puits après avoir préparé une gamme de concentrations par une série de dilutions au ½ en fonction de la concentration maximale non cytotoxique déterminée lors du screening de cytotoxicité. A noter que 16 puits sont réservés au contrôle à la pyriméthamine solubilisée dans du DMSO, avec une gamme de concentrations également obtenue par une série de dilutions en cascade et allant de 0,0156 µg/mL à 2 µg/mL. Le plan de plaque ainsi utilisé est présenté dans la **Figure 50**. Les expérimentations sont réalisées en triplicate.

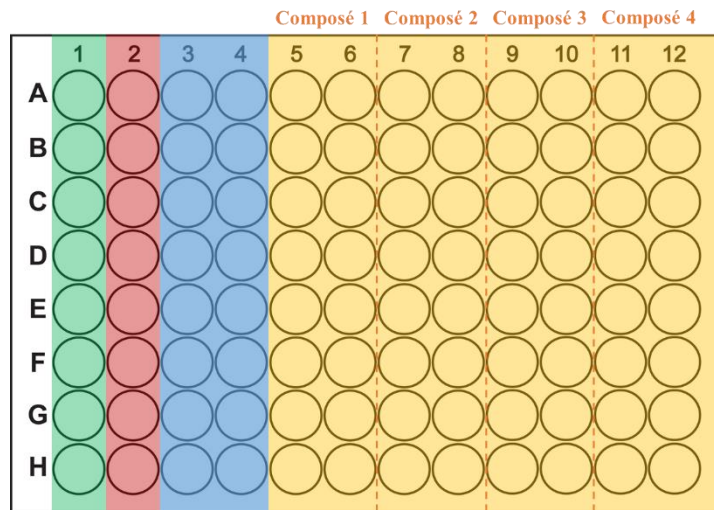


Figure 50. Plan de plaque utilisé pour la détermination de la CI₅₀. La plaque se décompose comme suit : les puits témoins (cellules seules, en vert), contrôles (cellules parasitées, en rouge), Pyr (cellules parasitées traitées à la pyriméthamine, en bleu) et les composés à tester (cellules parasitées traitées aux composés à tester, en jaune).

c. Fixation des cultures parasitaires au méthanol froid

À l'issue des 72 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les puits sont vidés par retournement de façon à ce que le maximum de milieu de culture soit éliminé. Dans chacun d'entre eux sont versés 200 µL de méthanol froid à -20°C. Les plaques sont ensuite mises à -20°C pendant au moins 5 minutes. Les puits sont de nouveau vidés et mis à sécher à l'air libre à température ambiante. Lorsque tous les puits sont parfaitement secs, les plaques sont stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour le dosage immuno-enzymatique ELISA.

d. Dosage ELISA

Pour *T. gondii*, l'évaluation de la croissance parasitaire est mesurée grâce à un anticorps monoclonal GII9 de souris (Argene Biosoft, France) qui reconnaît spécifiquement la protéine de surface SAG1 (Surface Antigen 1). Cet anticorps est également couplé à une enzyme de type peroxydase. Par la dégradation du substrat, cette enzyme va induire la coloration du milieu en jaune (**Figure 51**). L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de tachyzoïtes retrouvés dans les puits. Pour *N. caninum*, il s'agit, dans un premier temps, d'un anticorps monoclonal issu d'un surnageant d'hybridome de souris reconnaissant une protéine de surface de 38 kDa (Schaes et al., 1999), gracieusement mis à notre disposition. Cet anticorps n'étant pas couplé à une peroxydase, l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxydase est nécessaire (**Figure 51**).

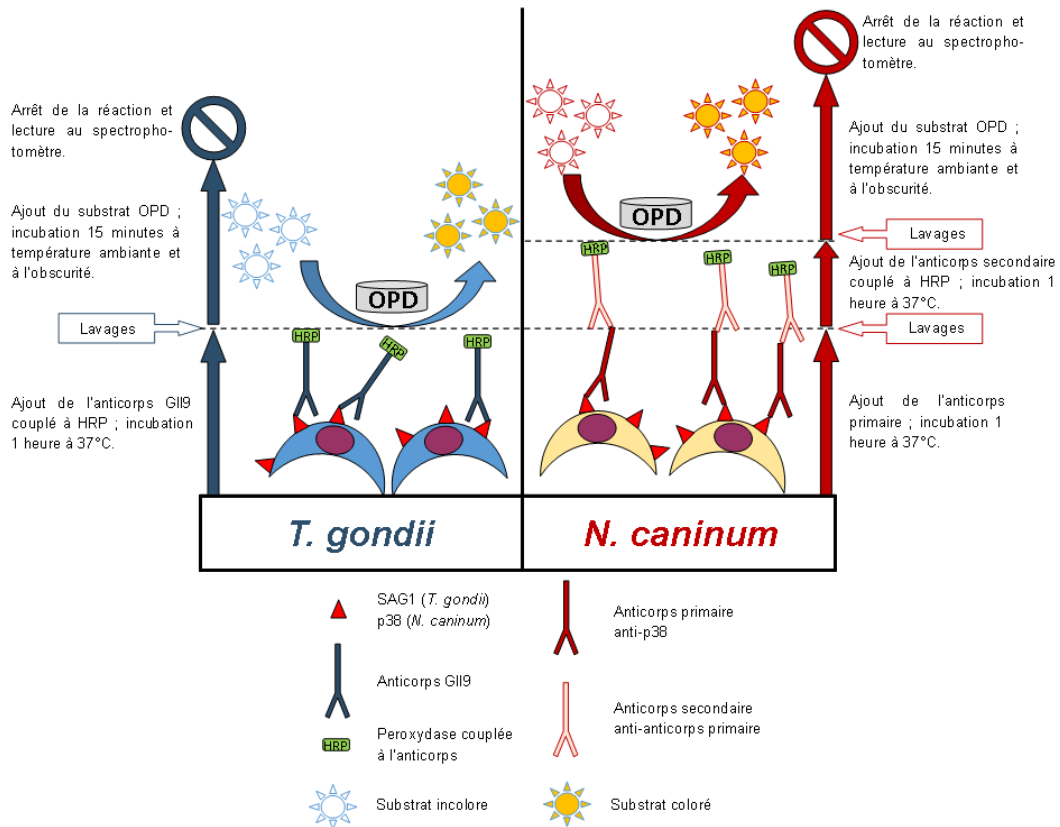


Figure 51. Protocole du dosage immuno-enzymatique ELISA pour *T. gondii* et *N. caninum*.

Après la fixation des plaques 96 puits avec du méthanol froid, celles-ci sont réhydratées avec 200 μL de PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite, pour *T. gondii*, 60 μL d'anticorps primaire GII9 (10,1 mg/mL) dilué au 1/3000^{ème} dans le tampon de conjugué (**Tableau VI**) sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Dans le cas de *N. caninum*, l'anticorps primaire monoclonal initialement utilisé provient d'un surnageant d'hybridome (Schares et al., 1999), gracieusement offert par le Docteur Gereon Schares. Par conséquent, sa concentration initiale est relativement faible. Il est dilué au 1/10^{ème} dans le tampon de conjugué. Un second anticorps primaire, cette fois polyclonal (Thermo Scientific, Etats-Unis), a été utilisé par la suite pour pallier au manque d'anticorps monoclonal. De la même façon que pour *T. gondii*, les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Cette étape est suivie d'une série de 4 lavages avec du tampon de lavage 1X (**Tableau VI**) avant d'ajouter 60 μL d'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase HRP dilué au 1/3000^{ème} dans le tampon de conjugué. Pour chacun des deux parasites, les puits sont ensuite lavés 4 fois avec du tampon de lavage 1X. Puis 200 μL de substrat OPD (O-phénylènediamine dihydrochloride) (Sigma, France) sont ajoutés dans chaque puits afin de déterminer l'activité

de la peroxydase HRP. Les plaques sont mises à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. Une pastille d'OPD est dissoute dans 10 mL de tampon de substrat (**Tableau VI**).

Tableau VI. Composition des différents tampons utilisés pour le dosage ELISA.

Tampon de conjugué	Pour 100 mL
Tris/NaCl (pH 7,3) 74,9% (v/v)	74,9 mL
IGEPAL® CA-630 0,1% (v/v) (Sigma)	0,1 mL
Ethylmercuriothiol-Benzoesaïre Natrium Sals 0,2 mM (Merck Millipore)	10 g
SVF décomplémenté 25 (v/v) (Biowest)	25 mL
Hexaferriyanure de potassium 50 mM (Sigma)	1,65 g
Tampon de lavage 10X	Pour 100 mL
Chlorure de sodium 140 mM (Merck Millipore)	8 g
Chlorure de potassium 2,5 mM (Merck Millipore)	0,2 g
Dihydrogénophosphate de sodium 10 mM (Merck Millipore)	1,78 g
Dihydrogénophosphate de potassium 2,5 mM (Merck Millipore)	0,2 g
Ethylmercuriothiol-Benzoesaïre Natrium Sals 0,02 mM (Merck Millipore)	0,01 g
Tween 20 0,1% (v/v) (Merck Millipore)	0,1 mL
QSP 100 mL H ₂ O MilliQ	
Tampon de substrat	Pour 100 mL
Acide citrique 40 mM (Merck Millipore)	0,87 g
Dihydrogénophosphate de sodium 120 mM (Merck Millipore)	2 g
Ethylmercuriothiol-Benzoesaïre Natrium Sals 0,2 mM (Merck Millipore)	0,01 g
Peroxyde d'hydrogène (30%) 0,02% (v/v)	70 µL
QSP 100 mL H ₂ O MilliQ	

Puis la réaction est stoppée par ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique 1 N dans chaque puits. Enfin, 200 µL de surnageant sont prélevés dans chaque puits avant d'être transférés dans une nouvelle plaque 96 puits. L'absorbance est finalement lue à 450 nm, avec une seconde lecture de référence à 630 nm.

e. Analyse des données

De la même façon que pour la détermination de la CC₅₀ décrite précédemment, l'effet antiparasitaire des différents extraits naturels testés peut être représenté de deux façons selon s'il est positif ou négatif. La moyenne des valeurs de DO pour les témoins est estimée comme représentant une croissance parasitaire de 100%. La courbe de régression linéaire représente le pourcentage de croissance parasitaire en fonction du logarithme népérien (Ln) de la concentration en extrait naturel testé en µg/mL. Si l'extrait n'a aucun effet, alors la courbe

résultera en un plateau, traduisant une croissance parasitaire constante aux alentours de 100%. En cas d'effet antiparasitaire avéré, la courbe de régression linéaire résultera en une sigmoïde présentant trois droites de régression linéaire de type $y = ax + b$. Dans ce modèle graphique, y représente la DO, reflet de la viabilité cellulaire et x représente le logarithme de la concentration en extrait naturel. La première droite (d1) indique l'absence d'effet antiparasitaire, la seconde droite (d2) indique l'apparition de cet effet et son augmentation, et la troisième et dernière droite (d3) témoigne de l'effet antiparasitaire résiduel des concentrations les plus élevées. Le calcul de la CI_{50} est illustré dans la **Figure 49**.

f. Coloration des cellules infestées et contrôles microscopiques

Les plaques de culture sont réhydratées avec 200 μ L de PBS pendant 10 minutes avant d'être colorées grâce au kit RAL 555 (RAL Diagnostics, France). Tout d'abord, chaque puits est incubé 1 minute en présence de 100 μ L d'éosine. Les puits sont vidés et 100 μ L de bleu de méthylène y sont ajoutés pendant 4 minutes. Enfin, les puits sont de nouveau vidés et l'excédent de colorant est éliminé par 2 lavages au PBS. Les plaques sont séchées à température ambiante. Chaque observation des plaques au microscope optique est précédée par l'ajout de 200 μ L de PBS dans chacun des puits à observer (**Figures 44 et 45**). L'observation est réalisée sur le vidéomicroscope Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Allemagne) en collaboration avec le Dr. Frédéric Velard, ingénieur de Recherche au laboratoire EA 4691 BIOS (Biomatériaux et Inflammation en site Osseux) à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

5) Calcul des indices de sélectivité (IS)

L'indice de sélectivité est un indice témoignage de la significativité de l'effet d'un composé antiparasitaire sur un parasite donné, relativement à la cytotoxicité qu'il peut induire sur les cellules-hôtes. Cet indice est calculé par le rapport suivant :

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

En d'autres termes, pour qu'un composé ait un effet antiparasitaire sélectif, il doit induire une inhibition de la croissance parasitaire à une concentration la plus faible possible tout en étant cytotoxique à une concentration la plus élevée possible. Plus cet indice de sélectivité est élevé, moins le composé est toxique pour les cellules-hôtes par rapport à l'effet antiparasitaire qu'il induit.

Pour qu'un composé soit considéré comme étant sélectif, il faut que son indice de sélectivité soit au minimum égal à 4, valeur choisie dans nos travaux portant sur la Pathogen Box (Spalenka et al., 2018). En-dessous de cette valeur, il est considéré que l'effet antiparasitaire observé relève plutôt d'une cytotoxicité importante provoquant la mort des cellules-hôtes, et par conséquent la mort des parasites se trouvant dans celles-ci lors de leur multiplication intracellulaire. Si cet indice est supérieur ou égal à 10, alors l'effet antiparasitaire observé est suffisamment intéressant pour pouvoir prétendre à une étude *in vivo* sur modèle murin.

6) Détermination préliminaire de l'action des extraits naturels sélectifs sur *T. gondii* vis-à-vis de la multiplication parasitaire et de l'invasion cellulaire

a. Préparation des cellules infestées

Après avoir évalué l'activité antiparasitaire des extraits naturels, il est intéressant de déterminer le mode d'action de ces extraits sur le parasite. En effet, différents mécanismes peuvent être inhibés, tels que l'invasion de la cellule ou la multiplication intracellulaire. Pour cela, un protocole a été adapté pour notre modèle à partir de travaux antérieurs sur *T. gondii* (D'Angelo et al., 2009). Tout d'abord, les cellules Vero sontensemencées sur une plaque 96 puits, à raison de 200 μ L de suspension cellulaire contenant 40 000 cellules par puits. Les plaques sont incubées 4 heures à 37°C et à 5% de CO₂. En parallèle, les tachyzoïtes sont incubés en présence du composé actif, à une concentration légèrement supérieure à la CI₅₀, pendant 20 minutes à température ambiante. A l'issue de l'incubation à 37°C, les plaques sont vidées de leur surnageant, et 100 μ L de suspension parasitaire incubée en présence du composé actif et contenant 100 000 tachyzoïtes sont déposés dans chaque puits, sauf 8 puits témoins dans lesquels 100 μ L de milieu de culture IMDM à 2% de SVF sont déposés à la place de la suspension parasitaire. Les plaques sont de nouveau incubées 1 heure à 37°C et à 5% de CO₂. Les puits sont ensuite lavés deux fois au PBS et les plaques sont fixées au méthanol froid comme décrit précédemment avant stockage à -20°C.

b. Immunomarquage pour microscopie optique

Les puits sont réhydratés avec 200 μ L de PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite vidés par tapotement pour enlever le maximum de PBS. De la même façon que pour le dosage ELISA décrit précédemment, 60 μ L d'anticorps primaire GII9 dilué au 1/3000^{ème} dans du tampon de conjugué (**Tableau VI**) sont déposés dans chaque puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C. Les puits sont vidés puis lavés quatre

fois avec du tampon de lavage 1X (**Tableau VI**). Les puits sont de nouveau vidés par tapotement avant d'y déposer 60 μL d'anticorps secondaire anti-souris couplé à l'AlexaFluor 488 dilué au 1/3000^{ème} dans du tampon de conjugué. Les plaques sont incubées 1 heure à température ambiante et à l'obscurité avant d'être à nouveau lavées avec du tampon de lavage 1X. Enfin, 200 μL de PBS sont ajoutés dans chaque puits pour garder les cultures fixées hydratées. Les plaques ainsi marquées sont stockées à +4°C jusqu'à leur utilisation en microscopie optique.

c. Immunolocalisation pour microscopie confocale

Pour la microscopie confocale, les cellules et parasites sontensemencés sur des chambres de culture Lab-Tek 8 puits (Dutscher, France) à la place des plaques 96 puits. L'immunomarquage se fait après fixation des chambres par le méthanol froid. Tout d'abord, les sites non spécifiques sont saturés avec 400 μL d'albumine de sérum bovin (BSA) à 3% (v/v) diluée dans du PBS et filtrée sur 0,4 μm . Les chambres Lab-Tek sont incubées pendant 45 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite vidés et 400 μL de PBS-BSA 1% (v/v) filtré sur 0,4 μm y sont déposés. Les chambres de culture sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante. Les puits sont vidés et 400 μL d'anticorps primaire GII9 dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-BSA 1% (v/v) sont déposés dans chacun d'entre eux. Les chambres de culture sont incubées pendant 1 heure à 37°C en chambre humide. Les puits sont à nouveau vidés et lavés trois fois avec 400 μL de PBS-BSA 1% (v/v). L'anticorps secondaire est ensuite ajouté à raison de 400 μL d'anticorps anti-souris couplé à l'AlexaFluor 568 dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-BSA 1% (v/v). Les chambres Lab-Tek sont incubées pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité avant d'être lavées 3 fois avec 400 μL de PBS-BSA 1% (v/v). Ce marquage servira à l'observation des tachyzoïtes de *T. gondii*. Les puits sont ensuite remplis de 400 μL de Hoechst 33342 dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS. Les chambres Lab-Tek sont ainsi incubées 15 minutes à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité. Ce marquage permettra d'observer les noyaux des cellules Vero et des tachyzoïtes. Une nouvelle série de trois lavages au PBS est réalisée, puis 400 μL d'éosine sont déposés dans chaque puits avant d'être lavés trois fois au PBS une dernière fois. L'éosine étant autofluorescente, celle-ci est utilisée pour marquer le cytoplasme des cellules Vero et, dans une moindre mesure, des tachyzoïtes. Les puits sont finalement enlevés. Une lamelle est lutée sur la lame de la chambre de culture Lab-Tek avec du vernis après avoir déposé quelques microlitres de PBS pour hydrater les cultures cellulaires. La lame ainsi préparée est stockée à +4°C à l'obscurité et conservée ainsi jusqu'à son observation en microscopie confocale.

d. Analyse des données

i. Microscopie optique

Après la fixation au méthanol froid, les plaques sont hydratées avec 200 μ L de PBS. Les puits sont ensuite observés au vidéomicroscope Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Allemagne) en collaboration avec le Dr. Frédéric Velard, ingénieur de Recherche au laboratoire EA 4691 BIOS (Biomatériaux et Inflammation en site Osseux) à l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Quatre champs différents par puits sont photographiés avant d'être réunis en une mosaïque. Les images obtenues en fluorescence d'une part et en microscopie à contraste interférentiel d'autre part sont ensuite fusionnées pour avoir une vue d'ensemble (**Figure 52**).

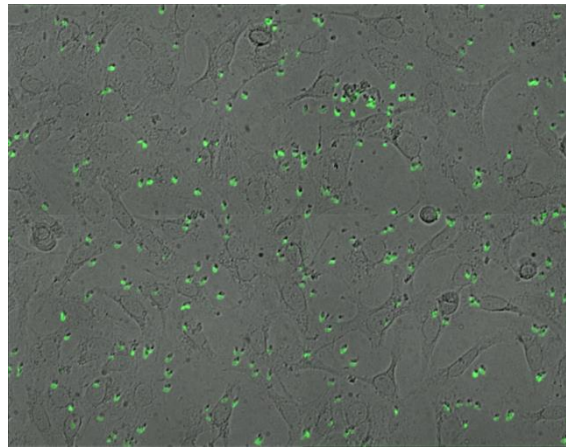


Figure 52. Observation au microscope optique de tachyzoïtes de *T. gondii* marqués à l'AlexaFluor 488 en train d'envahir des cellules Vero (G : X 40).

Le pourcentage de parasites marqués est finalement déterminé par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ.

ii. Microscopie confocale

Les lames sont observées au microscope confocal LSM 710 NLO (Zeiss, Allemagne) couplé à un laser infrarouge biphoton Chameleon (Coherent, Etats-Unis) et piloté par le logiciel ZEN (Zeiss, Allemagne), en collaboration avec le Dr. Christine Terryn, responsable technique de la Plate-forme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT) à l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Les images obtenues subissent une reconstruction 3D à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane, Suisse) afin de localiser précisément le parasite vis-à-vis de la cellule-hôte après traitement (**Figure 53**).

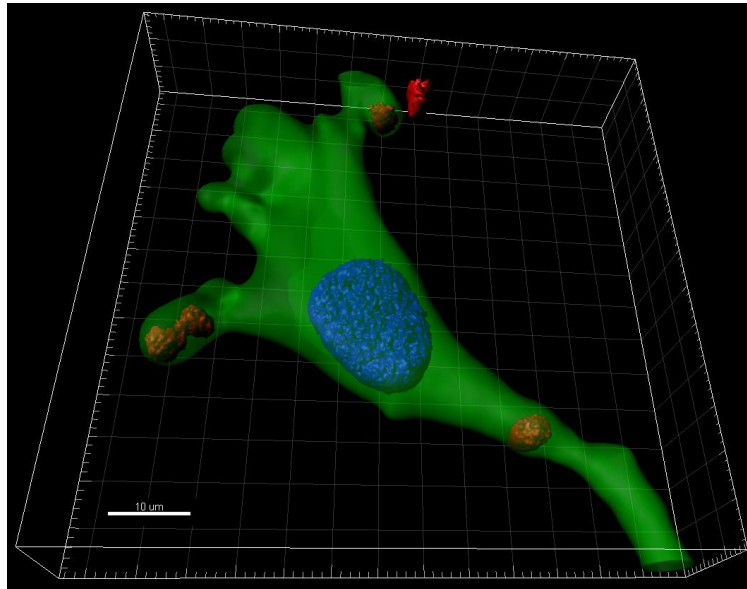


Figure 53. Exemple de reconstruction 3D à partir d'observations au microscope confocal de tachyzoïtes de *T. gondii* (rouge) après invasion de la cellule Vero (vert) (G : X 63). Le noyau de la cellule Vero est représenté en bleu.

IV) Evaluation du potentiel antiparasitaire *in vitro* des extraits d'écorces d'arbres sur *P. falciparum*

1) Préparation de la suspension parasitaire

Un frottis de la culture parasitaire incubée à 37°C est réalisé. Le volume total de suspension parasitaire nécessaire en fonction du nombre de puits (soit 10 mL pour une plaque 96 puits) est ensuite calculé. Le volume de globules rouges totaux est estimé de façon à obtenir un hématocrite de 4% (soit 400 μL pour 10 mL). La parasitémie est adaptée en conséquence pour obtenir une parasitémie de 1% en ajoutant des globules rouges sains préalablement préparés. Enfin, le volume de MCM est ajouté afin de compléter jusqu'au volume final souhaité.

2) Chimiosensibilité de *P. falciparum*

a. Détermination de la CI_{50}

Après la préparation de la suspension parasitaire, celle-ci est déposée dans chaque puits à raison de 100 μL/puits. Quatre puits restent vides pour y placer les témoins du kit ELISA : trois puits pour le témoin positif, un puits pour le témoin négatif. De la même façon, quatre autres puits servent également de contrôles de la culture : trois puits pour les globules rouges parasités (témoin positif) et un puits pour les globules rouges sains (témoin négatif). Pour le témoin

positif, 100 µL de MCM supplémentés de 1% de DMSO sont ajoutés dans les puits, suivis de 100 µL de suspension parasitaire à 1% de parasitémie et 4% d'hématocrite. Il en va de même pour le témoin négatif, mais sans parasite. Ensuite, 200 µL de chaque extrait ou fraction à tester est mis dans un puits avant d'effectuer une série de dilutions en cascade au 1/2, pour un volume final de 100 µL par puits, afin d'obtenir une gamme de huit concentrations de 0 à 100 µg/mL. Enfin, 100 µL de suspension parasitaire à 1% de parasitémie et 4% d'hématocrite sont déposés dans chaque puits, amenant ainsi le volume final à 200 µL par puits. Un contrôle à la chloroquine est également utilisé. La plaque est incubée pendant trois jours à 37°C et 5% de CO₂. L'expérimentation est réalisée au minimum deux fois.

b. Dosage ELISA

A l'issue des trois jours d'incubation, la plaque est ensuite révélée grâce au kit ApDia Malaria Antigen Elisa (ApDia, Belgique). La lecture au spectrophotomètre (FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech, France) se fait à 450 nm, avec une référence à 630 nm. Si besoin, le surnageant peut être dilué au 1/10^{ème} avant lecture au spectrophotomètre afin d'éviter une saturation de la cellule de lecture du spectrophotomètre.

c. Analyse des données

Suite au dosage ELISA, les données sont traitées grâce au logiciel GraphPad Prism 6.0. Ainsi, le taux d'inhibition de la croissance parasitaire en fonction des différentes concentrations des extraits testés est évalué par rapport au contrôle positif (globules rouges parasités). La CI₅₀ est calculée en utilisant la fonction « Dose-response – Inhibition » intégrée dans le logiciel, qui représente la croissance parasitaire en fonction du logarithme de la concentration en extrait ou fraction sous la forme d'une sigmoïde.

V) Evaluation du potentiel antiparasitaire *in vitro* de 400 composés provenant de la Pathogen Box

1) Préparation des composés

Les composés présents dans la Pathogen Box sont fournis par la fondation Medecines for Malaria Venture (MMV) (Genève, Suisse). Ils sont originellement lyophilisés dans des plaques 96 puits et stockés à -20°C. Chaque composé, à raison d'un par puits, est dilué dans 10 µL de DMSO à une concentration de 10 mM (solution-mère). Pour le screening, les solutions-mères

sont diluées dans du milieu de culture IMDM à 2% de SVF à une concentration de 1 μM . Pour la détermination des CI_{50} , les solutions-mères sont diluées en cascade au $\frac{1}{2}$ dans du milieu de culture IMDM à 2% de SVF de façon à obtenir des gammes de concentrations allant de 2 μM à 0,0156 μM .

2) Screening de la Pathogen Box sur *T. gondii* et *N. caninum*

Les 400 composés de la Pathogen Box sont préparés en accord avec les instructions fournies par la fondation MMV avec la Box avant d'être testés sur *T. gondii* et *N. caninum* dans des plaques 96 puits, en utilisant la pyriméthamine comme contrôle positif. Comme précisé précédemment, les composés sont dilués à une concentration finale de 1 μM dans du milieu de culture IMDM à 2% de SVF. Les puits sont ensuite remplis de 200 μL de suspension cellulaire contenant 20 000 cellules Vero et incubés à 37°C et 5% de CO_2 pendant 4 heures. Les puits, sauf 8 puits servant de contrôles négatifs, sont remplis de 50 μL de suspension parasitaire contenant 60 000 tachyzoïtes. Les plaques sont incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 3 heures. Les puits sont ensuite vidés pour enlever tout parasite qui n'a pas envahi de cellule hôte. Ensuite, 100 μL de composé dilué sont ajoutés dans les puits et les plaques sont de nouveau incubées dans les mêmes conditions environnementales que précédemment. Après 72 heures, les plaques sont fixées au méthanol froid. La croissance parasitaire est ensuite déterminée par ELISA et par un contrôle microscopique comme décrits précédemment. Les puits témoins sans composé représentent 100% de croissance parasitaire. Un composé est considéré actif s'il inhibe au moins 50% de la croissance parasitaire à une concentration de 1 μM . L'expérimentation est réalisée en triplicat.

3) Détermination de la CC_{50}

a. Préparation des cultures cellulaires

De la même façon que pour les extraits naturels, la cytotoxicité *in vitro* a été évaluée sur les cellules Vero en plaques 96 puits. Les puits sontensemencés par 200 μL de suspension cellulaire contenant 20 000 cellules Vero. Les plaques sont incubées 4 heures à 37°C et 5% de CO_2 . Ensuite, les puits, sauf les 8 puits témoins, sont vidés avant d'y déposer 100 μL de chaque composé actif dont les concentrations vont de 100 à 0,80 μM par dilution en cascade au $\frac{1}{2}$. Après 72 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO_2 , la cytotoxicité est évaluée grâce à l'UptiBlue (Interchim, France) comme décrit précédemment. L'expérimentation est réalisée au minimum en duplicat, voire en triplicat en cas de résultats discordants.

b. Analyse des données

La CC₅₀ est représentée par une courbe de régression linéaire comme décrit précédemment (**Figure 49**). Les analyses graphiques sont confirmées par une analyse microscopique en collaboration avec le Dr. Frédéric Velard, ingénieur de Recherche au laboratoire EA 4691 BIOS (Biomatériaux et Inflammation en site Osseux) à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

4) Détermination de la CI₅₀

a. Préparation des cultures cellulaires infectées et traitement

De même que pour les extraits naturels, la chimiosensibilité de *T. gondii* et de *N. caninum* est évaluée en plaques 96 puits. Tout d'abord, 200 µL de suspension cellulaire contenant 20 000 cellules Vero sont déposés dans chaque puits et les plaques sont placées à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 4 heures. Ensuite, 50 µL de suspension parasitaire contenant 60 000 tachyzoïtes sont déposés dans tous les puits sauf les 8 puits témoins. Les plaques sont alors incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 3 heures. Les puits sont ensuite vidés et 100 µL de composé actif y sont déposés, à raison d'une gamme de 8 concentrations obtenue par dilutions en cascade au ½ (de 2 à 0,0156 µM) par composé, sauf pour 8 puits contrôles en plus des 8 puits témoins sans parasite. La pyriméthamine est utilisée comme contrôle positif. Après 72 heures à 37°C et 5% de CO₂, les plaques sont fixées au méthanol froid avant d'être révélées par ELISA comme décrit précédemment. L'expérimentation est réalisée en triplicat.

b. Analyse des données

Après ELISA, la CI₅₀ est calculée à partir du graphe obtenu comme décrit précédemment (**Figure 49**). Les analyses graphiques sont confirmées par une analyse microscopique en collaboration avec le Dr. Frédéric Velard, ingénieur de Recherche au laboratoire EA 4691 BIOS (Biomatériaux et Inflammation en site Osseux) à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

5) Calcul des indices de sélectivité

Les indices de sélectivité sont calculés de la même façon que décrit précédemment, afin de déterminer la spécificité d'un composé antiparasitaire vis-à-vis du parasite et de la cellule-hôte, selon la formule suivante :

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

6) Analyses statistiques

Pour la comparaison des valeurs de CI_{50} , un test one-way ANOVA (analyse de variance à un facteur) suivi d'une comparaison multiple de Bonferroni ont été réalisés ($p < 0,05$). Le logiciel GraphPad Prism 6.0 a été utilisé pour ces tests statistiques.

7) Comparaisons structurales des composés actifs

Les empreintes moléculaires ont été utilisées comme descripteurs afin de comparer la structure des molécules actives. Pour ce faire, les structures chimiques des molécules actives ont été encodées dans une série de chiffres binaires, représentant la présence « 1 » ou l'absence « 0 » de sous-structures au sein d'une molécule donnée. Parmi les nombreuses méthodes d'empreintes existantes (Cereto-Massagué et al., 2015), la méthode « Atom Pair fingerprints » (APfp) (Carhart et al., 1985) est l'une des plus utilisées et a été décrite comme étant la meilleure méthode pour comparer des analogues structurels proches (O'Boyle and Sayle, 2016). De ce fait, l'APfp a été utilisée pour schématiser les structures moléculaires de la pyriméthamine et des molécules actives présentant la meilleure activité dans des vecteurs comprenant 1024 bits, où chaque bit encodait la présence ou l'absence d'un fragment moléculaire particulier. Les empreintes ainsi obtenues ont été soumises à une classification non supervisée (« Hierarchical Clustering Analysis » ou classification hiérarchique ascendante) afin de classer les molécules. Cette analyse statistique a été réalisée grâce aux packages R et les graphiques à l'aide du pack gplots, également sous R.

Le coefficient de Tanimoto T_c et la méthode d'agglomération de Ward ont été utilisés pour les mesures de similarités.

T_c est une méthode commune de calcul de mesure des similarités basée sur les empreintes moléculaires (Bajusz et al., 2015), d'après la formule suivante :

$$S_{A,B} = \frac{a}{(a + b - c)}$$

Ici, « S » représente la similarité entre deux molécules A et B, « a » le nombre de 1 bits dans la molécule A, « b » le nombre de 1 bits dans la molécule B, et « c » le nombre de bits communs. Tous les calculs ont été réalisés grâce au pack Chemminer (Cao et al., 2008) sous R.3.3.3.

VI) Evaluation du potentiel antiparasitaire *in vivo* des extraits d'écorces d'arbres sur *T. gondii* et *N. caninum*

1) Modèle murin utilisé

L'objectif de cette étude *in vivo* est de déterminer si les fractions et composés extraits d'*A. leiocarpus* actifs *in vitro* contre *T. gondii* et *N. caninum* sont également actifs *in vivo* chez la souris dans un système biologique plus complexe. Le projet a fait l'objet d'un protocole approuvé par le Comité d'Ethique en Experimentation Animale de Reims Champagne-Ardenne (C2EA 56), sous le numéro de dossier 2016092210116940. Il a été élaboré de façon à limiter au maximum la souffrance et la détresse de l'animal. Dans ce cadre, j'ai eu l'opportunité de valider le Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale sur petits animaux (rats et souris, principalement). Cette étude *in vivo* m'a donc permis de mettre en application les connaissances et les pratiques acquises *via* ce Diplôme Universitaire. Le modèle utilisé ici consiste en différents lots de souris Swiss, décrits ci-après.

2) Approche expérimentale

a. Lots de souris

Plusieurs lots de souris ont été utilisés au cours de cette étude. Le premier lot (lot A) de souris Swiss immunocompétentes est infecté par 100 000 tachyzoïtes de la souche RH (type I) de *T. gondii* afin de modéliser une toxoplasmose aiguë. Le second lot (lot B) de souris Swiss immunocompétentes est infecté par 100 000 tachyzoïtes de la souche ME49 (type II) de *T. gondii* afin de modéliser une toxoplasmose chronique. Le troisième lot (lot C) de souris Swiss immunodéficientes est infecté par 100 000 tachyzoïtes de la souche ME49 (type II) de *T. gondii* afin de modéliser une toxoplasmose aiguë. Le quatrième et dernier lot (lot D) de souris Swiss immunodéficientes est infecté par 100 000 tachyzoïtes de la souche NC1 de *N. caninum* afin de modéliser une néosporose chronique, puisque ce parasite n'est pas kystogène chez les souris immunocompétentes (Lindsay and Dubey, 1989b). Un lot témoin consistant en un lot de souris non infectées est également utilisé.

b. Immunosuppression des souris

L'immunodéficiência des souris des lots C et D a été obtenue en administrant un corticoïde, la prednisolone (Solupred®), *ad libidum* dans l'eau de boisson pendant 12 jours avant le début

de l'expérimentation. Ce traitement immunosuppresseur est maintenu par la suite pendant toute la durée de l'étude, toujours *ad libidum*.

c. Procédure expérimentale

Pour chaque lot décrit ci-dessus (sauf le lot témoin), un groupe de 10 souris reçoit 500 µL traitement à 200 µg/mL 10 minutes après inoculation des tachyzoïtes en intrapéritonéale. Un second groupe reçoit le traitement 24 heures plus tard, un troisième groupe 72 heures plus tard et un quatrième groupe 24 heures avant inoculation des tachyzoïtes, en cas d'absence d'effet antiparasitaire des traitements à 24 et 72 heures. Le groupe témoin reçoit, quant à lui, une injection de DMSO 1% (v/v).

Les traitements consistent en une injection intra-péritonéale de composé actif *in vitro* sur les parasites, solubilisé dans le DMSO. L'injection tient compte de la toxicité du DMSO *in vivo* : la dose maximale de DMSO injectée est de 1% (v/v) (Gielen et al., 1998). Toutes les procédures d'inoculation des parasites et de traitements sont réalisées par injections intrapéritonéales.

d. Sacrifice des souris et récupération des organes d'intérêt

Les souris sont sacrifiées 30 jours post-infection. L'euthanasie est réalisée par inhalation de CO₂ suivie d'une dislocation cervicale. Le foie, les poumons, le cerveau, la rate et le cœur sont prélevés immédiatement après, ainsi qu'un maximum de sang avant sa coagulation. En cas de décès précoce, seule la date du décès est notée et aucun prélèvement d'organe n'est effectué.

Les prélèvements ainsi réalisés sont ensuite analysés par qRT-PCR pour quantifier les parasites dans chaque échantillon et en déduire l'efficacité du composé naturel testé. Seuls les cerveaux et les cœurs ont été utilisés ici pour la PCR.

Les souris sont étroitement surveillées quotidiennement afin d'éviter toute souffrance due à la multiplication des parasites en cas d'inactivité des composés naturels, en accord la réglementation éthique concernant l'expérimentation animale.

e. Analyse des échantillons biologiques

Consécutivement à la mise à mort de l'animal, le sang et les organes sont récupérés pour chaque souris. Le cerveau est écrasé et homogénéisé dans du tampon de lyse NucliSens (Biomérieux, France) avant d'être stocké à -80°C. Les autres échantillons collectés sont immédiatement stockés à -80°C. Pour l'extraction d'ADN du cerveau, celui-ci est décongelé à

température ambiante. Ensuite, 20 µL de protéinase K, 200 µL de Tris-HCl 20 mM et 50 µL de SDS 0,5% ont été ajoutés à 300 µL d'échantillon. Le mélange est ensuite homogénéisé par vortex et incubé à 56°C pendant 30 minutes. L'ADN est extrait par la méthode automatisée NucliSens easyMAG, élué dans 110 µL de tampon et stocké à -20°C jusqu'à ce que la qRT-PCR soit réalisée.

L'amplification est faite par qRT-PCR en ciblant l'élément répété de 529 bp de *T. gondii* (De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012). Chaque amplification inclut un contrôle positif (ADN total extrait directement de tachyzoïtes de la souche ME49) et un contrôle négatif (eau RNase- et DNase-free). La qRT-PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL en utilisant 12,5 µL de Platinum Supermix UDG (Invitrogen, Royaume-Uni), mélangé à 10 µL d'ADN matrice, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL d'amorces à une concentration de 20 µM (amorce Forward 5'-CGGAGAGGGAGAAGATGTT-3', et amorce Reverse 5'-GCCATCACCACGAGGAAA-3') et 0,5 µL de sonde spécifique à une concentration de 2 µM (5'-FAM-CTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGG-BHQ1-3') (De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012). Les cycles d'amplification se déroulent comme décrit ci-après. Tout d'abord, une décontamination initiale par UDG est réalisée à 50°C pendant 2 minutes, suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 2 minutes. Puis 45 cycles à 95°C sont effectués pendant 15 secondes puis à 60°C pendant 1 minute. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel iCycler.

VII) Récapitulatif de la méthodologie mise en jeu

L'approche utilisée dans cette étude est présentée schématiquement pour le criblage des extraits et fractions d'*A. leiocarpus* (**Figure 54**) et des dix arbres de la région Champagne-Ardenne (**Figure 55**) sur *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum*.

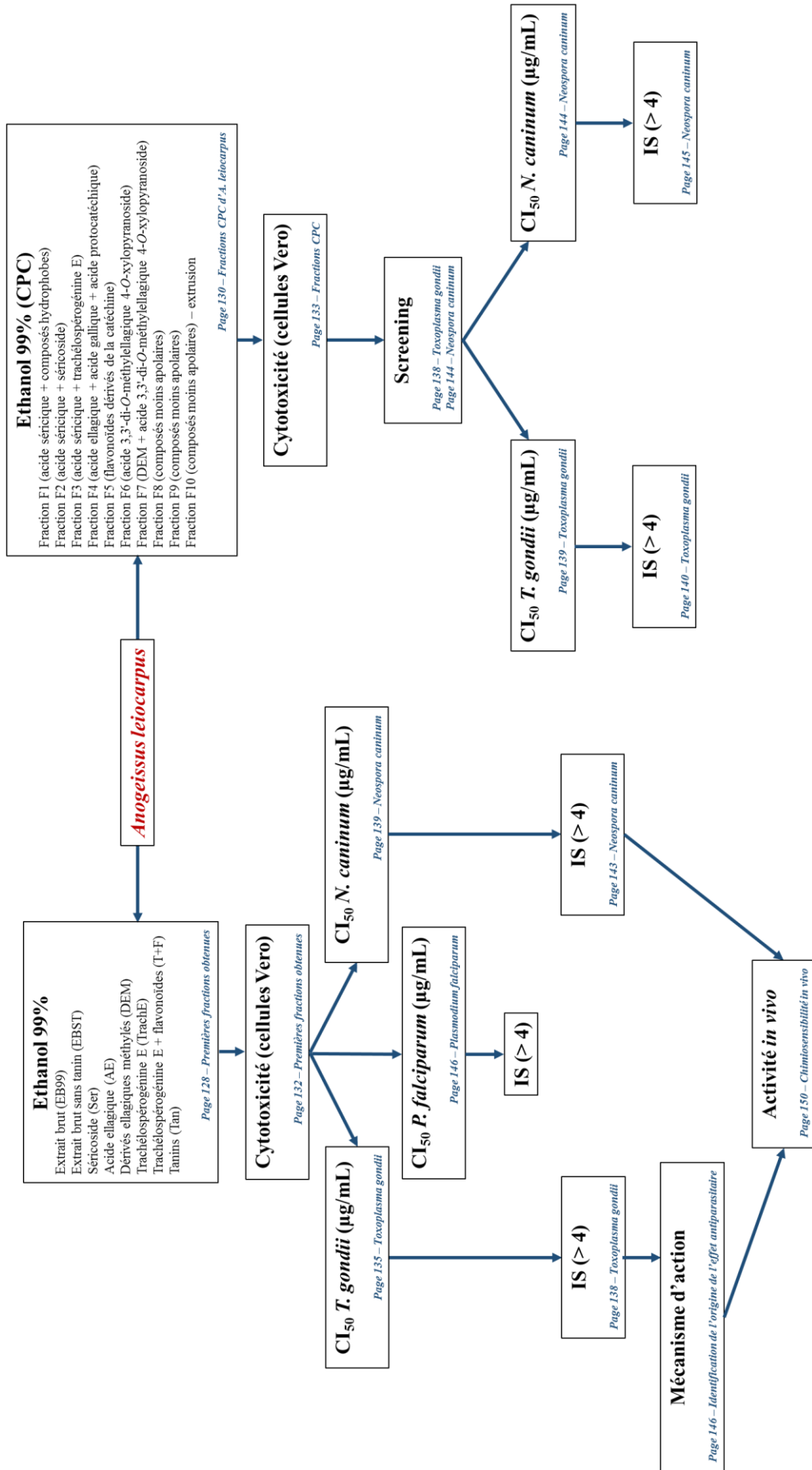


Figure 54. Récapitulatif de la méthodologie appliquée pour le criblage des extraits et fractions d'*A. leiocarpus* sur *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciiparum*.

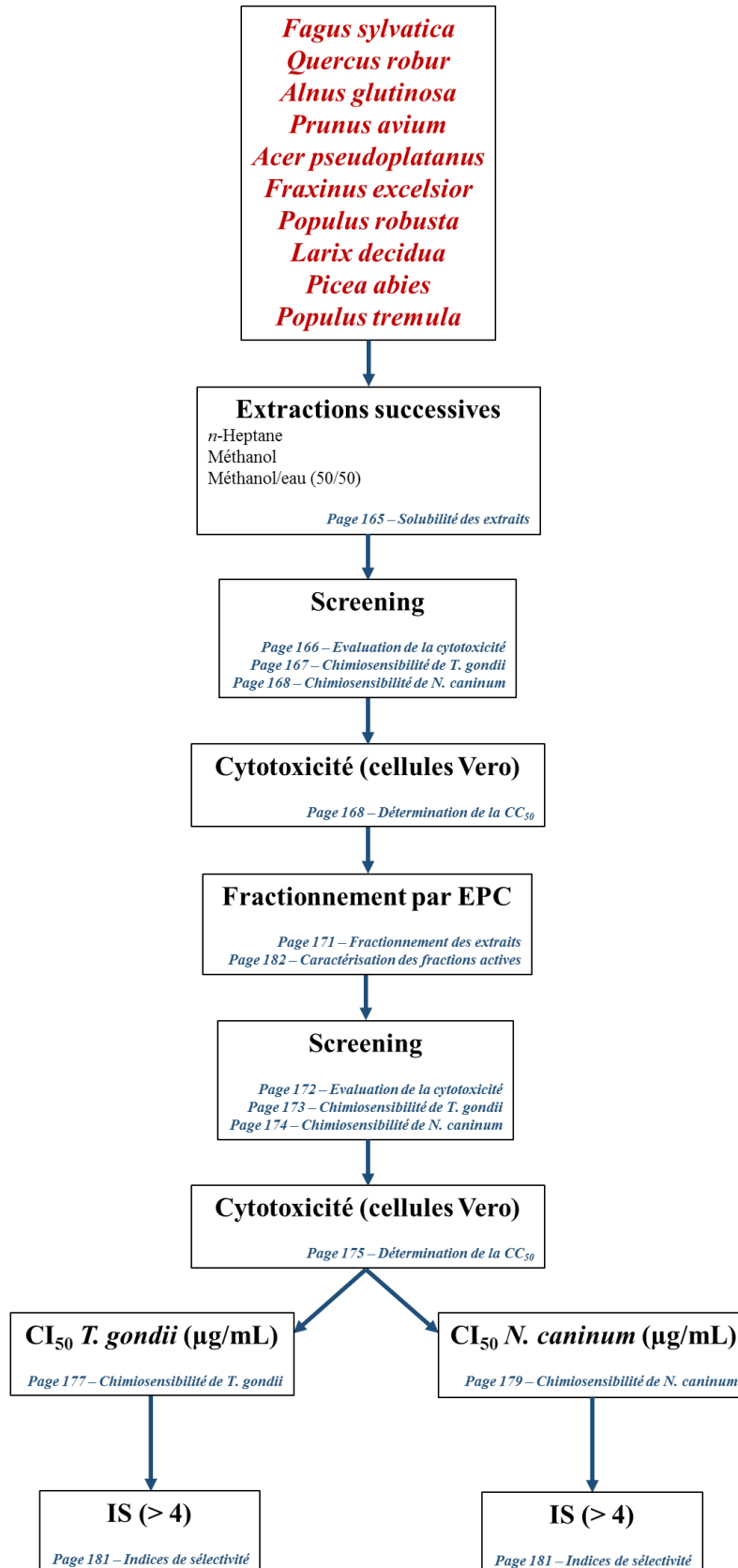


Figure 55. Récapitulatif de la méthodologie appliquée pour le criblage des extraits et fractions issus des dix arbres de la région Champagne-Ardenne sur *T. gondii* et *N. caninum*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie I : Chimiosensibilité de *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum* aux extraits d'écorce d'*A. leiocarpus*

I) Etudes préliminaires : isolement, identification et solubilité des fractions et détermination de la cytotoxicité

1) Isolement et identification des fractions obtenues par EPC

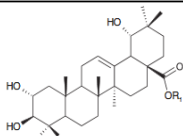
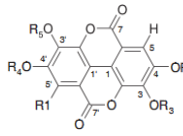
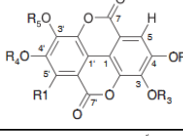
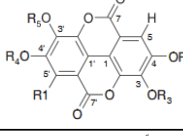
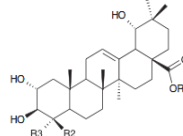
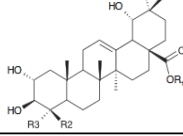
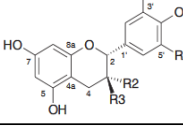
a. Premières fractions obtenues

L'extrait éthanol 99% brut de poudre d'écorce d'*A. leiocarpus* a été fractionné par CPC, en utilisant un système de solvant triphasique particulièrement adapté au fractionnement rapide d'un extrait riche en tanins (Hamzaoui et al., 2013b). Cette méthode permet de fractionner de grandes quantités d'extraits bruts (plusieurs grammes en une seule expérience) tout en facilitant la caractérisation de fractions complexes de produits naturels (Hamzaoui et al., 2013b). En effet, les composés naturels retrouvés dans l'écorce d'*A. leiocarpus* (triterpènes, acide ellagique et dérivés, saponosides, flavonoïdes, acides phénoliques) couvrant un large éventail de polarité, il a été difficile de trouver une méthode de partage rapide et efficace à partir des méthodes classiques faisant appel à un système de solvant biphasique. Ainsi, le MTBE a été essentiel pour assurer la bonne solubilité et le partage des dérivés d'acides ellagique et phénoliques, tandis qu'une phase hautement polaire à base d'eau et d'acétonitrile (CH₃CN) a été utilisée pour piéger les tanins, représentant 80% (m/m) de l'extrait total (Hamzaoui et al., 2013b). Néanmoins, le fractionnement des composés les moins polaires, dont les triterpènes et les dérivés non-glycosylés de l'acide ellagique, n'était pas sélectif. Ce problème a pu être résolu en ajoutant un solvant apolaire, le *n*-heptane, au système de solvant (Hamzaoui et al., 2013b).

A l'issue de ce fractionnement, sept fractions ont été obtenues. Les composés les plus apolaires ont été élués par la phase mobile riche en *n*-heptane, tandis que les composés moyennement polaires ont été élués par la phase mobile riche en MTBE (Hubert et al., 2014). Les tanins, hydrosolubles, ont tout d'abord été entièrement retenus dans la phase stationnaire aqueuse avant d'être récupérés dans la dernière fraction. La caractérisation chimique de ces fractions a été réalisée préalablement par RMN (**Annexe I**). Les résultats ainsi obtenus ont été précédemment décrits (Hubert et al., 2014). Cette caractérisation par RMN a permis d'identifier

les espèces chimiques se trouvant dans l'écorce d'*A. leiocarpus* et présentées dans le **Tableau VII**. Cette approche de déréglication est illustrée dans la **Figure 56** (Hubert et al., 2014).

Tableau VII. Composition des différentes fractions isolées par CPC à partir de l'extrait brut éthanol 99% de poudre d'écorce d'*A. leiocarpus*. EBST : Extrait Brut Sans Tanin, Ser : Séricoside, AE : Acide Ellagique, DEM : Dérivés Ellagiques Méthylés, TrachE : Trachélospérogénine E, T+F : Trachélospérogénine E + Flavonoïdes, Tan : Tanins.

Fractions d' <i>A. leiocarpus</i>		Composés chimiques majoritaires identifiés	Structure des composés majoritaires	Groupements R
Fraction	Abréviation			
F1	EBST	Extrait brut sans tanin	-	-
F2	Ser	Séricoside pur		R1 = glucose, R2 = CH ₃ , R3 = CH ₂ OH
F3	AE	Acide ellagique pur		R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = H
F4	DEM	Acide 3,3'-di- <i>O</i> -méthyllellagique		R1 = R2 = R4 = H, R3 = R5 = CH ₃
		Acide 3,4,3'-tri- <i>O</i> -méthylflavellagique		R1 = OH, R2 = R3 = R5 = CH ₃ , R4 = H
F5	TrachE	Trachélospérogénine E pure		R1 = H, R2 = R3 = CH ₂ OH
F6	T+F	Trachélospérogénine E		R1 = H, R2 = R3 = CH ₂ OH
		Flavonoïdes (dérivés de catéchine)		R1 = R2 = H, R3 = OH : catéchine R1 = R3 = OH, R2 = H : gallocatéchine R1 = R2 = OH, R3 = H : épigallocatéchine
F7	Tan	Tanins	-	-

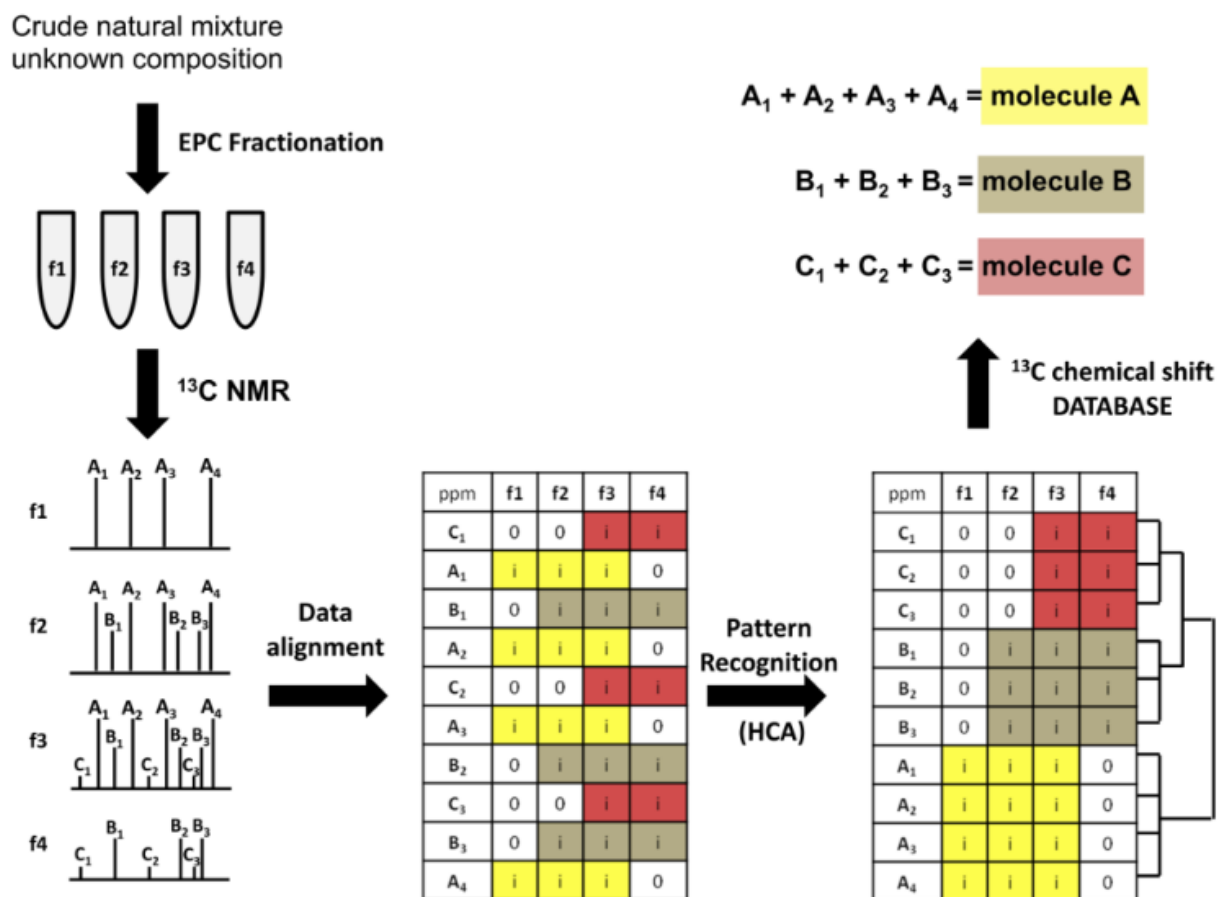


Figure 56. Méthodologie globale appliquée pour la stratégie de déréplication (Hubert et al., 2014).

b. Fractions CPC d'*A. leiocarpus*

D'autres fractions ont été obtenues à partir de la poudre d'écorce d'*A. leiocarpus* par CPC. Le fractionnement bio-guidé a permis l'obtention de dix fractions de polarités croissantes, dont les compositions respectives sont détaillées dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII. Composition des fractions CPC obtenues à partir de l'extrait brut éthanol 99% de poudre d'écorce d'*A. leiocarpus*.

Fractions "polarisées" d' <i>A. leiocarpus</i>	Composés chimiques majoritaires identifiés	Structure des composés majoritaires	Groupements R
F1	Composés hydrophobes	-	-
	Acide séricique		R = CH ₃
F2	Séricosides		R1 = glucose, R2 = CH ₃ , R3 = CH ₂ OH
	Acide séricique		R = CH ₃
F3	Trachélospérogénine E		R1 = H, R2 = R3 = CH ₂ OH
	Acide séricique		R = CH ₃
F4	Acide ellagique		R1 = R2 = R3 = R4 = R5 = H
	Acide gallique		R = OH
	Acide protocatéchique		R = H
F5	Flavonoïdes (dérivés de catéchine)		R1 = R2 = H, R3 = OH : catéchine R1 = R3 = OH, R2 = H : gallocatéchine R1 = R2 = OH, R3 = H : épigallocatéchine
F6	Acide 3,3'-di- <i>O</i> -méthylellagique 4- <i>O</i> -xylopyranoside		-
F7	Acide 3,3'-di- <i>O</i> -méthylellagique		R1 = R2 = R4 = H, R3 = R5 = CH ₃
	Acide 3,4,3'-tri- <i>O</i> -méthylflavellagique		R1 = OH, R2 = R3 = R5 = CH ₃ , R4 = H
	Acide 3,3'-di- <i>O</i> -méthylellagique 4- <i>O</i> -xylopyranoside		-
F8	Autres composés moins apolaires	-	-
F9			
F10			

2) Solubilité des fractions

La solubilité dans le DMSO des différentes fractions obtenues ainsi que celle des composés majoritaires a été déterminée expérimentalement afin d'évaluer les gammes de concentrations possibles pour les expérimentations suivantes. Le **Tableau IX** regroupe les résultats obtenus en comparaison avec les données disponibles dans la littérature et les fiches techniques des produits.

Tableau IX. Concentrations maximales de l'extrait brut d'*A. leiocarpus* et des différentes fractions dans le DMSO, en comparaison avec les données présentes dans la littérature et dans les fiches techniques des composés purs commercialisés. EB99 : Extrait Brut éthanol 99%, EBST : Extrait Brut Sans Tanin, Ser : Séricoside, AE : Acide Ellagique, DEM : Dérivés Ellagiques Méthylés, TrachE : Trachélospérogénine E, T+F : Trachélospérogénine E + Flavonoïdes, Tan : Tanins.

Fractions d' <i>A. leiocarpus</i>		Concentration dans le DMSO (mg/mL)	Concentration théorique dans le DMSO (mg/mL)	Référence
Fraction	Abréviation			
F0	EB99	20,50	-	-
F1	EBST	25,00	-	-
F2	Ser	3,00	Non précisée	Adipogen
F3	AE	2,00	3,00	Selleckchem
F4	DEM	0,82	-	-
F5	TrachE	20,33	-	-
F6	T+F	11,80	≈ 25,00 (épigallocatechine)	CaymanChem
F7	Tan	2,20	-	-

La solubilité des fractions n'a pas été déterminée préalablement aux expérimentations *in vitro*.

3) Evaluation de la cytotoxicité sur cellules Vero

a. Premières fractions obtenues

Dans un premier temps, la cytotoxicité des premiers extraits et fractions F0 à F7 a été évaluée sur cellules Vero par utilisation d'un réactif à base de résazurine après 72 heures d'incubation. Les résultats sont présentés dans la **Figure 57**.

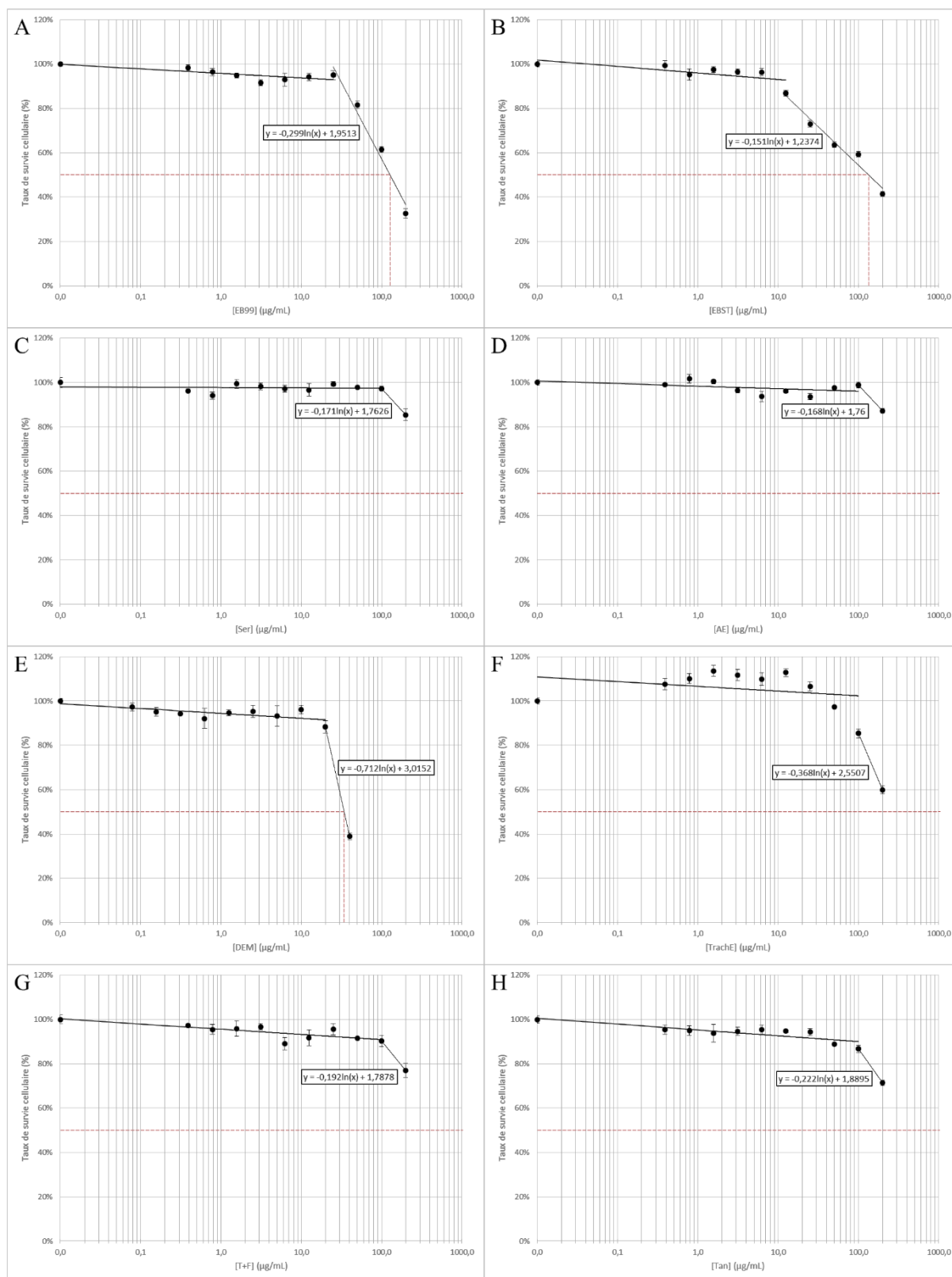


Figure 57. Cytotoxicité des fractions obtenues par CPC sur cellules Vero après 72 heures d'incubation. Les concentrations ainsi testées vont de 0 à 200 µg/mL pour l'EB99 (A), l'EBST (B), les fractions Ser (C), AE (D), TrachE (F), T+F (G) et Tan (H), et de 0 à 80 µg/mL pour la fraction DEM (E).

Ainsi, l'extrait brut éthanol 99% (**Figure 57A**), l'extrait brut sans tanin (**Figure 57B**) et le

mélange de dérivés ellagiques méthylés (**Figure 57E**) sont les seuls extraits et fractions ayant présenté une cytotoxicité provoquant 50% de mortalité cellulaire. En effet, leurs CC_{50} moyennes respectives sont de 137,62 $\mu\text{g/mL}$, 123,31 $\mu\text{g/mL}$ et 38,57 $\mu\text{g/mL}$. De même, bien que la CC_{50} n'ait pas été atteinte dans le cas de la trachélospérogénine E pure (**Figure 57F**), l'extrapolation de cette valeur d'après la courbe de tendance indique qu'elle est de 259,48 $\mu\text{g/mL}$ en moyenne. A l'inverse, les fractions contenant le séricoside pur (**Figure 57C**), l'acide ellagique pur (**Figure 57D**), le mélange de trachélospérogénine E et de flavonoïdes (**Figure 57G**) et les tanins (**Figure 57H**) n'ont présenté quasiment aucune cytotoxicité aux concentrations testées. Ces résultats ont été validés microscopiquement. Les valeurs de CC_{50} ont été utilisées par la suite pour le calcul des indices de sélectivité (IS).

b. Fractions CPC

La première étape de l'évaluation de l'effet antiparasitaire de ces fractions a consisté à déterminer leur cytotoxicité par screening sur cellules Vero. Deux premiers screenings à 100 $\mu\text{g/mL}$ puis à 50 $\mu\text{g/mL}$ ont été réalisés. Cependant, il s'est avéré que certaines fractions étaient fortement cytotoxiques pour les cellules Vero à ces concentrations (résultats non montrés). Un troisième screening a donc été réalisé à une concentration de 25 $\mu\text{g/mL}$ pendant 72 heures (**Figure 58**), afin de limiter ce phénomène.

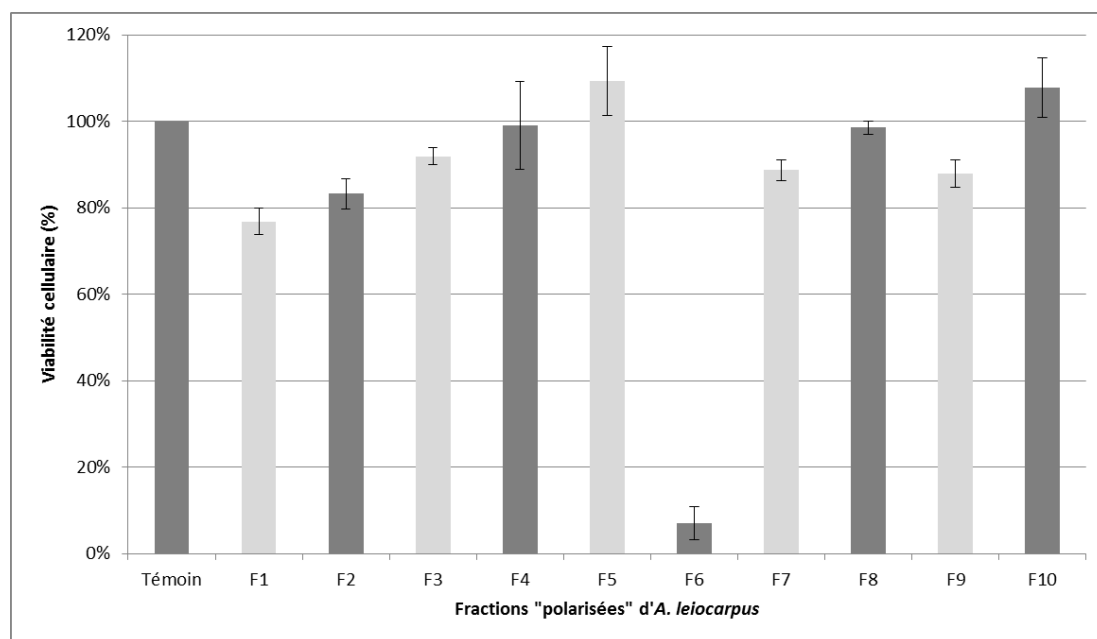


Figure 58. Cytotoxicité des fractions CPC d'*A. leiocarpus* déterminée par screening sur cellules Vero après 72 heures d'incubation. Les fractions ont été testées à une concentration de 25 $\mu\text{g/mL}$.

Seule la fraction F6 a montré une cytotoxicité importante sur les cellules Vero, de l'ordre de 7% de viabilité cellulaire à 25 µg/mL. Les autres fractions n'ont pas eu d'effet cytotoxique significatif sur ce modèle cellulaire. Par conséquent, la fraction CPC F6 d'*A. leiocarpus* ne sera pas retenue pour la suite de l'étude.

Dans un second temps, et faisant suite au screening réalisé sur *T. gondii* et *N. caninum*, les CC₅₀ respectives des fractions F1 à F5 (**Figure 59**) et de la fraction F7 (données non montrées) ont été évaluées sur cellules Vero. Les concentrations qui ont été testées vont de 0 µg/mL à 100 µg/mL.

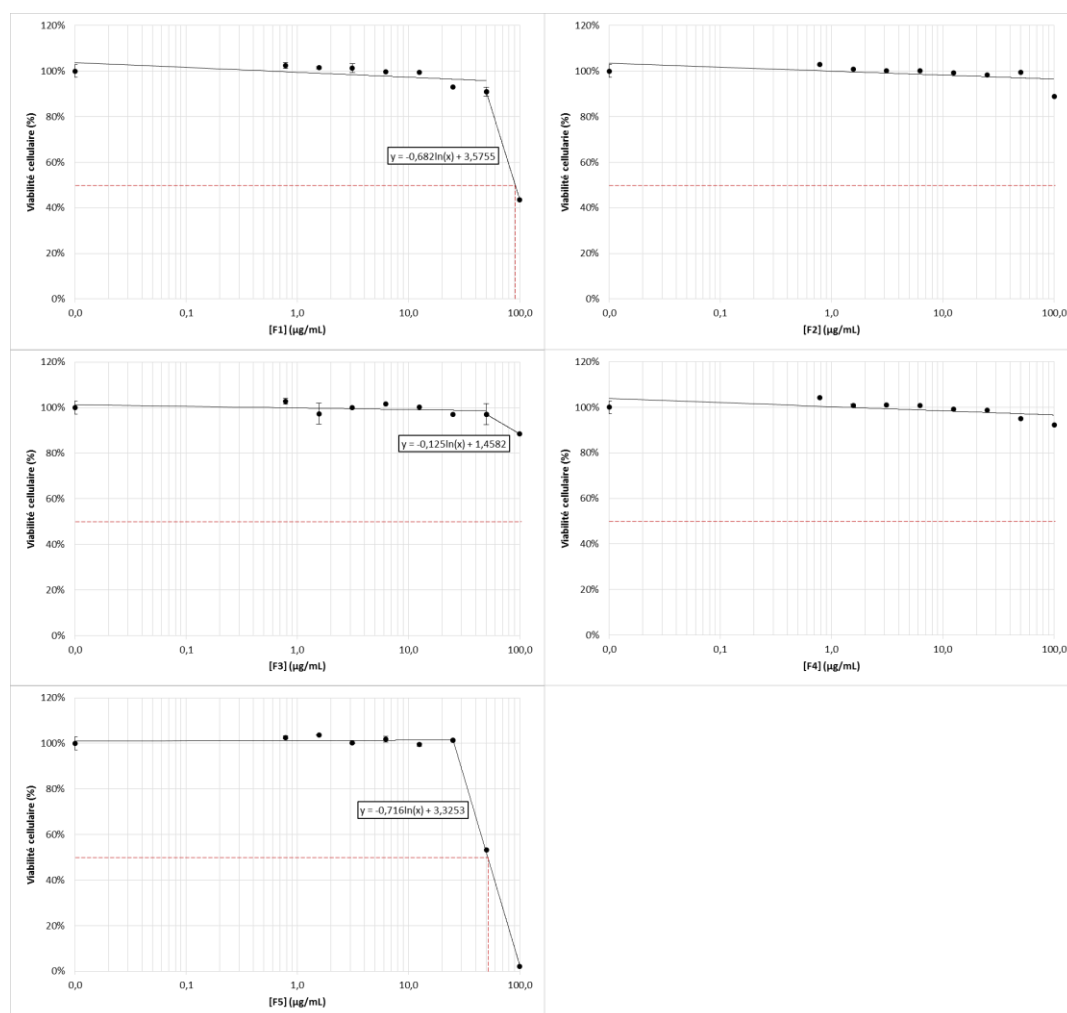


Figure 59. Cytotoxicité des cinq fractions CPC d'*A. leiocarpus* sur cellules Vero après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 100 µg/mL.

Ainsi, seules les fractions F1 et F5 se sont montrées cytotoxiques aux concentrations testées. Leurs CC₅₀ respectives sont de 90,88 µg/mL et 51,72 µg/mL. A l'inverse, les fractions F2, F3, F4 et F7 n'ont induit aucune cytotoxicité vis-à-vis des cellules Vero. Ces valeurs ont été utilisées lors des calculs des indices de sélectivité.

II) Chimiosensibilité *in vitro* de *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum*

1) *Toxoplasma gondii*

La chimiosensibilité de *T. gondii* a été évaluée vis-à-vis des extraits et fractions initialement obtenus (**Tableau IX**), après 72 heures d'incubation (**Figure 60**).

Parmi les huit extraits et fractions testés, l'EB99 (**Figure 60A**), l'EBST (**Figure 60B**), AE (**Figure 60D**), DEM (**Figure 60E**) et TrachE (**Figure 60F**) ont montré une activité anti-*T. gondii* significative à 72 heures. Les CI_{50} moyennes ainsi déterminées sont, respectivement, de 59,30 $\mu\text{g/mL}$, 12,83 $\mu\text{g/mL}$, 74,06 $\mu\text{g/mL}$, 13,78 $\mu\text{g/mL}$ et 26,63 $\mu\text{g/mL}$. Dans le cas de la fraction TrachE, aucun tachyzoïte n'a été détecté à partir de 100 $\mu\text{g/mL}$. A l'inverse, les fractions Ser (**Figure 60C**), T+F (**Figure 60G**) et Tan (**Figure 60H**) n'ont montré aucune activité anti-toxoplasmique significative. Les valeurs de CI_{50} ont été utilisées pour calculer les indices de sélectivité.

Ces résultats ont été confirmés microscopiquement après fixation au méthanol froid et coloration des cultures à l'éosine et au bleu de méthylène (**Figure 61**).

Par rapport au témoin sans traitement (**Figure 61A**), l'extrait EB99 a induit une diminution drastique de la croissance parasitaire à 100 $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 61B**). L'extrait EBST a montré une activité antiparasitaire plus importante puisqu'aucun tachyzoïte n'a pu être observé dans la totalité des puits (**Figure 61C**). Il en va de même pour la fraction TrachE (**Figure 61G**). A l'inverse, les fractions Ser (**Figure 61D**), T+F (**Figure 61H**) et Tan (**Figure 61I**) n'ont montré aucune activité puisque de nombreux tachyzoïtes étaient encore présents dans les puits. Les fractions AE (**Figure 61E**) et DEM (**Figure 61F**), quant à elles, ont montré une activité antiparasitaire modérée. Toutes ces observations microscopiques sont en corrélation avec les résultats précédemment obtenus par la technique ELISA et décrits dans la **Figure 60**.

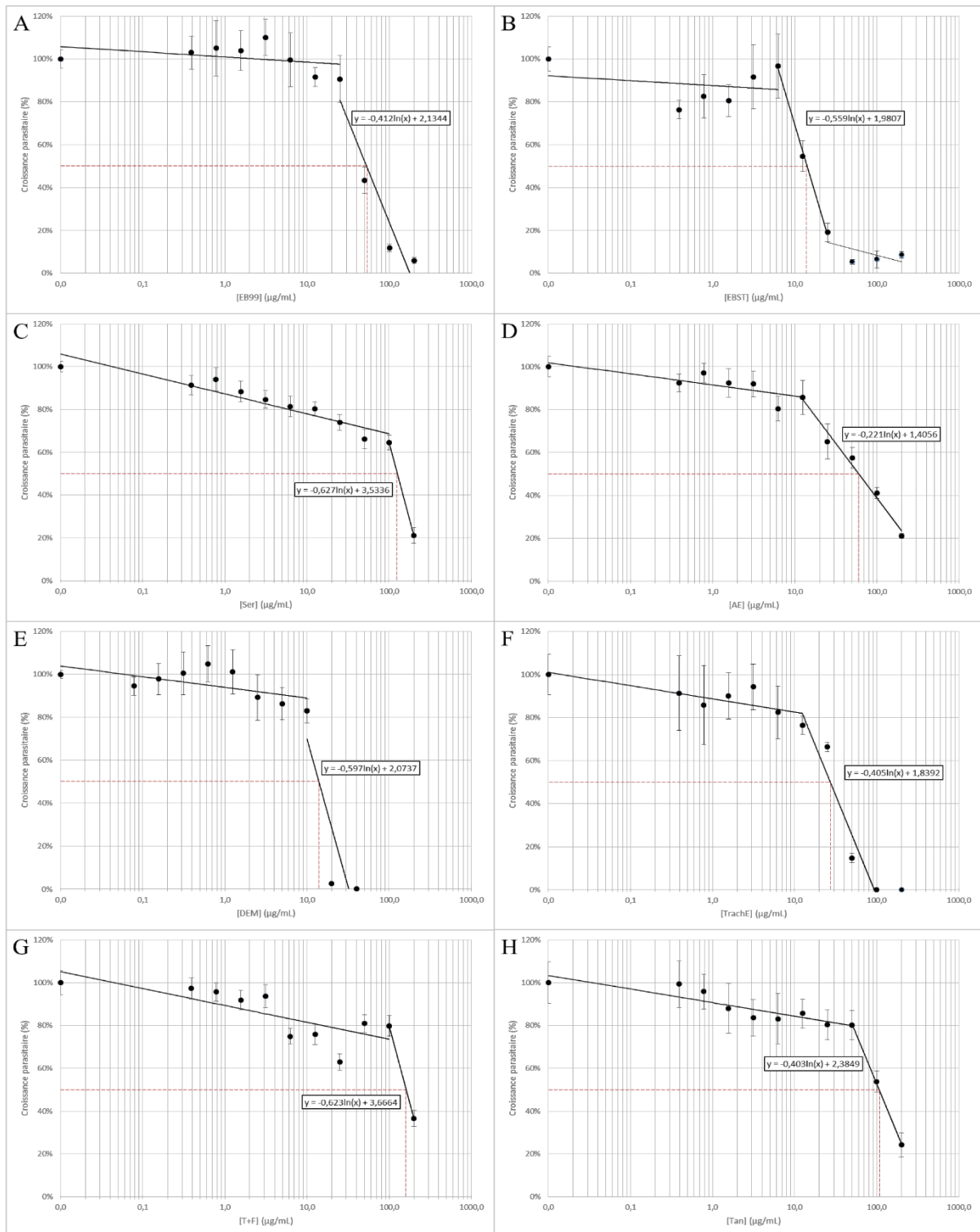


Figure 60. Chemosensibilité de *T. gondii* aux fractions obtenues par CPC après 72 heures d'incubation. Les concentrations ainsi testées vont de 0 à 200 µg/mL pour l'EB99 (A), l'EBST (B), les fractions Ser (C), AE (D), TrachE (F), T+F (G) et Tan (H), et de 0 à 80 µg/mL pour la fraction DEM (E).

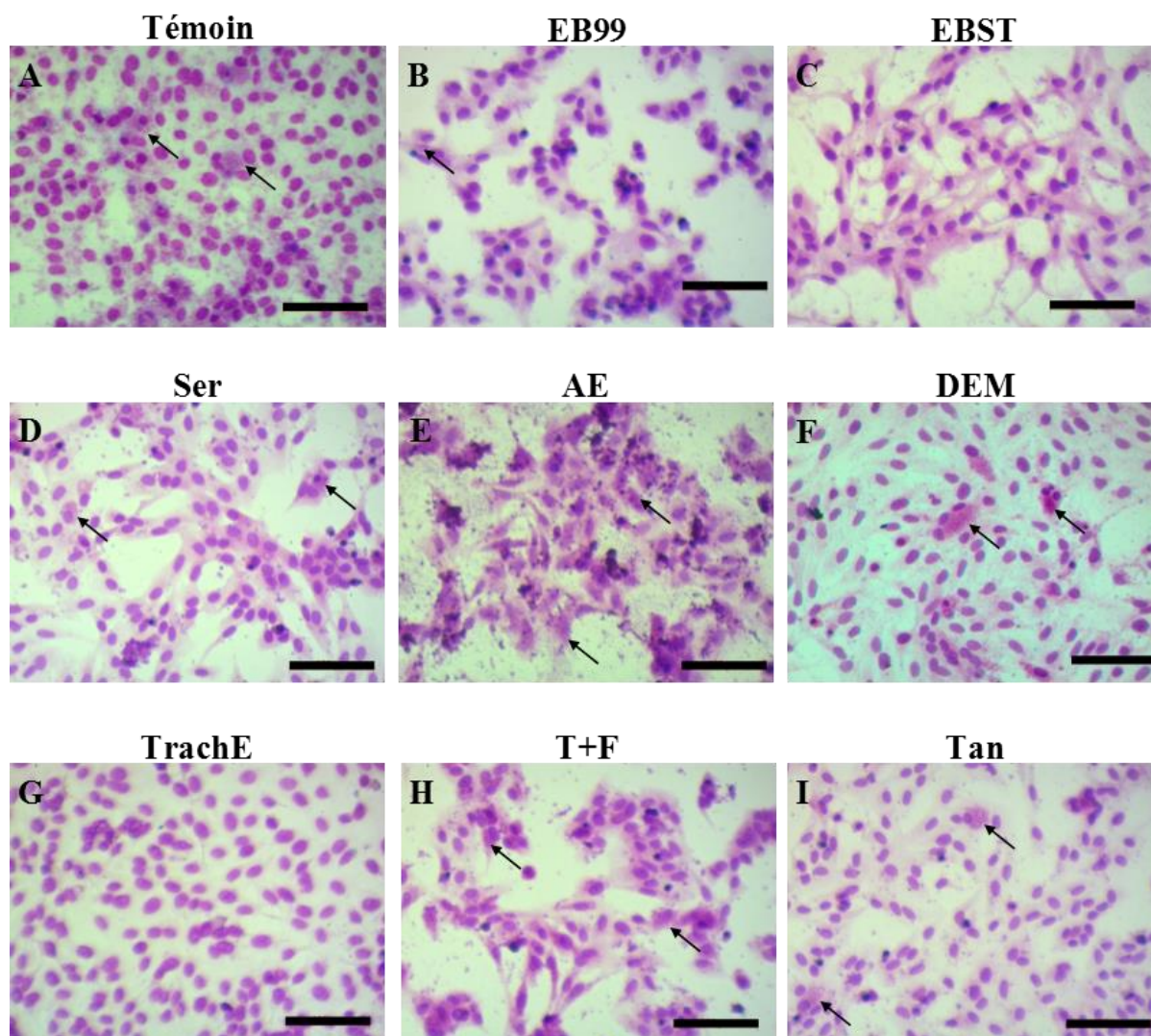


Figure 61. Observations au microscope optique de la croissance des tachyzoïtes de *T. gondii* (souche RH) en présence des extraits et fractions d'*A. leiocarpus* pendant 72 heures. Les tachyzoïtes ont été cultivés sur cellules Vero sans traitement (A) ou à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ d'extraits EB99 (B) et EBST (C) ou de fractions Ser (D), AE (E), TrachE (G), T+F (H) et Tan (I), sauf pour la fraction DEM (F) dont la concentration était de 10 $\mu\text{g/mL}$. Les tachyzoïtes sont indiqués par des flèches. Les barres représentent 100 μm (G : X 40).

Pour chaque extrait ou fraction d'*A. leiocarpus* testé sur *T. gondii*, un indice de sélectivité (IS) a été calculé (**Tableau X**) afin de déterminer la spécificité de l'activité vis-à-vis du parasite.

Les IS de l'extrait EB99 (2,32) ainsi que des fractions AE (> 2,70) et DEM (2,80) sont supérieurs à 2, démontrant un effet antiparasitaire peu sélectif des composés testés. Dans le cas des fractions Ser, T+F et Tan, les IS sont inférieurs à 2 : l'effet antiparasitaire n'est donc pas sélectif. De façon intéressante, EBST et TrachE ont montré des IS supérieurs à 4 (9,61 et 9,75, respectivement). Par conséquent, ils ont été sélectionnés pour déterminer leur action sur les

phases de multiplication et d'invasion du parasite, et également pour l'évaluation de leur potentiel antiparasitaire *in vivo*.

Tableau X. Tableau récapitulatif des valeurs de CC₅₀, CI₅₀ et des indices de sélectivité des différents extraits et fractions obtenus à partir de l'écorce d'*A. leiocarpus* et testés sur *T. gondii*. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. La valeur soulignée est extrapolée à partir de la courbe de tendance car la CC₅₀ n'était pas atteinte. Les données pour la pyriméthamine, composé de référence, sont indiquées en gras.

Fractions testées d' <i>A. leiocarpus</i>	CC ₅₀ cellules Vero (µg/mL)	CI ₅₀ <i>T. gondii</i> (µg/mL)	Indice de sélectivité
EB99	137,62 \pm 13,28	59,30 \pm 9,16	2,32
EBST	123,31 \pm 12,40	12,83 \pm 1,85	9,61
Ser	> 200	134,68 \pm 11,92	> 1,48
AE	> 200	74,06 \pm 19,60	> 2,70
DEM	38,57 \pm 8,47	13,78 \pm 3,52	2,80
TrachE	<u>259,48 \pm 5,13</u>	26,63 \pm 0,94	9,75
T+F	> 200	152,56 \pm 12,20	> 1,31
Tan	> 200	109,12 \pm 2,35	> 1,83
Pyr	2,61 \pm 0,33	0,29 \pm 0,19	9,00

Dans un second temps, l'activité antiparasitaire des fractions CPC a été évaluée par screening sur des tachyzoïtes de *T. gondii* (souche RH) pendant 72 heures à 25 µg/mL. Les résultats sont présentés dans la **Figure 62**.

Les fractions F1, F2, F4 et F5 ont présenté une activité anti-*T. gondii* telle que la croissance parasitaire a atteint le seuil 50% d'inhibition par rapport au témoin non traité. La fraction F3 s'est située à la limite de ce seuil. Par conséquent, ces cinq fractions ont été retenues pour la suite de l'étude.

A l'inverse, les fractions F7 à F10 n'ont pas eu d'effet antiparasitaire significatif. Dans le cas de la fraction F6, l'inhibition de la croissance parasitaire est due à la forte cytotoxicité induite par cette fraction à 25 µg/mL (**Figure 58**). Ces cinq fractions n'ont donc pas été retenues pour la suite de l'étude.

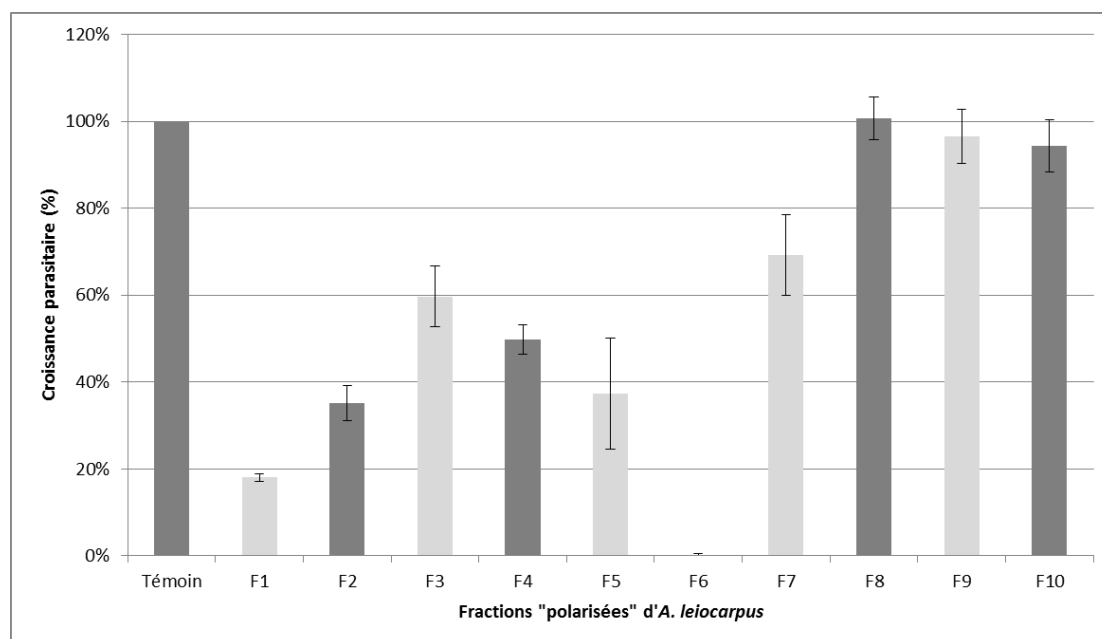


Figure 62. Chimiosensibilité des fractions CPC d'*A. leiocarpus* déterminée par screening sur des tachyzoïtes de *T. gondii* après 72 heures d'incubation. Les fractions ont été testées à une concentration de 25 µg/mL.

Suite à ces résultats, la CI_{50} de chaque fraction a été évaluée sur *T. gondii* après 72 heures d'incubation à de concentrations comprises entre 0 et 25 µg/mL (**Figure 63**).

En dehors de la fraction F5, les fractions identifiées comme étant actives lors du screening préalable sont donc bel et bien actives sur *T. gondii*. Les CI_{50} respectives des fractions F1 à F4 sont égales à $5,96 \pm 0,97$ µg/mL, $11,24 \pm 0,03$ µg/mL, $15,03 \pm 0,04$ µg/mL et $23,34 \pm 0,62$ µg/mL. Ces valeurs seront utilisées par la suite pour le calcul des indices de sélectivités.

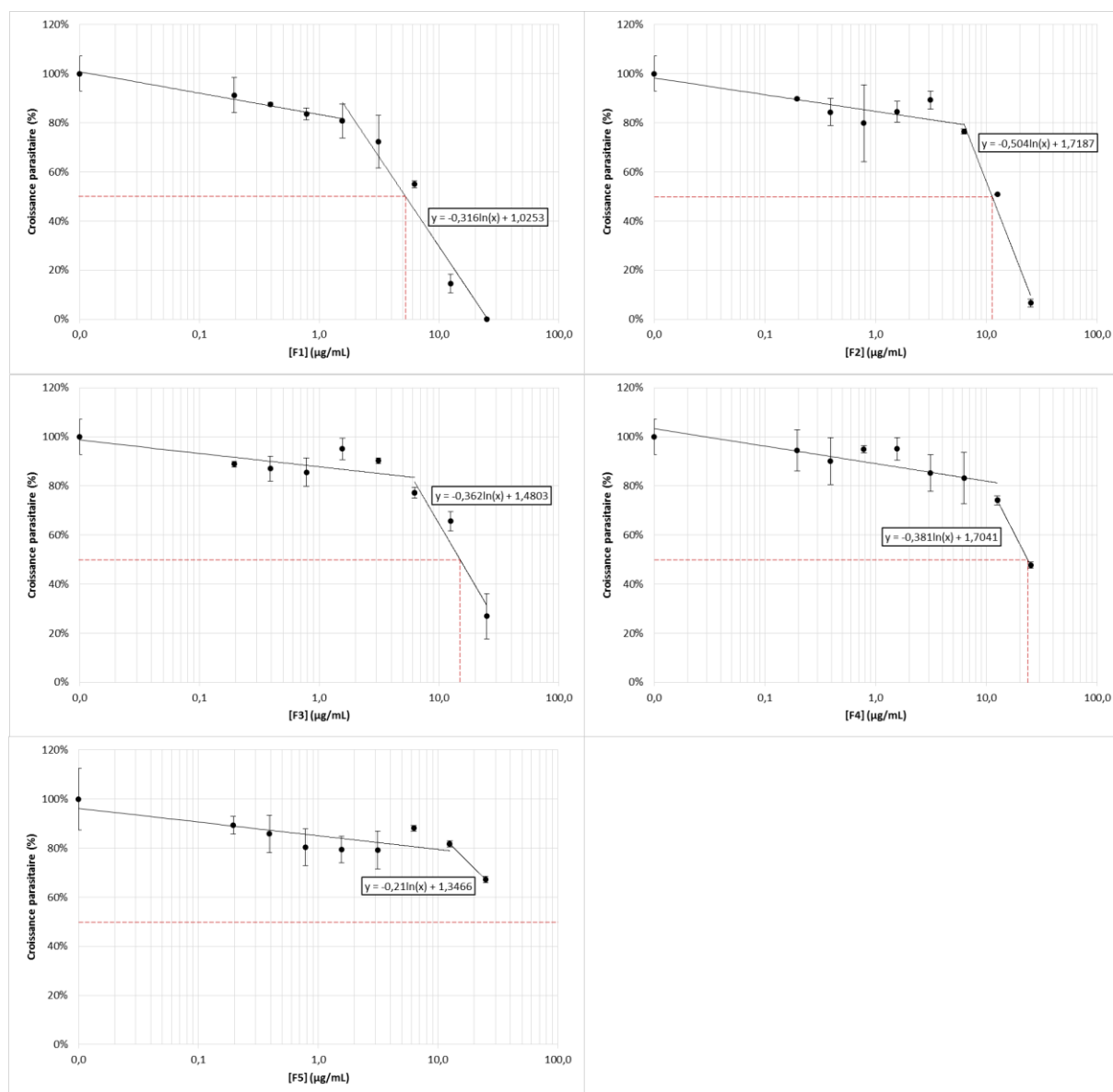


Figure 63. Chemosensibilité des fractions CPC d'*A. leiocarpus* actives sur des tachyzoïtes de *T. gondii* après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 25 µg/mL.

Les IS des fractions F1 à F5 ont ensuite été calculés pour déterminer la sélectivité de leur effet sur les tachyzoïtes de *T. gondii* (**Tableau XI**).

L'IS de la fraction F1 est supérieur à 10, témoignant d'une grande sélectivité de l'effet antiparasitaire vis-à-vis de *T. gondii*. De même, les fractions F2, F3 et F4 ont, quant à elles, des IS respectifs supérieurs à 4. Leur effet anti-*T. gondii* est donc également sélectif. A l'inverse, la fraction F5 n'a aucun effet antiparasitaire sélectif. Celui-ci est donc essentiellement dû à la cytotoxicité induite par cette fraction sur les cellules Vero.

Tableau XI. Tableau récapitulatif des valeurs de CC_{50} , CI_{50} et des indices de sélectivité des fractions CPC F1 à F5 obtenues à partir de l'écorce d'*A. leiocarpus* et testées sur *T. gondii*. NC : Non Calculable.

Fractions testées d' <i>A. leiocarpus</i>	CC_{50} cellules Vero ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} <i>T. gondii</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Indice de sélectivité
F1	90,88	$5,96 \pm 0,97$	15,25
F2	> 100	$11,24 \pm 0,03$	> 8,90
F3	> 100	$15,03 \pm 0,04$	> 6,65
F4	> 100	$23,34 \pm 0,62$	> 4,28
F5	51,72	> 25	NC
Pyr	$2,61 \pm 0,33$	$0,29 \pm 0,19$	9,00

2) *Neospora caninum*

La chimiosensibilité de *N. caninum* a été évaluée vis-à-vis de ces mêmes extraits et fractions après 72 heures d'incubation (**Figure 64**). La fraction DEM n'a pas été testée sur ce parasite.

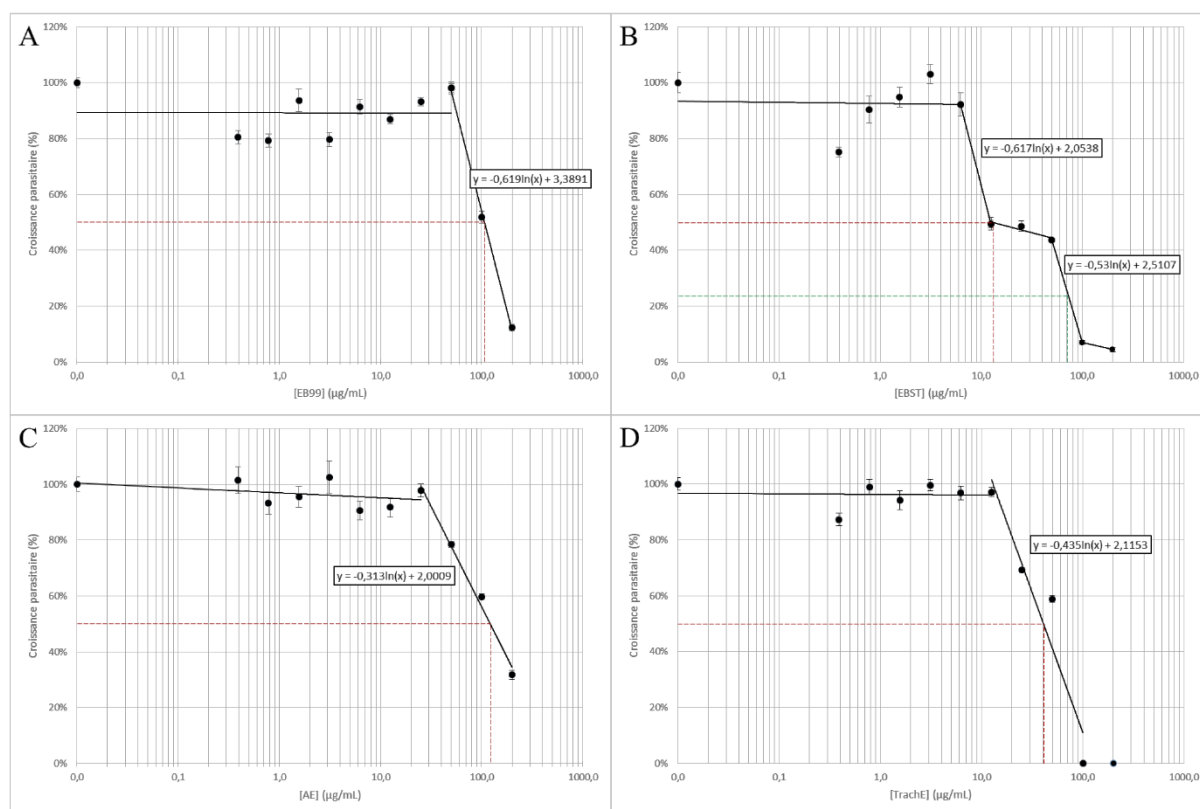


Figure 64. Chimiosensibilité de *N. caninum* aux fractions obtenues par CPC après 72 heures d'incubation. Les concentrations ainsi testées vont de 0 à 200 $\mu\text{g/mL}$ pour l'EB99 (A), l'EBST (B), les fractions AE (C) et TrachE (D).

Parmi les sept extraits et fractions testées sur *N. caninum* au stade tachyzoïte, les extraits EB99 (**Figure 64A**) et EBST (**Figure 64B**) ainsi que les fractions AE (**Figure 64C**) et TrachE (**Figure 64D**) ont montré une activité antiparasitaire. Leurs CI_{50} respectives sont de $91,23 \pm 21,49 \mu\text{g/mL}$, $11,96 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$, $116,66 \pm 6,04 \mu\text{g/mL}$ et $44,21 \pm 4,55 \mu\text{g/mL}$. Les fractions Ser, T+F et Tan n'ont présenté aucun effet anti-*N. caninum* (données non montrées). Ces résultats ont été confirmés microscopiquement (**Figure 65**).

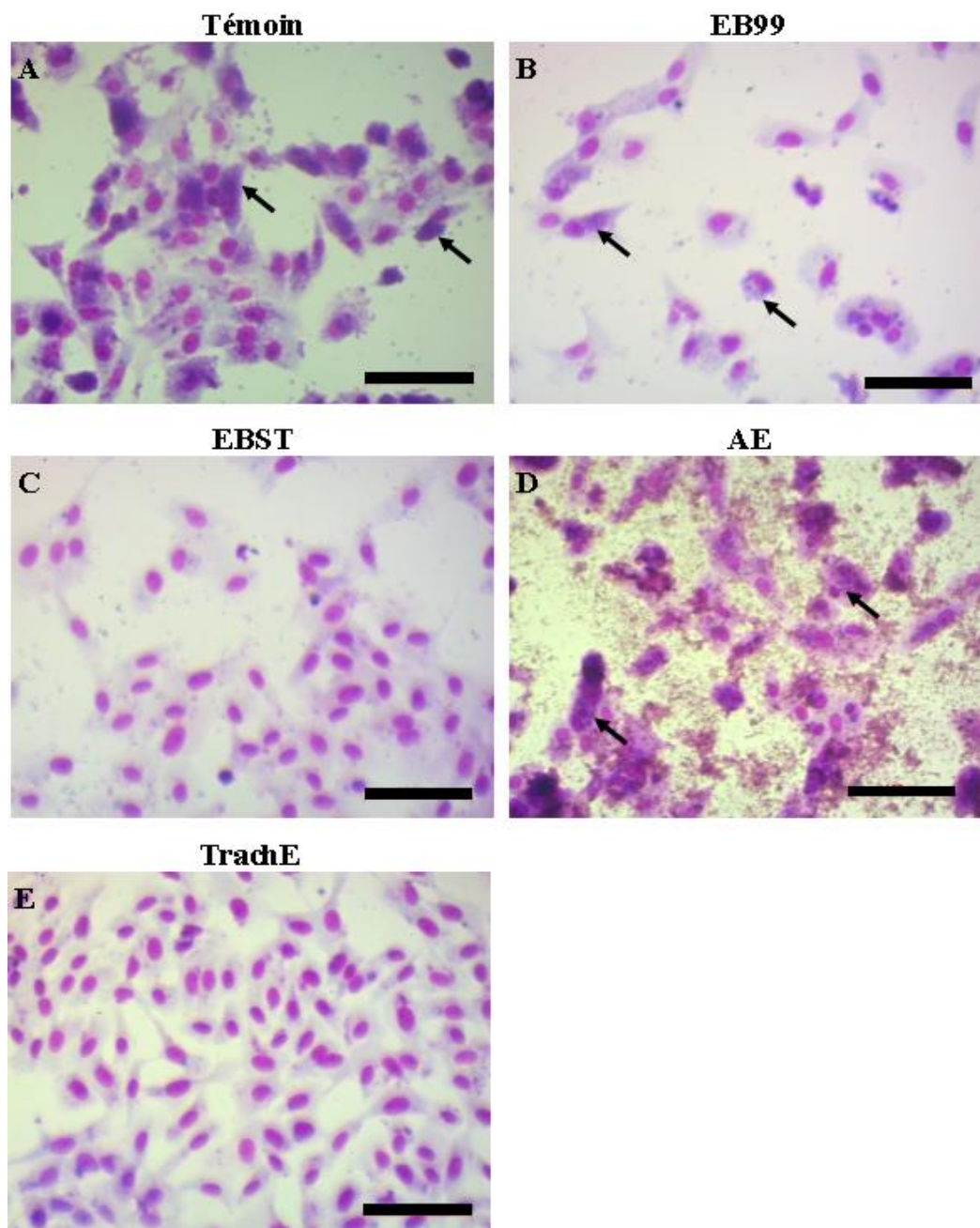


Figure 65. Observations au microscope optique de la croissance des tachyzoïtes de *N. caninum* (souche NC1) en présence des extraits et fractions d'*A. leiocarpus* pendant 72 heures. Les tachyzoïtes ont été cultivés sur cellules Vero sans traitement (A) ou à une concentration de $100 \mu\text{g/mL}$ d'extraits EB99 (B) et EBST (C) ou de fractions AE (D) et TrachE (E). Les tachyzoïtes sont indiqués par des flèches. Les barres représentent $100 \mu\text{m}$ (G : X 40).

Comparativement au témoin non traité (**Figure 65A**), l'extrait EB99 (**Figure 65B**) et la fraction AE (**Figure 65D**) ont montré une activité anti-*N. caninum*. Cependant, le nombre de cellules Vero après traitement à l'EB99 a significativement diminué et un précipité est apparu dans le cas de la fraction AE sous forme d'agrégats bruns, gênant l'observation des tachyzoïtes. Après traitement à l'EBST (**Figure 65C**) et TrachE (**Figure 65E**), aucun tachyzoïte n'a été observé au microscope optique, confirmant l'efficacité antiparasitaire précédemment mise en évidence chez *T. gondii*. Toutes ces observations microscopiques sont en corrélation avec les résultats obtenus par la technique ELISA et présentés dans la **Figure 64**.

Pour chaque extrait ou fraction d'*A. leiocarpus* testé sur *N. caninum*, un indice de sélectivité (IS) a été calculé (**Tableau XII**) afin de déterminer la spécificité de l'activité vis-à-vis du parasite.

Tableau XII. Tableau récapitulatif des valeurs de CC₅₀, CI₅₀ et des indices de sélectivité des différents extraits et fractions obtenus à partir de l'écorce d'*A. leiocarpus* et testés sur *N. caninum*. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. La valeur soulignée est extrapolée à partir de la courbe de tendance car la CC₅₀ n'était pas atteinte. Les données pour la pyriméthamine, composé de référence, sont indiquées en gras. NC : Non Calculable, ND : Non Déterminé.

Fractions testées d' <i>A. leiocarpus</i>	CC ₅₀ cellules Vero (µg/mL)	CI ₅₀ <i>N. caninum</i> (µg/mL)	Indice de sélectivité
EB99	137,62 \pm 13,28	91,23 \pm 21,49	1,51
EBST	123,31 \pm 12,40	11,96 \pm 0,64	10,31
Ser	> 200	> 200	NC
AE	> 200	116,66	> 1,71
DEM	38,57 \pm 8,47	ND	ND
TrachE	<u>259,48 \pm 5,13</u>	44,21 \pm 4,55	5,87
T+F	> 200	> 200	NC
Tan	> 200	> 200	NC

Les IS respectifs de l'extrait EBST (10,31) et de la fraction TrachE (5,87) sont supérieurs à 4, démontrant un effet antiparasitaire sélectif des composés testés contre *N. caninum*. Dans le cas de l'extrait EB99 et des fractions Ser, AE, T+F et Tan, les IS sont inférieurs à 2 : l'effet antiparasitaire n'est donc pas sélectif.

De la même façon que pour *T. gondii*, l'effet antiparasitaire des fractions CPC contre *N. caninum* a été évalué dans un premier temps par screening. Ces dernières ont été testées à une concentration de 25 µg/mL pendant 72 heures. Les résultats sont présentés dans la **Figure 66**.

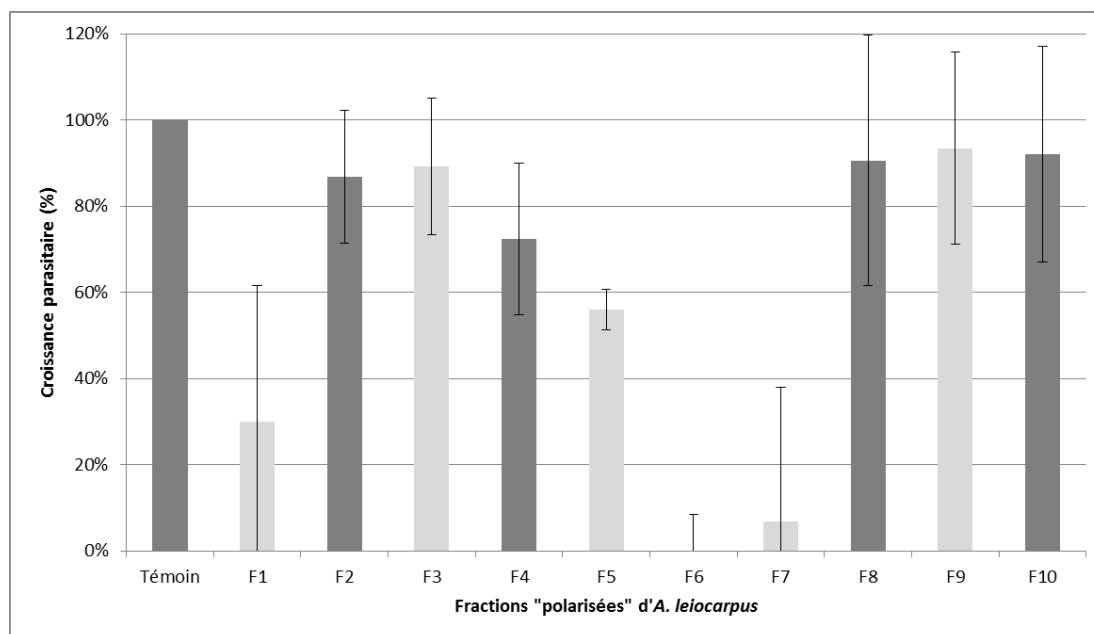


Figure 66. Chimiosensibilité des fractions CPC d'*A. leiocarpus* déterminée par screening sur des tachyzoïtes de *N. caninum* après 72 heures d'incubation. Les fractions ont été testées à une concentration de 25 µg/mL.

Sur les dix fractions ainsi testées, seule la fraction F7 a présenté un effet significatif vis-à-vis de *N. caninum*. L'effet observé induit par la fraction F6 (**Figure 66**) est dû à la cytotoxicité importante sur les cellules Vero (**Figure 58**). La fraction F7 est donc la seule fraction testée dans la suite de l'étude.

La chimiosensibilité de *N. caninum* à la fraction F7 a ensuite été évaluée après 72 heures d'incubation à des concentrations allant de 0 à 25 µg/mL afin d'en déterminer la CI_{50} (**Figure 67**).

La fraction F7 a donc une faible activité antiparasitaire vis-à-vis de *N. caninum*. La CI_{50} théorique, car non atteinte en condition expérimentale, est de l'ordre de 82,91 µg/mL d'après la courbe de tendance.

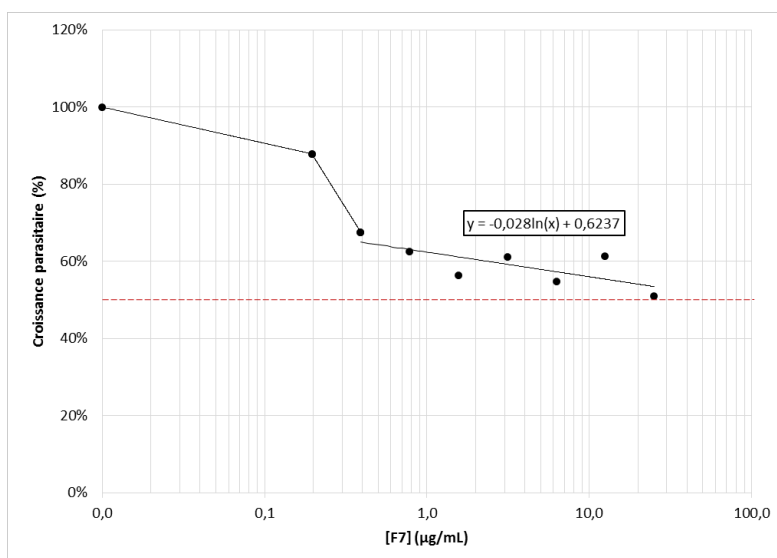


Figure 67. Chimiosensibilité de la fraction CPC F7 d'*A. leiocarpus* sur des tachyzoïtes de *N. caninum* après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 25 µg/mL.

Par la suite, l'indice de sélectivité de la fraction F7 a été calculé afin de déterminer si l'effet antiparasitaire observé était sélectif du parasite ou s'il était lié à une possible cytotoxicité (Tableau XIII).

Tableau XIII. Tableau récapitulatif de la valeur de CC_{50} , CI_{50} et de l'indice de sélectivité de la fraction CPC F7 obtenue à partir de l'écorce d'*A. leiocarpus* et testée sur *N. caninum*. La valeur soulignée est extrapolée à partir de la courbe de tendance car la CC_{50} n'a pas été atteinte.

Fraction "polarisée" d' <i>A. leiocarpus</i>	CC_{50} cellules Vero (µg/mL)	CI_{50} <i>N. caninum</i> (µg/mL)	Indice de sélectivité
F7	> 100	<u>82,91</u>	> 1,21

L'IS ainsi calculé est inférieur à 4. Il apparaît donc que la fraction F7 n'est pas sélective. Ces résultats sont toutefois à nuancer puisque la CI_{50} obtenue n'est que théorique et que la CC_{50} n'a pas été clairement déterminée.

3) *Plasmodium falciparum*

Dans le cadre d'un transfert de technologies entre le laboratoire de Parasitologie – Mycologie de Reims (EA 3800) et l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (IPPTS), la chimiosensibilité de *P. falciparum* aux extraits et fractions provenant d'*A. leiocarpus* a été évaluée après 72 heures d'incubation. Néanmoins, une succession de problèmes techniques nous a empêché de poursuivre cette étude à Reims par la suite. De ce fait,

seuls les extraits EB99 et EBST ont été testés sur ce parasite. Les résultats obtenus (**Figure 68**) proviennent des expérimentations réalisées à l'IPPTS.

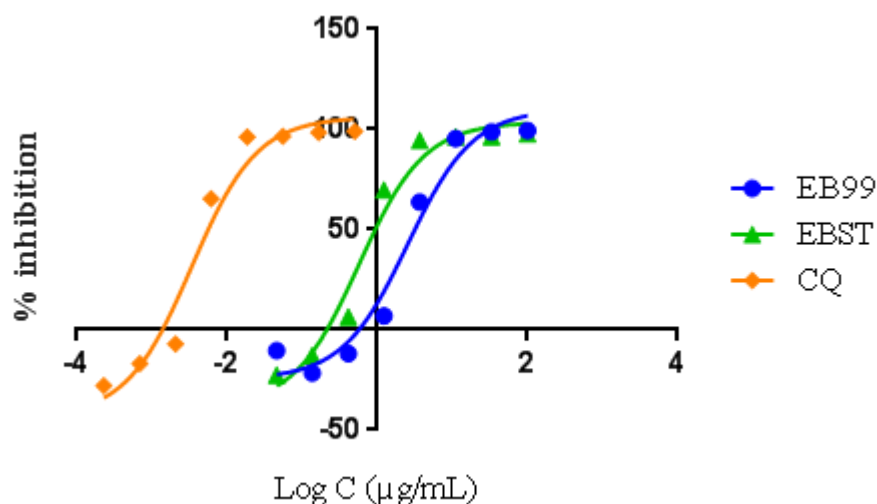


Figure 68. Chimiosensibilité de *P. falciparum* aux extraits EB99 et EBST issus de l'écorce d'*A. leiocarpus* après 72 heures d'incubation. Les concentrations ainsi testées vont de 0 à 100 µg/mL pour l'EB99 et l'EBST.

Les extraits EB99 et EBST issus d'*A. leiocarpus* ont montré une activité anti-*P. falciparum* significative. Les CI_{50} respectives de ces extraits sont de $2,61 \pm 0,09$ µg/mL et de $0,78 \pm 0,30$ µg/mL. Le contrôle chloroquine (CQ) présente une CI_{50} égale à $5,50 \pm 3,5$ ng/mL.

III) Identification de l'origine de l'effet antiparasitaire de EBST et TrachE chez *T. gondii*

1) Observations en microscopie optique

Afin d'identifier les mécanismes d'actions des produits naturels les plus sélectifs vis-à-vis de *T. gondii*, EBST et TrachE, un test d'invasion a été réalisé sur des tachyzoïtes afin si les produits naturels inhibent l'invasion des cellules hôtes par le parasite ou non. Les concentrations testées ont été de 30 µg/mL et 20 µg/mL, respectivement (**Figure 69**), et de 0,60 µg/mL pour la pyriméthamine (données non montrées).

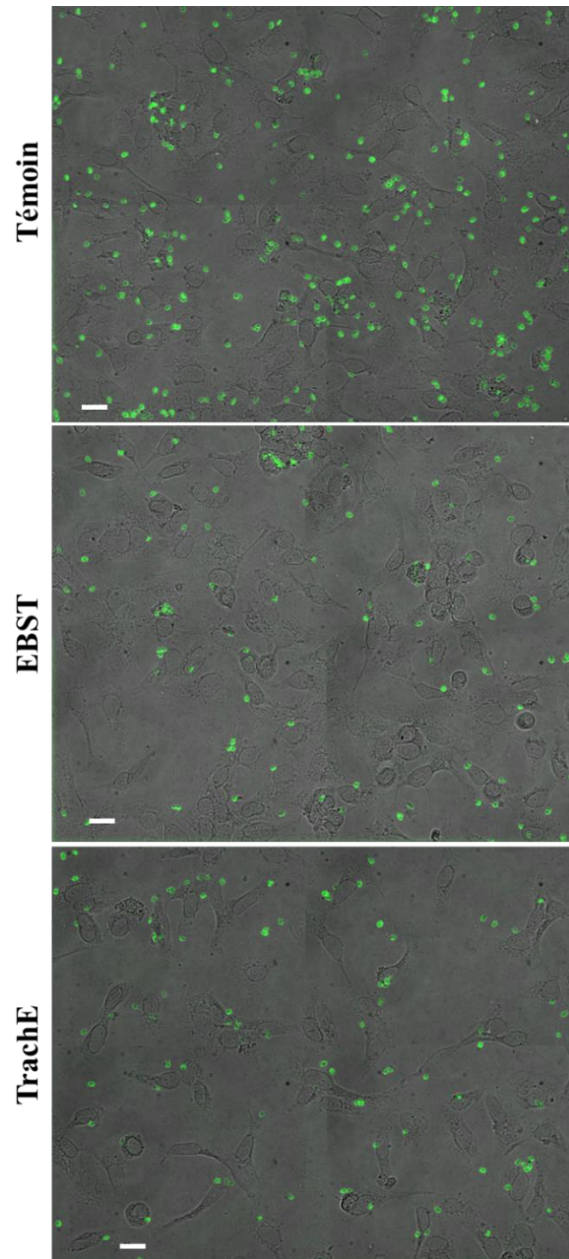


Figure 69. Observation au microscope optique de tachyzoïtes de *T. gondii*, pré-incubés en présence d'EBST ou de TrachE lors de l'invasion de cellules Vero. Les tachyzoïtes apparaissent en vert. Les barres représentent 20 µm (G : X 40).

Le nombre de tachyzoïtes marqués à l'AlexaFluor 488 est significativement moindre lorsque ceux-ci ont été pré-incubés en présence d'EBST ou de TrachE par rapport au témoin sans traitement. Les parasites qui n'ont pas adhéré à la cellule hôte ont été éliminés lors des lavages au PBS, traduisant une inhibition partielle du mécanisme d'invasion par les composés naturels comparativement au témoin non traité. De plus, les parasites restants semblent rester dans le milieu extracellulaire, en périphérie de la surface de la membrane cellulaire.

Afin de quantifier cette inhibition, le nombre de tachyzoïtes a été déterminé informatiquement à l'aide du logiciel ImageJ (**Figure 70**).

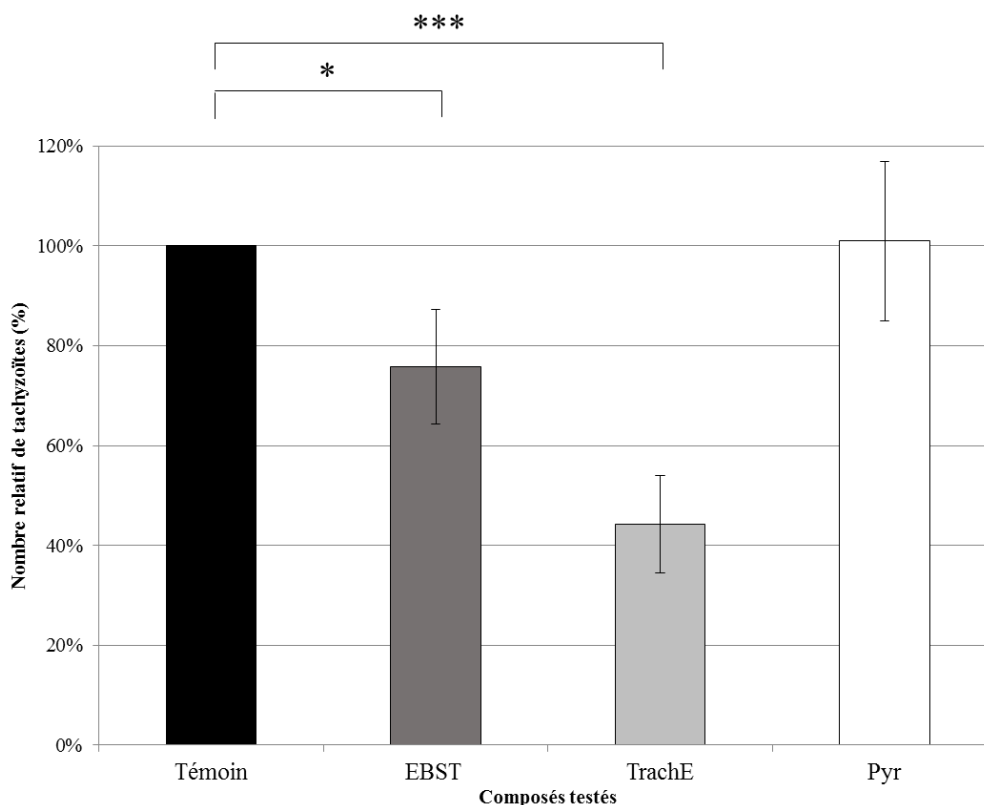


Figure 70. Nombre relatif de tachyzoïtes après pré-incubation en présence d'EBST ou de TrachE. Ce test reflète le taux d'inhibition de l'invasion des cellules hôtes par *T. gondii* par les composés naturels actifs in vitro. La pyriméthamine (Pyr) est utilisée comme molécule de référence. * $p < 0,05$; *** $p < 0,007$ comparativement au groupe contrôle.

Les résultats montrent une diminution significative du nombre relatif de tachyzoïtes induite par EBST et TrachE par rapport au témoin non traité et au traitement à la pyriméthamine, de l'ordre de 24% ($p < 0,05$) et de 56% ($p < 0,007$), respectivement. En d'autres termes, EBST et TrachE inhibent respectivement de 24% et de 56% l'invasion des cellules Vero par *T. gondii*.

2) Observations en microscopie confocale

Afin de vérifier que les tachyzoïtes sont effectivement restés bloqués hors de la cellule hôte, des observations réalisées à l'aide de la microscopie confocale ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans la **Figure 71**.

D'après ces clichés, il apparaît que les tachyzoïtes ayant subi un traitement à l'un des deux composés naturels restent bloqués à la surface de la membrane des cellules Vero, ou perdent

leur capacité d'invasion. Ces observations confortent les résultats précédents en microscopie optique attestant d'un effet anti-invasion par l'EBST et TrachE sur les tachyzoïtes de *T. gondii*.

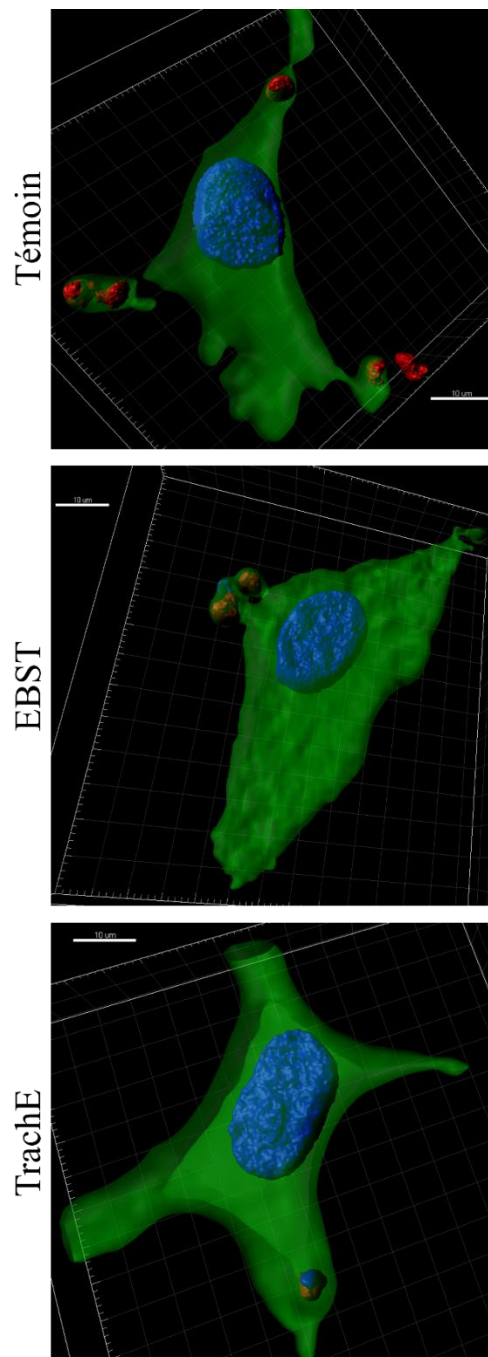


Figure 71. Observation en microscopie confocale de l'inhibition de l'invasion cellulaire par des tachyzoïtes de *T. gondii* après traitement à l'EBST et TrachE. Le cytoplasme des cellules et des tachyzoïtes apparaît en vert, les noyaux en bleu et la membrane des tachyzoïtes en rouge. Les barres représentent 10 µm (G : X 63).

L'activité antiparasitaire de l'EBST et de TrachE mise en évidence ici chez *T. gondii* nous a conduits à poursuivre l'étude de la chimiosensibilité sur des modèles murins de toxoplasmose

aiguë et chronique et de néosporose aiguë. Cette étude *in vivo* a été soutenue financièrement par la SATT Nord.

IV) Chimiosensibilité *in vivo* de *T. gondii* et *N. caninum* à l'EBST et TrachE

1) Contexte

Cette étude a pour objectif de déterminer si les composés les plus sélectifs *in vitro* (IS > 5) sont également actifs *in vivo* chez la souris dans un système biologique plus complexe. Elle a été élaborée de façon à limiter au maximum la souffrance et la détresse de l'animal, bien que le facteur de mortalité soit à prendre en considération du fait de la multiplication parasitaire, en cas d'absence d'effet antiparasitaire chez l'animal. La Société d'Accélération du Transfert de Technologie (SATT) Nord a soutenu financièrement ce projet.

2) Evaluation de la chimiosensibilité *in vivo*

a. Lot A : toxoplasmose aiguë chez des souris immunocompétentes (souche RH)

Les souris inoculées avec 100 000 tachyzoïtes de *T. gondii* (souche RH) ont été traitées à différents temps avec 100 µg/mL d'EBST ou de TrachE. Les résultats sont présentés dans la **Figure 72**.

Malgré les traitements aux différents temps, les souris sont toutes mortes au bout de huit jours maximum. Aucun prélèvement d'organe n'a donc été réalisé. L'extrait EBST et la fraction TrachE n'ont pas permis pas de prolonger la survie des souris. Ces deux produits naturels ne sont donc pas actifs *in vivo* dans le cas d'une toxoplasmose aiguë.

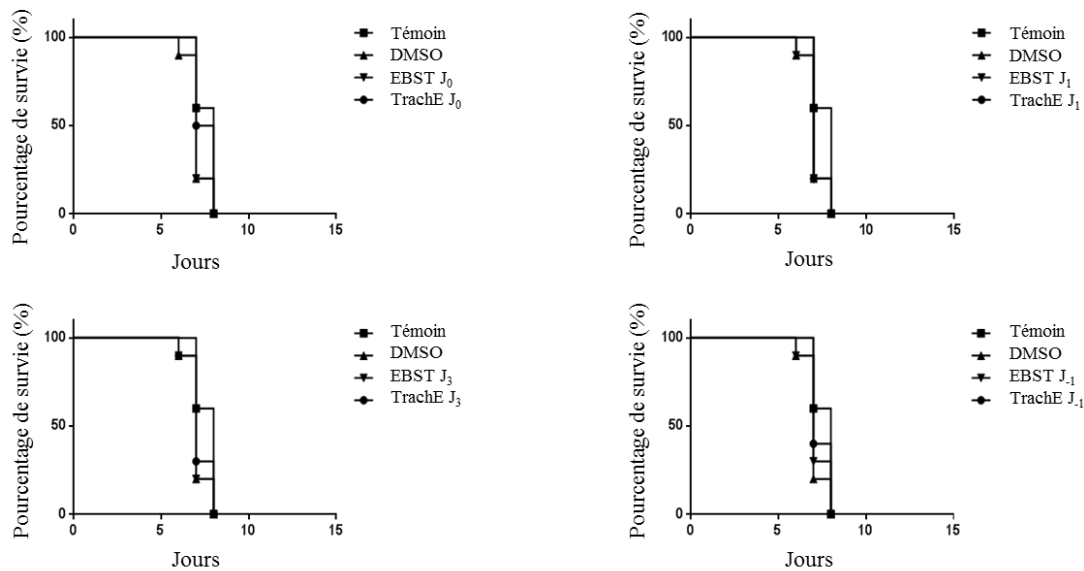


Figure 72. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin de toxoplasmose aiguë (souche RH). Les traitements sont réalisés 10 minutes (J₀), 24 heures (J₁) ou 72 heures (J₃) après inoculation des tachyzoïtes ou 24 heures avant (J₋₁). Les souris non traitées appartiennent au groupe Témoin et les souris traitées au DMSO 1% (v/v) appartiennent au groupe DMSO.

b. Lot B : toxoplasmose chronique chez des souris immunocompétentes (souche ME49)

Les souris inoculées avec 100 000 tachyzoïtes de *T. gondii* (souche ME49) ont été traitées à différents temps avec 100 µg/mL d'EBST ou de TrachE.

Au bout de 30 jours, une partie des souris traitées par la fraction TrachE sont mortes, notamment à J₀ (**Figure 73**). En revanche, la quasi-totalité des souris a survécu à l'infection par *T. gondii* lorsqu'elles ont été traitées avec l'EBST (**Figure 73**). Après sacrifice, le cerveau et le cœur de chaque animal ont été prélevés et analysés en vue de quantifier le nombre de parasites présents dans ces organes. Les résultats bruts sont présentés en **Annexe 2**.

Dans un premier temps, l'effet du DMSO sur la multiplication parasitaire a été évalué afin de s'assurer qu'il n'ait pas d'effet antiparasitaire indésirable (**Figure 74**). D'après ces résultats, le DMSO n'inhibe pas la multiplication parasitaire. La survie des souris traitées à l'EBST n'est donc pas due au DMSO.

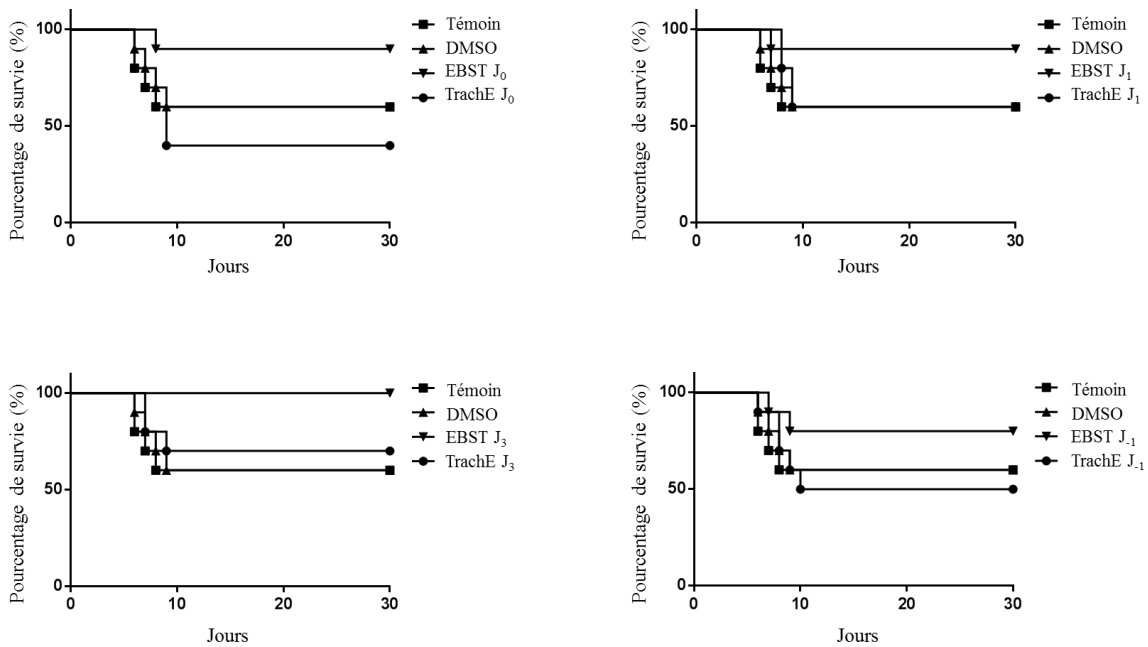


Figure 73. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin de toxoplasmose chronique (souche ME49). Les traitements sont réalisés 10 minutes (J₀), 24 heures (J₁) ou 72 heures (J₃) après inoculation des tachyzoïtes ou 24 heures avant (J₋₁). Les souris non traitées appartiennent au groupe Témoin et les souris traitées au DMSO 1% (v/v) appartiennent au groupe DMSO.



Figure 74. Effet *in vivo* du DMSO sur *T. gondii* (souche ME49) dans le cerveau en comparaison à des souris infectées non traitées.

Ensuite, la présence de tachyzoïtes dans le cerveau des animaux sacrifiés a été quantifiée par qRT-PCR afin de comparer l'efficacité de chaque temps de traitement (**Figure 75**).

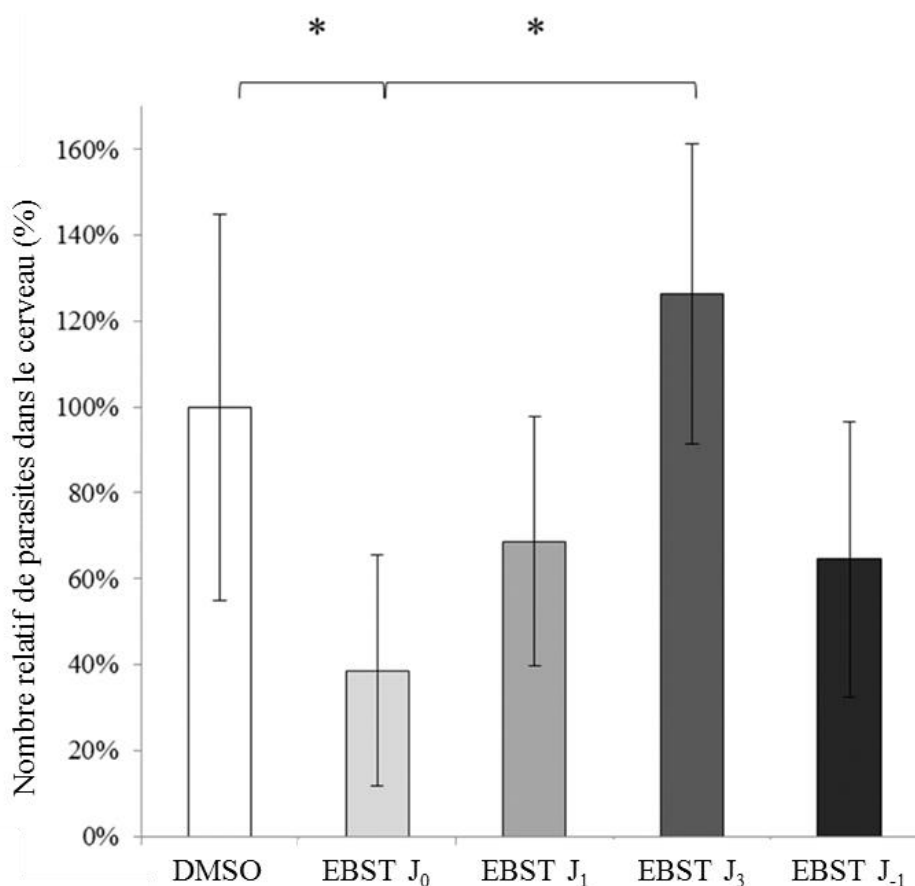


Figure 75. Nombre relatif de parasites détectés dans le cerveau après traitement avec EBST dans un modèle murin de toxoplasmose chronique (souche ME49). Les traitements sont réalisés 10 minutes (J₀), 24 heures (J₁) ou 72 heures (J₃) après inoculation des tachyzoïtes ou 24 heures avant (J₋₁). Les souris traitées au DMSO 1% (v/v) appartiennent au groupe DMSO. *p < 0,05 comparé au groupe DMSO.

Il apparaît que l'injection à J₀ est significativement plus efficace que l'injection à J₃ contre le parasite dans le cas d'une toxoplasmose chronique (p < 0,05), avec une diminution d'environ 60% du nombre de parasites présents dans le cerveau. L'effet antiparasitaire de l'EBST est donc plus important si celui-ci est administré peu de temps après l'infection parasitaire. Un traitement en prophylaxie n'a aucun effet, comme le démontrent les résultats du traitement à J₋₁ (**Figure 75**). Le traitement à J₀ est également significativement efficace par rapport au traitement au DMSO (p < 0,05).

L'EBST présente donc des propriétés anti-*T. gondii* significatives lorsqu'il est administré dans les premiers instants de l'infection dans le cas d'un modèle murin de toxoplasmose chronique.

c. Lot C : toxoplasmose aiguë chez des souris immunodéprimées (souche ME49)

Les souris immunodéprimées inoculées avec 100 000 tachyzoïtes de *T. gondii* (souche ME49) ont été traitées à différents temps avec 100 µg/mL d'EBST ou de TrachE. Les résultats sont présentés dans la **Figure 76**.

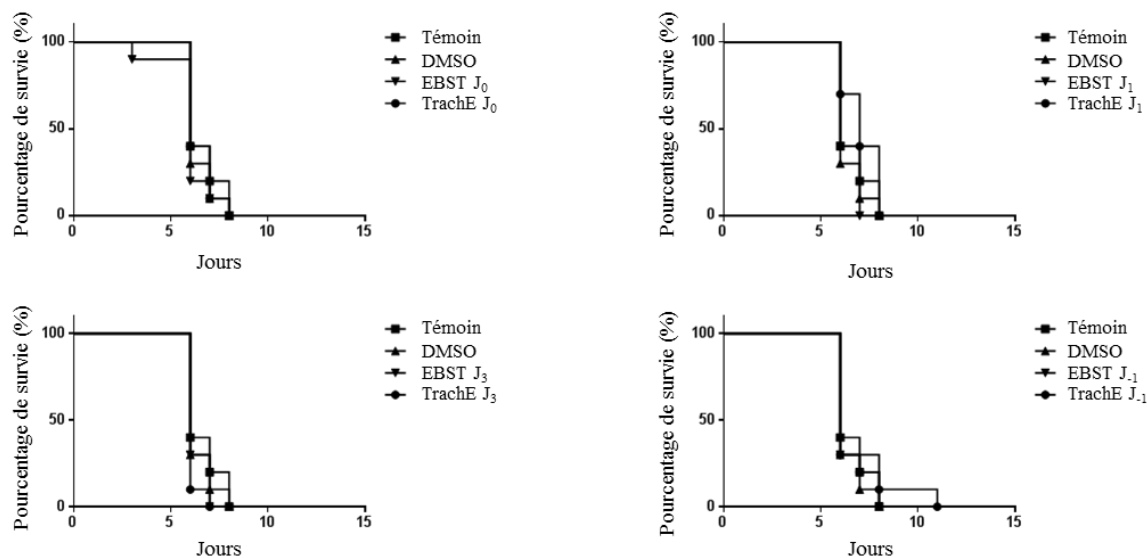


Figure 76. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin immunodéprimé de toxoplasmose aiguë (souche ME49). Les traitements sont réalisés 10 minutes (J₀), 24 heures (J₁) ou 72 heures (J₃) après inoculation des tachyzoïtes ou 24 heures avant (J₋₁). Les souris non traitées appartiennent au groupe Témoin et les souris traitées au DMSO 1% (v/v) appartiennent au groupe DMSO.

Malgré les traitements aux différents temps, les souris sont toutes mortes au bout de onze jours maximum. Aucun prélèvement d'organe n'a donc été réalisé. L'extrait EBST et la fraction TrachE n'ont pas permis pas de prolonger la survie des souris immunodéprimées. Ces deux produits naturels ne sont donc pas actifs *in vivo* dans le cas d'une toxoplasmose aiguë, confirmant les résultats précédents (**Figure 72**).

d. Lot D : néosporose aiguë chez des souris immunodéprimées (souche NC1)

Les souris inoculées avec 100 000 tachyzoïtes de *N. caninum* (souche NC1) ont été traitées à différents temps avec 100 µg/mL d'EBST ou de TrachE. Les résultats sont présentés dans la **Figure 77**. Les données brutes sont visibles en **Annexe 2**.

Malgré les traitements aux différents temps, les souris sont mortes entre six et onze jours post-inoculation pour la majorité d'entre elles. Aucun prélèvement d'organe n'a donc été

réalisé. Dans le groupe Témoin, les souris ont survécu jusqu'à 27 jours. Cette survie passe à huit jours maximum dans le cas du groupe DMSO. Le DMSO 1% (v/v) est donc toxique pour ce modèle de souris infectées par *N. caninum*. L'extrait EBST et la fraction TrachE n'ont pas permis pas de prolonger la survie des souris immunodéprimées. Ces deux produits naturels ne sont donc pas actifs *in vivo* dans le cas d'une néosporose aiguë

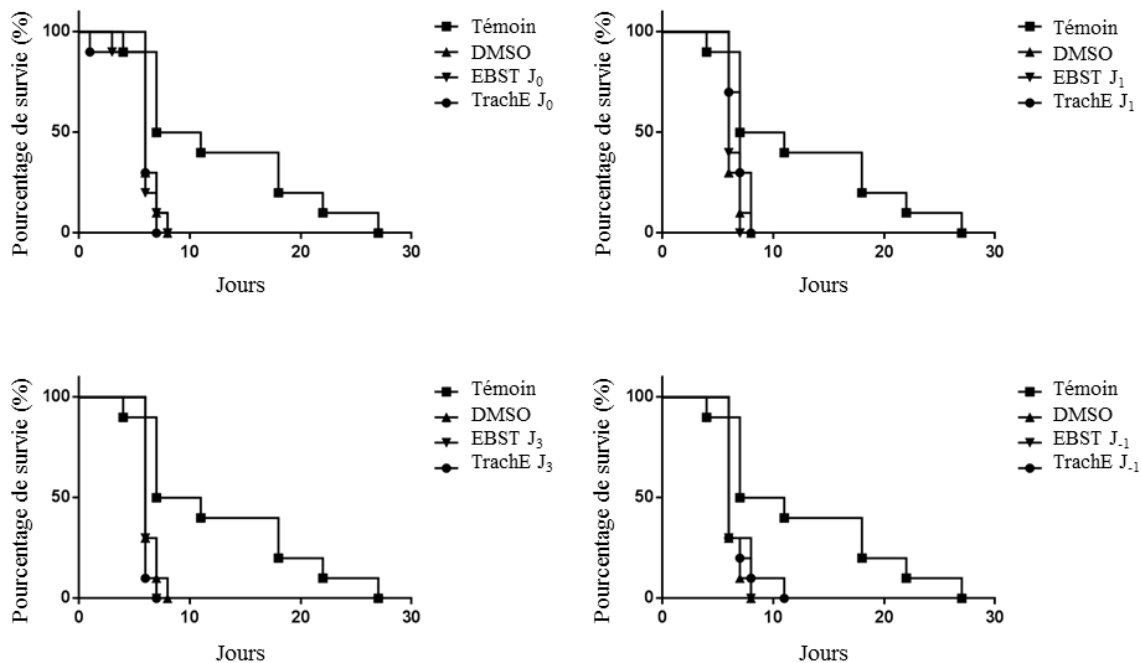


Figure 77. Survie des souris en fonction de différents temps de traitement avec EBST et TrachE dans un modèle murin immunodéprimé de néosporose aiguë (souche NC1). Les traitements sont réalisés 10 minutes (J_0), 24 heures (J_1) ou 72 heures (J_3) après inoculation des tachyzoïtes ou 24 heures avant (J_{-1}). Les souris non traitées appartiennent au groupe Témoin et les souris traitées au DMSO 1% (v/v) appartiennent au groupe DMSO.

V) Bilan des résultats

L'ensemble des résultats obtenus pour cette partie de l'étude a été regroupé sous forme d'un schéma récapitulatif (**Figure 78**).

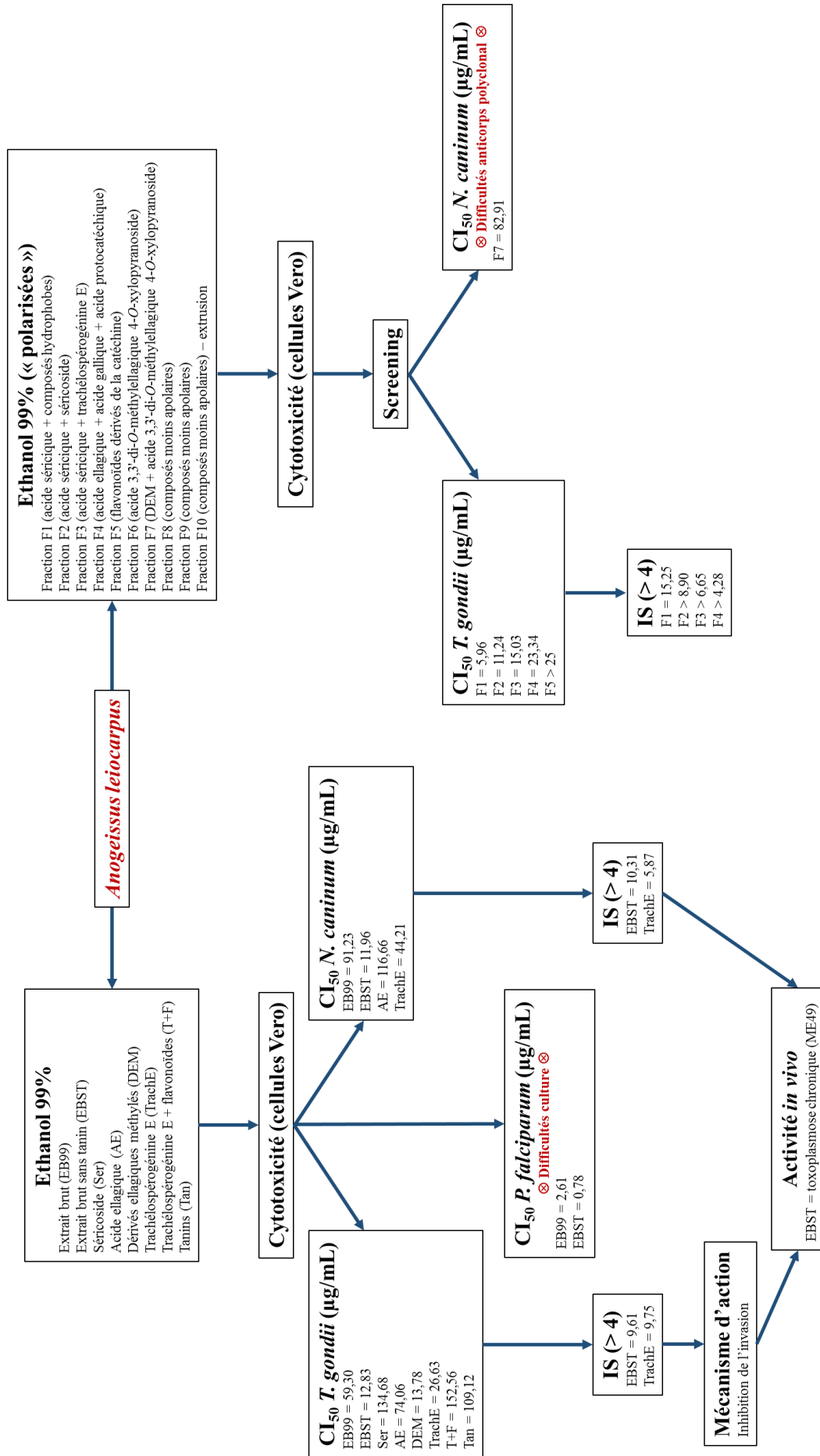


Figure 78. Bilan des résultats de l'étude portant sur l'activité antiparasitaire des extraits et fractions issus de l'écorce d'*A. leiocarpus*.

VI) Conclusion et discussion

Le but de cette première partie de l'étude était, dans un premier temps, d'évaluer les effets cytotoxique et antiparasitaire *in vitro* de différentes fractions et molécules isolées issues de l'écorce d'*A. leiocarpus* sur *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum*. Dans un second temps, les mécanismes d'actions des composés naturels actifs *in vitro* ont été en partie identifiés chez *T. gondii*. Enfin, l'efficacité *in vivo* des extraits et fractions les plus actifs issus de l'extrait éthanol d'écorce d'*A. leiocarpus* a été évaluée chez *T. gondii* et *N. caninum*. Ces différentes expérimentations ont été menées dans l'optique de mettre en place un outil de criblage moléculaire d'une variété de composés chimiques sur différents modèles parasitaires.

Hormis l'extrait EB99, toutes les fractions et l'extrait EBST ont été obtenues par CPC, et leur profil chimique a été caractérisé à l'aide d'un outil de déréplication développé précédemment au laboratoire, reposant sur l'utilisation de la RMN du ^{13}C combinée à des outils de classification. Le DMSO a été choisi pour solubiliser ces extraits et fractions afin de standardiser au maximum le processus. De plus, ce solvant est un solvant aprotique dipolaire à fort pouvoir solubilisant, particulièrement utilisé dans les expérimentations *in vitro* ou *in vivo* (Kelava et al., 2011). La méthode CPC utilisée dans notre étude a été approuvée comme étant une approche efficace pour séparer l'acide séricique, la trachélospérogénine E et le séricoside, qui sont des triterpènes très proches (Skalicka-Woźniak and Garrard, 2014).

La cytotoxicité et fractions et composés isolés a été évaluée sur cellules Vero, qui présentent des avantages significatifs tels que le rendement et la viabilité des cultures de *T. gondii* par rapport à d'autres modèles cellulaires. Pour chaque produit naturel testé, la concentration la plus élevée était très cytotoxique. Dans le cas de la fraction DEM, les deux plus fortes concentrations (20 et 40 $\mu\text{g/mL}$) étaient particulièrement toxiques pour les cellules Vero. Ces données pourraient potentiellement être utilisées pour évaluer l'activité antiparasitaire des produits naturels issus d'*A. leiocarpus* sur un autre parasite intracellulaire capable d'envahir les cellules Vero.

Puisqu'il a été démontré que l'écorce d'*A. leiocarpus* possédait une activité antipaludique (Okpekon et al., 2004), son activité parasitaire a été évaluée sur *T. gondii*. En effet, ces parasites font tous deux partie du phylum des Apicomplexa. L'EB99 a présenté une activité antiparasitaire intéressante, avec une CI_{50} moyenne de $59,30 \pm 9,16 \mu\text{g/mL}$ (IS = 2,32), attestant

de la présence de composés actifs contre certains parasites protozoaires dans l'écorce d'*A. leiocarpus*. Il est intéressant de souligner que cette CI_{50} est dans le même ordre de grandeur que celle de la sulfadiazine, qui est de 77 $\mu\text{g/mL}$ (Doliwa et al., 2013). En revanche, la sulfadiazine n'est pas la molécule la plus active contre *T. gondii* et elle fonctionne en synergie lorsqu'elle est utilisée en thérapie contre ce parasite. Ces résultats restent toutefois encourageants dans la mesure où il n'existe que peu de traitements actuellement disponibles contre *T. gondii*.

Pour comprendre d'où provient cet effet antiparasitaire, un extrait et sept fractions ont été obtenues après fractionnement par EPC à partir de l'EB99. L'extrait EBST s'est révélé être plus actif que l'EB99, avec une CI_{50} égale à $12,83 \pm 1,85 \mu\text{g/mL}$ (IS = 9,61). Ces données semblent indiquer que les tanins n'interviennent pas dans l'activité anti-*T. gondii* observée avec l'EB99, l'extrait EBST n'étant autre que l'EB99 auquel les tanins ont été enlevés. Or, ceux-ci représentant environ 80% de l'EB99, ils contribuent à « masquer » par effet de dilution l'effet antiparasitaire *in vitro* des composés actifs de l'extrait EB99.

Les fractions Tan (riche en tannins) et Ser (riche en sérécicide) n'ont présenté aucun effet anti-toxoplasmique sélectif, confirmant ainsi l'observation précédemment évoquée pour les tanins. Ces résultats sont en accord avec les données disponibles pour *Plasmodium falciparum*, démontrant que ces composés n'ont aucun effet sur ce parasite (Asres et al., 2001; Serge et al., 2015).

L'acide ellagique pur (AE) a induit une activité anti-toxoplasmique, avec une CI_{50} égale à $74,06 \pm 19,60 \mu\text{g/mL}$. Cet effet antiparasitaire de l'acide ellagique, qui se retrouve également chez *P. falciparum* (Soh et al., 2009), témoigne de la présence de composés anti-*T. gondii* dans l'écorce d'*A. leiocarpus*. De même, des composés dérivés de l'acide ellagique contenus dans la fraction DEM (l'acide 3,3'-di-*O*-méthylellagique et l'acide 3,4,3'-tri-*O*-méthylflavellagique) ont montré une activité anti-toxoplasmique intéressante, malgré leur cytotoxicité, avec une CI_{50} de $13,78 \pm 3,52 \mu\text{g/mL}$.

L'un des composés les plus actifs est la trachélospérogénine E, présente à l'état pur dans la fraction TrachE. L'activité antiparasitaire induite par ce métabolite a été l'une des plus intéressantes ($CI_{50} = 26,63 \pm 0,94 \mu\text{g/mL}$) et la plus sélective de toutes (IS = 9,75). Ce composé pourrait expliquer, au moins en partie, l'activité anti-toxoplasmique induite par l'extrait d'écorce d'*A. leiocarpus*.

Enfin, la fraction T+F (comprenant la trachélospérogénine E et des flavonoïdes dérivés de la catéchine) n'a montré aucun effet contre *T. gondii*. Etant donné que la trachélospérogénine E pure était active, il est surprenant que ce mélange n'ait montré aucun effet sur le parasite. De

plus, il a été démontré que les flavonoïdes sont actifs contre *P. falciparum* : le mécanisme d'action consiste en l'inhibition des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras, telles que FabG, FabZ et FabI (Tasdemir et al., 2006). L'expression de FabG et FabI n'a pas été mise en évidence chez *T. gondii*, à l'inverse de FabZ qui est impliquée dans la voie de synthèse des acides gras (UniProt O97376, ToxoDB TGME49-321570). Les flavonoïdes pourraient donc inhiber FabZ chez *T. gondii*, bien que cela ne soit pas suffisant pour inhiber la croissance des tachyzoïtes. Cette hypothèse expliquerait donc l'inactivité du mélange contenu dans la fraction T+F vis-à-vis de *T. gondii*.

Etant donné que l'extrait EBST et la fraction TrachE étaient les composés naturels les plus sélectivement actifs sur *T. gondii*, leur mécanisme d'action a été étudié lors de l'invasion des cellules hôtes par des tachyzoïtes de la souche RH de ce parasite.

Les résultats ont montré une inhibition significative du processus d'invasion, de l'ordre de 24% pour EBST et de 56% pour TrachE. De par leur effet sur l'invasion, il apparaît que l'activité antiparasitaire de ces deux produits d'origine naturelle soit majoritairement liée à cette inhibition de l'invasion, signifiant qu'une quelconque inhibition de la multiplication du parasite reste mineure. Il semble également que la trachélospérogénine E soit en grande partie responsable de cette inhibition.

De plus, d'après les informations obtenues en microscopies optique et confocale, les tachyzoïtes semblent bloqués dans le milieu extracellulaire, accolés à la membrane cellulaire. Ce phénomène a déjà été observé après traitement des tachyzoïtes avec du dynasore, un inhibiteur de la dynamine qui empêche *T. gondii* d'envahir les cellules hôtes. La dynamine est un acteur moléculaire impliqué dans l'endocytose de *T. gondii* au cours de l'invasion cellulaire (Caldas et al., 2016). Il a été démontré que les tachyzoïtes traité au dynasore étaient incapables de pénétrer les cellules hôtes malgré l'augmentation de leur adhésion à la membrane cellulaire (Caldas et al., 2009). Par ailleurs, il a été démontré qu'un autre triterpène, l'acide maslinique, était capable d'empêcher *T. gondii* et *Eimeria tenella* d'envahir les cellules hôtes en inhibant les protéases mises en jeu (Lozano-Mena et al., 2014). D'un point de vue mécanistique, ce triterpène inhiberait l'invasion *via* l'altération de la synthèse et de la maturation des protéines parasitaires impliquées dans ce processus, notamment par la disruption de la membrane nucléaire du parasite et de l'appareil de Golgi (De Pablos et al., 2010; Lozano-Mena et al., 2014). Ces données suggèrent donc que la trachélospérogénine E pourrait inhiber l'un des acteurs moléculaires impliqués dans l'invasion et/ou l'adhérence du parasite.

La pyriméthamine n'a pas induit d'inhibition de l'invasion des cellules hôtes par *T. gondii*. Ces résultats sont en accord avec les observations déjà décrites dans la littérature chez *P. falciparum* (Friesen et al., 2011) et *N. caninum* (Pereira et al., 2017). La pyriméthamine pourrait donc être utilisée comme contrôle lors d'expérimentations portant sur l'inhibition de l'invasion des cellules hôtes par un nouveau composé actif.

Les extraits et fractions isolés par CPC à partir de l'EB99 d'*A. leiocarpus* ont aussi été testés chez *N. caninum*. Seuls l'extrait EBST et la fraction TrachE ont présenté un effet antiparasitaire sélectif *in vitro*, avec des IS de l'ordre de 10,31 ($CI_{50} = 11,96 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$) et 5,87 ($CI_{50} = 44,21 \pm 4,55$), respectivement. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus chez *T. gondii* et témoignent de l'effet de la trachélospérogénine E, appartenant à la famille des triterpènes, contre ces parasites du phylum des Apicomplexa. Ces similitudes sont explicables par le fait que *T. gondii* et *N. caninum* sont des parasites très proches d'un point de vue phylogénétique (Ellis et al., 1994) et partagent donc des caractères en commun. La trachélospérogénine E, et *a fortiori* les triterpènes, pourraient donc avoir des propriétés antiparasitaires intéressantes vis-à-vis des Apicomplexa. En effet, un brevet a été déposé et fait état d'un effet antiparasitaire d'une composition orale à usage vétérinaire contre les parasites appartenant aux Apicomplexa, dont *N. caninum* et *T. gondii* (Feugier and Lerouxel, 2015). Cette composition orale comprend, entre autres terpènes et constituants divers, une source de saponines, molécules dont la structure comprend un dérivé de triterpène. A l'inverse, il a été démontré récemment que la trachélospérogénine E n'avait pas d'effet contre *Leishmania infantum* (Zebiri et al., 2017).

Les extraits EB99 et EBST d'*A. leiocarpus* ont également été testés sur *P. falciparum* lors d'un transfert de technologies entre les laboratoires de Reims et de Strasbourg. L'objectif de ce transfert était de transposer la culture de ce parasite à Reims, afin d'élargir l'éventail de compétences dans les cultures parasitaires du laboratoire.

Comme cela a été précédemment décrit dans de nombreuses publications scientifiques, les extraits des différentes parties d'*A. leiocarpus* sont capables d'induire un effet antiparasitaire vis-à-vis de diverses souches de *P. falciparum* (Attoua et al., 2011; Ndjonka et al., 2012; Okpekon et al., 2004). Ici, les extraits d'écorce ont effectivement eu une activité antiparasitaire significative contre la souche 3D7 du parasite. Les CI_{50} respectives de ces extraits étaient de $2,61 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ et de $0,78 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$. Bien que les données scientifiques concernant l'extrait EBST soient inexistantes, une étude décrit la CI_{50} de l'extrait brut méthanol comme égale à $4,80 \mu\text{g/mL}$ (Okpekon et al., 2004). Cette valeur confirme donc celle de l'EB99, qui est

également un extrait alcool (éthanol 99%). De la même façon, la CI_{50} expérimentale du contrôle chloroquine ($5,50 \pm 3,5$ ng/mL) correspond aux données disponibles dans la littérature pour la souche 3D7 (Wahome et al., 2014).

Cependant, plusieurs limites et imprévus ont empêché la poursuite de cette étude sur *P. falciparum* à Reims. Tout d'abord, la culture de ce parasite nécessite des globules rouges humains. Ce matériel biologique provenant de donneurs, il est obligatoire d'effectuer une demande auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour être autorisé à en utiliser dans le cadre de recherches scientifiques. Ce dossier requiert deux mois d'étude avant d'être validé ou non par le Ministère, ce qui apporte un délai supplémentaire avant tout début des expérimentations.

Ensuite, une limite liée à la culture du parasite s'est rapidement présentée. En effet, la culture du parasite à l'IPPTS se fait sans oxygène à l'aide d'une enceinte hermétique nommée « Candle Jar », ce qui augmente le taux de CO_2 et facilite sa multiplication (Schuster, 2002). A Reims, la culture de *P. falciparum* a été réalisée en présence d'oxygène, ce qui a ralenti la multiplication du parasite.

Une autre limite est également apparue lors du dosage ELISA par le kit Malaria Antigen Elisa fourni par ApDia : le tampon de lyse de l'un des kits n'était pas fonctionnel, empêchant la lyse des globules rouges et donc la quantification de l'antigène parasitaire ciblé. Ce problème a toutefois pu être résolu en utilisant un second kit neuf par la suite.

De plus, la quantification de l'antigène parasitaire par le kit ELISA était nulle à chaque expérimentation sur la souche 3D7, initialement fournie par l'IPPTS. La première hypothèse pouvant expliquer cette absence de quantification était le trop faible nombre de parasites dans le milieu de culture, mais elle a été rapidement réfutée par différents dénombrements montrant un nombre suffisant de parasites pour l'utilisation du kit ELISA. La seconde hypothèse qui s'est alors imposée était que la souche 3D7 cultivée au laboratoire ne possédait pas l'antigène parasitaire quantifié par l'ELISA. Ainsi, l'IPPTS a fourni la souche 7G8 de *P. falciparum* pour pallier ce problème. Un ELISA réalisé sur une culture non traitée de cette souche a montré des résultats positifs, laissant suggérer que la seconde hypothèse était correcte.

Malgré le remplacement de la souche 3D7 par la souche 7G8 pour solutionner le problème du dosage ELISA, la principale limite a été la succession de contaminations dans la culture des parasites. Des problèmes de cet ordre ont eu lieu à plusieurs reprises, vraisemblablement dû à des bactéries de type *Escherichia coli*. Ces contaminations ont également impacté les autres cultures parasitaires (*T. gondii* principalement) entretenues au même moment. L'origine de ces

contaminations n'a pas pu être déterminée. L'étude portant sur *P. falciparum* a donc été avortée, empêchant l'étude des autres extraits et fractions dans ce modèle par la suite.

D'autres fractions CPC ont été testées sur *N. caninum*. Leur caractérisation chimique ayant été réalisée préalablement, il a été possible d'identifier au moins en partie les composés responsables de l'activité antiparasitaire, comme précédemment dans le cas de la fraction TrachE. Parmi les dix fractions ainsi isolées, seule la fraction F7 (comprenant des composés dérivés de l'acide ellagique) a présenté un effet antiparasitaire lors du screening moléculaire. Néanmoins, la valeur de son IS (1,21) laisse supposer que cet effet n'est dû qu'à sa cytotoxicité vis-à-vis des cellules Vero.

Ces résultats sont toutefois à nuancer. En effet, la valeur de CC_{50} n'a pas été atteinte aux concentrations testées, introduisant un biais dans le calcul de l'IS. De plus, la CI_{50} n'a été évaluée qu'une fois, ce qui introduit un second biais dans cette étude. Enfin, une partie des dosages ELISA effectués pour l'ensemble des expérimentations sur *N. caninum* a été réalisée avec un anticorps polyclonal anti-*N. caninum*, alors qu'un anticorps monoclonal anti-*N. caninum* (Schaes et al., 1999) a été utilisé initialement. A l'inverse de celui-ci, l'anticorps polyclonal a induit des difficultés lors de la lecture des résultats des ELISA : absorbance contradictoire par rapport aux observations microscopiques, absorbance des cellules Vero seules aussi importante que celle des cellules Vero avec parasites, etc... Ces limites ont ainsi provoqué une grande variabilité dans les résultats obtenus, ce qui a probablement abouti à l'élimination de fractions supposément inactives dans la suite des études alors que celles-ci étaient peut-être actives, comme par exemple la fraction F1.

Par la suite, ces limites ont pu être réduites en augmentant le temps et en ajoutant une étape de saturation au tampon de conjugué lors du dosage ELISA. De ce fait, il serait judicieux de réitérer les expérimentations dont les résultats ont été obtenus à l'aide de l'anticorps polyclonal avec le protocole du dosage ELISA ainsi mis à jour.

La cytotoxicité induite par la fraction F6 peut s'expliquer par le fait que le composé majoritaire s'y trouvant, l'acide 3,3'-di-O-méthylellagique 4-O-xylopyranoside, a été démontré comme ayant des propriétés antitumorales vis-à-vis de cellules de carcinome hépatique humaines (Zhang et al., 2014).

Ces fractions ont également été testées sur *T. gondii*. A l'inverse de *N. caninum*, ce sont les fractions F1 (IS = 15,25), F2 (IS = 8,90), F3 (IS > 6,65) et F4 (IS > 4,28) qui se sont avérées être sélectivement actives sur le parasite. L'un des aspects les plus intéressants est que la

sélectivité diminue à mesure que la polarité des composés présents dans les fractions augmente. Autrement dit, les composés les plus apolaires induisent un effet antiparasitaire plus sélectif.

Il est également intéressant de souligner que les fractions les plus sélectives, F1 et F2 sont riches en acide sérrique. Tout comme la trachélospérogénine E, il s'agit d'un composé de type triterpène. Il semble donc que cette famille de composés soit responsable des activités antiparasitaires mises en évidence ici, comme cela a été abordé avec des dérivés de triterpènes (Feugier and Lerouxel, 2015) et décrit précédemment dans la première partie de cette étude.

Suite aux résultats de la chimiosensibilité *in vitro* obtenus sur *T. gondii* et *N. caninum* vis-à-vis de l'extrait EBST et de la fraction TrachE issus de l'écorce d'*A. leiocarpus*, ces derniers ont été testés *in vivo* dans différents modèles murins de toxoplasmose chronique et aiguë et de néosporose aiguë. Seul l'EBST a eu un effet protecteur dans le modèle de toxoplasmose chronique (souche ME49, souris immunocompétentes) en permettant la survie des animaux jusqu'à la fin de l'expérimentation, 30 jours post-inoculation.

La trachélospérogénine E a causé une grande mortalité chez les souris probablement du fait de sa toxicité *in vivo*. En effet, il a été démontré que les souris sont plus sensibles à un traitement comparativement au modèle *in vitro* testé pour ce même traitement (Sheridan et al., 1999).

Par ailleurs, ni l'EBST ni TrachE n'ont été capables de protéger les souris d'une toxoplasmose aiguë induite par la souche RH, qui est une souche virulente de *T. gondii* (Sibley and Boothroyd, 1992). Il en est de même pour la néosporose aiguë induite par la souche NC1 de *N. caninum* et la toxoplasmose aiguë induite par la souche ME49, toutes deux chez des souris immunodéprimées. La combinaison des traitements et de l'immunosuppression semble avoir été délétère pour les animaux, d'où l'absence d'effet antiparasitaire notable.

L'écorce d'*A. leiocarpus* contient donc des métabolites secondaires ayant une activité antiparasitaire contre *T. gondii*, *N. caninum* et *P. falciparum*, qui appartiennent tous trois au phylum des Apicomplexa. Celle-ci a été confirmée en isolant et en testant sur ces parasites différents extraits et fractions obtenus à partir de son extrait brut EB99. Parmi ces extraits et fractions, EBST et TrachE se sont montrés particulièrement prometteurs. Diverses expérimentations ont permis d'identifier le mécanisme d'action mis en jeu contre *T. gondii*, le processus d'invasion parasitaire étant vraisemblablement inhibé en grande partie par la trachélospérogénine E.

Les métabolites responsables des effets anti-*T. gondii* et anti-*N. caninum* ont été identifiés comme appartiennent à la famille des triterpènes (acide sérrique, trachélospérogénine E).

Malgré les limites rencontrées, notamment pour la culture de *P. falciparum*, les travaux initiés ici posent ainsi les bases d'un outil de criblage moléculaire applicables à différents modèles parasitaires et à diverses sources de composés naturels. Des mises au point restent toutefois à réaliser préalablement afin d'optimiser et de maîtriser la culture de modèles parasitaires qui ne sont pas couramment utilisés au laboratoire.

Partie II : Chimiosensibilité de *T. gondii* et *N. caninum* à des extraits d'écorces d'arbres de la région Champagne-Ardenne

I) Solubilité des extraits d'écorces dans le DMSO

Préalablement aux expérimentations *in vitro*, la solubilité des extraits *n*-heptane, méthanol et méthanol/eau 50/50 (v/v) des dix écorces d'arbres de la région Champagne-Ardenne dans le DMSO a été déterminée (Tableau XIV).

Tableau XIV. Solubilité des 30 extraits d'écorces de dix arbres de la région Champagne-Ardenne. Le volume maximal de solubilisation testé est de 2000 μ L. Au-delà de ce volume, la fraction est considérée comme insoluble. MetOH : méthanol.

Essence		Fraction	Masse pesée (mg)	Volume solubilisation (μ L)	Concentration maximale (mg/mL)
Nom latin	Nom venarculaire				
<i>Fagus sylvatica</i>	Hêtre commun	Heptane	2,73	250	10,92
		MetOH	3,01	50	60,20
		MetOH/eau	2,21	1000	2,21
<i>Quercus robur</i>	Chêne pédonculé	Heptane	2,92	150	19,47
		MetOH	6,48	100	64,80
		MetOH/eau	2,66	150	17,73
<i>Alnus glutinosa</i>	Aulne glutineux	Heptane	4,11	500	8,22
		MetOH	4,59	50	91,80
		MetOH/eau	2,38	50	47,60
<i>Prunus avium</i>	Merisier	Heptane	8,15	50	163,00
		MetOH	3,06	50	61,20
		MetOH/eau	4,80	500	9,60
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Erable sycomore	Heptane	27,75	50	555,00
		MetOH	9,48	100	94,80
		MetOH/eau	2,50	INSOLUBLE	
<i>Fraxinus excelsior</i>	Frêne commun	Heptane	2,67	800	3,34
		MetOH	3,75	50	75,00
		MetOH/eau	4,70	200	23,50
<i>Populus robusta</i>	Peuplier robusta	Heptane	3,31	250	13,24
		MetOH	3,54	100	35,40
		MetOH/eau	4,00	1600	2,50
<i>Larix decidua</i>	Mélèze d'Europe	Heptane	3,51	2000	1,76
		MetOH	2,62	50	52,40
		MetOH/eau	2,75	150	18,33
<i>Picea abies</i>	Epicéa commun	Heptane	37,97	100	379,70
		MetOH	9,17	50	183,40
		MetOH/eau	2,91	50	58,20
<i>Populus tremula</i>	Tremble d'Europe	Heptane	4,06	250	16,24
		MetOH	7,70	50	154,00
		MetOH/eau	0,21	50	4,20

Sur la totalité des 30 extraits naturels, seul l'extrait MetOH/eau 50/50 (v/v) de l'érable sycomore n'a pas pu être solubilisé dans le DMSO jusqu'à un volume maximal de 2 mL. De ce

fait, cet extrait ne sera pas utilisé par la suite. Les concentrations maximales atteintes vont de 1,76 mg/mL (extrait *n*-heptane du mélèze d'Europe) à 555,00 mg/mL (extrait *n*-heptane de l'érable sycomore).

II) Chimiosensibilité de *T. gondii* et *N. caninum* aux extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne

1) Evaluation de la cytotoxicité et de la chimiosensibilité par screening

a. *Evaluation de la cytotoxicité*

Dans un premier temps, la cytotoxicité des 29 extraits retenus a été évaluée sur cellules Vero à une concentration de 100 µg/mL pendant 72 heures (**Figure 79**). Les extraits *n*-heptane, méthanol et méthanol/eau 50/50 (v/v) sont respectivement notés extrait 1, extrait 2 et extrait 3.

Aucun des extraits testés ne s'est montré cytotoxique pour les cellules Vero à cette concentration. Par conséquent, la totalité de ceux-ci a ensuite été criblée sur *T. gondii* et *N. caninum* pour en évaluer la chimiosensibilité.

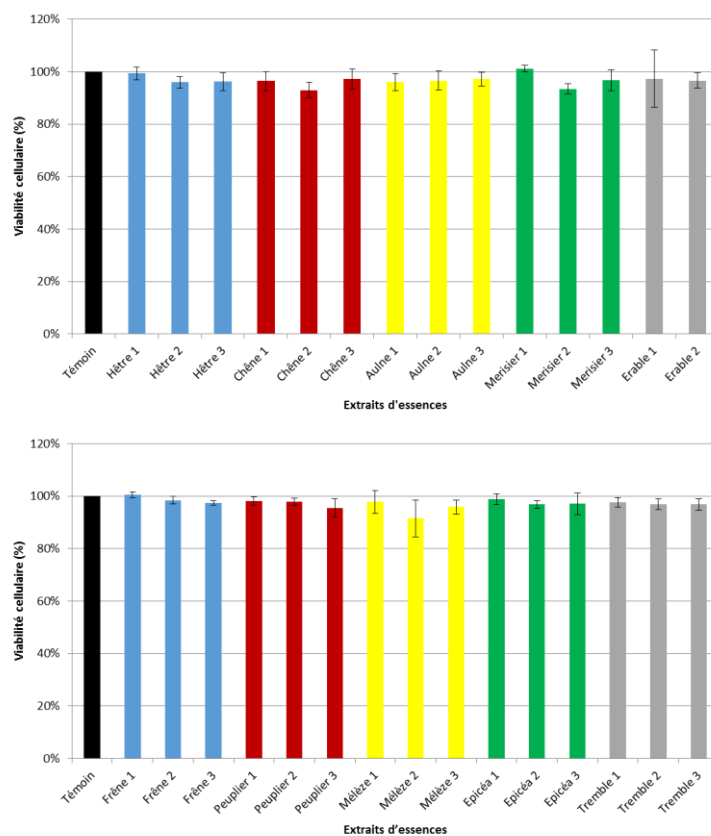


Figure 79. Cytotoxicité des extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne évaluée par screening sur cellules Vero à 100 µg/mL. L'extrait *n*-heptane est noté « 1 », l'extrait méthanol est noté « 2 » et l'extrait méthanol/eau 50/50 (v/v) est noté « 3 ».

b. Evaluation de la chimiosensibilité des parasites aux extraits d'essences par screening

*i. Chimiosensibilité de *T. gondii**

De la même façon que pour la cytotoxicité vis-à-vis des cellules Vero, les 29 extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne ont été criblés sur *T. gondii* à une concentration de 100 µg/mL pendant 72 heures (**Figure 80**).

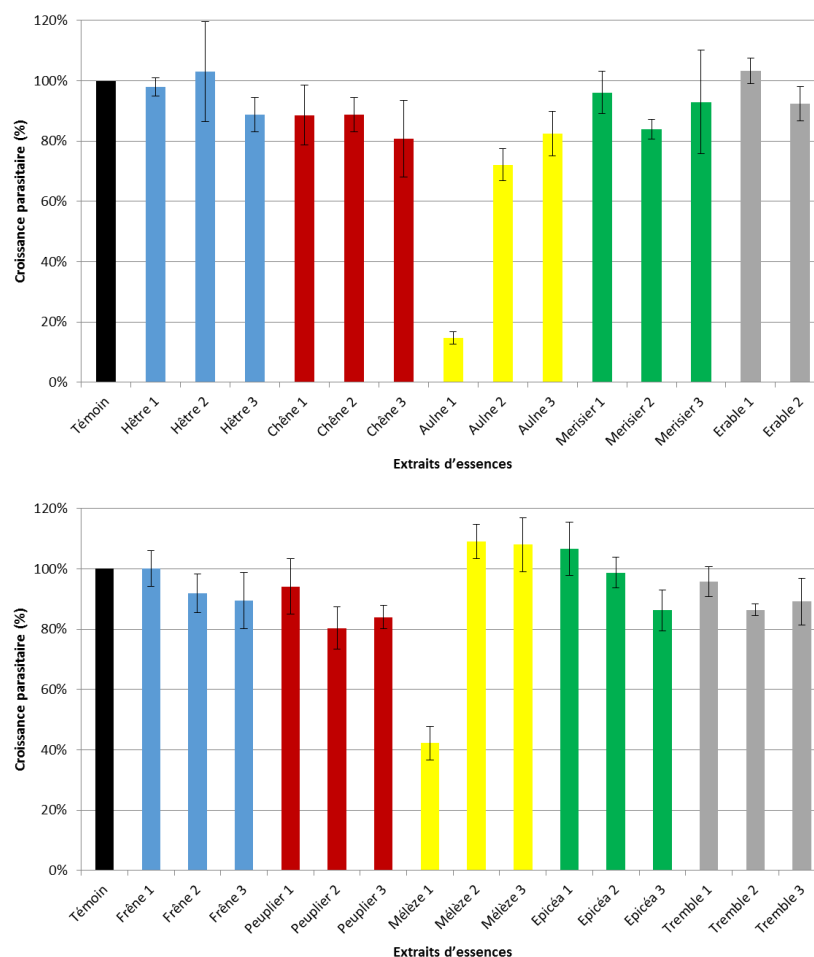


Figure 80. Chimiosensibilité de *T. gondii* à des extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne évaluée par screening sur des tachyzoïtes de la souche RH à 100 µg/mL. L'extrait *n*-heptane est noté « 1 », l'extrait méthanol est noté « 2 » et l'extrait méthanol/eau 50/50 (v/v) est noté « 3 ».

Parmi ces 29 extraits, l'extrait *n*-heptane de l'aulne glutineux a présenté une activité antiparasitaire importante vis-à-vis de *T. gondii*. L'extrait *n*-heptane du mélèze d'Europe a également eu un effet antiparasitaire, toutefois plus modéré que le précédent, ce qui explique qu'il n'a pas été retenu par la suite. Seul l'extrait *n*-heptane de l'aulne glutineux a donc été retenu pour la suite des expérimentations sur *T. gondii*.

ii. Chimiosensibilité de *N. caninum*

Comme pour *T. gondii*, la chimiosensibilité de *N. caninum* aux extraits d'essences à 100 µg/mL a été évaluée par screening après 72 heures d'incubation (**Figure 81**).

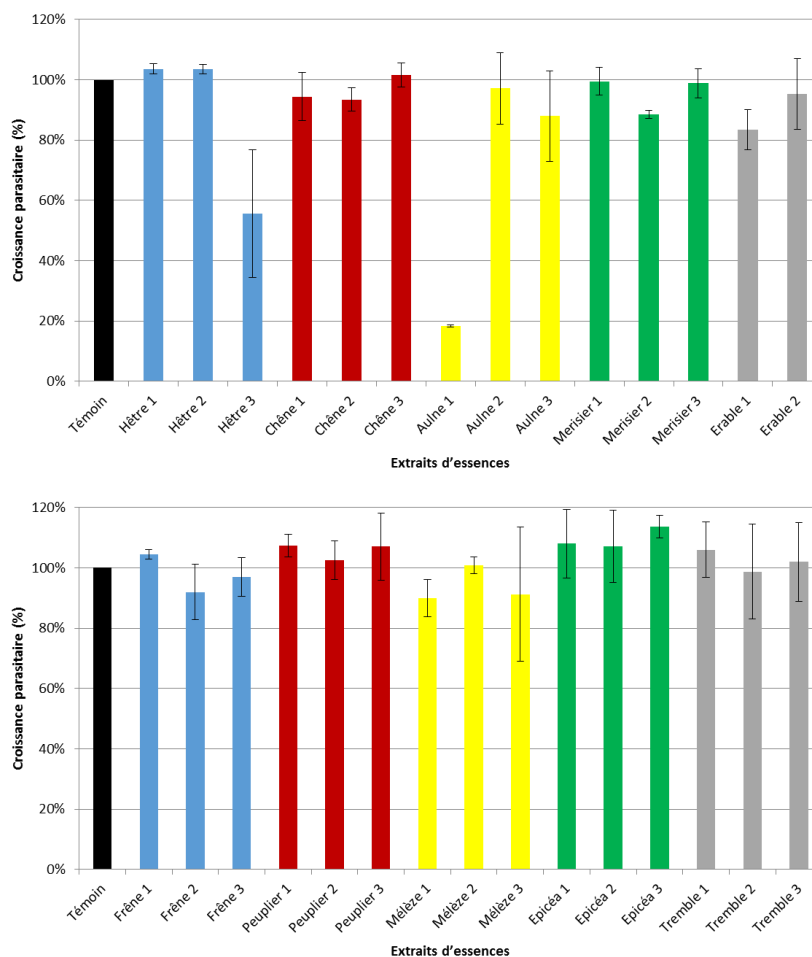


Figure 81. Chimiosensibilité de *N. caninum* à des extraits d'essences de la région Champagne-Ardenne évaluée par screening sur des tachyzoïtes de la souche NC1 à 100 µg/mL. L'extrait *n*-heptane est noté « 1 », l'extrait méthanol est noté « 2 » et l'extrait méthanol/eau 50/50 (v/v) est noté « 3 ».

De façon intéressante, l'extrait *n*-heptane d'aulne a également présenté une activité anti-*N. caninum* à 100 µg/mL. Cet extrait a été retenu pour la suite des expérimentations sur *T. gondii* et *N. caninum*.

2) Détermination de la CC_{50} et de la CI_{50} des extraits actifs sur *T. gondii*

a. Détermination de la CC_{50}

Dans un premier temps, les CC_{50} des extraits *n*-heptane de l'aulne et du mélèze ont été évaluées sur cellules Vero pendant 72 heures, à des concentrations allant de 0 à 100 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats sont présentés dans la **Figure 82**.

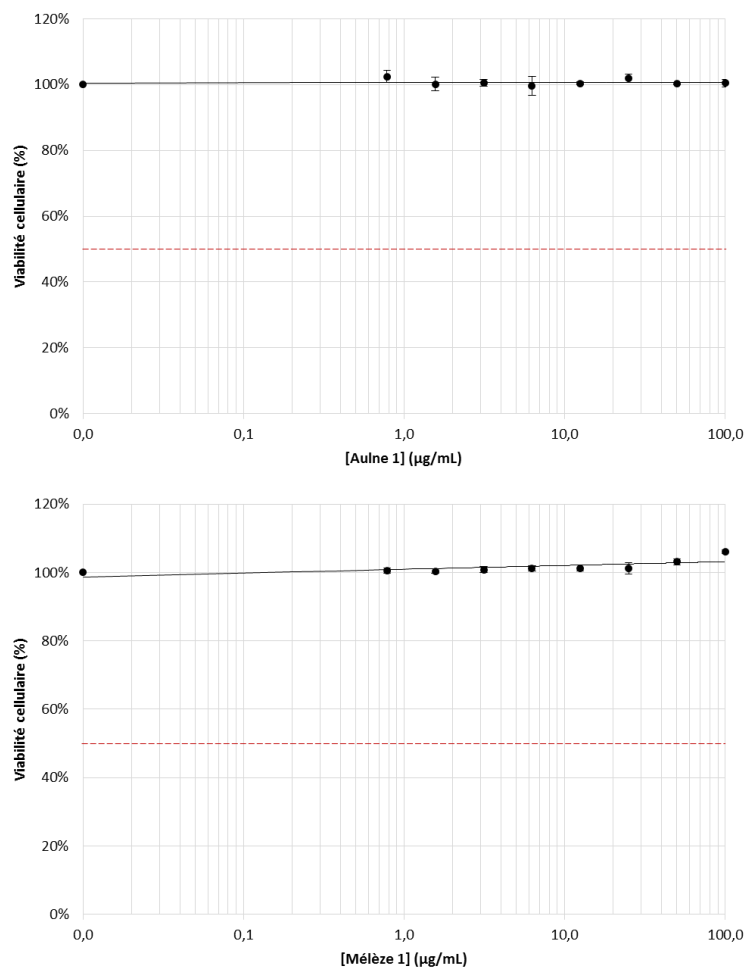


Figure 82. Cytotoxicité des extraits *n*-heptane de l'aulne glutineux et du mélèze d'Europe sur cellules Vero après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 100 $\mu\text{g/mL}$.

Dans cette gamme de concentrations, aucune cytotoxicité n'a été induite par les extraits testés. Ces résultats sont donc en accord avec ceux du screening précédent (**Figure 79**). Par conséquent, la CC_{50} n'a pas pu être déterminée dans ce cas.

b. Détermination de la CI_{50}

Dans un second temps, la chimiosensibilité de *T. gondii* a été évaluée dans le but de déterminer les CC_{50} des extraits *n*-heptane d'aulne et de mélèze après 72 heures d'incubation (Figure 83).

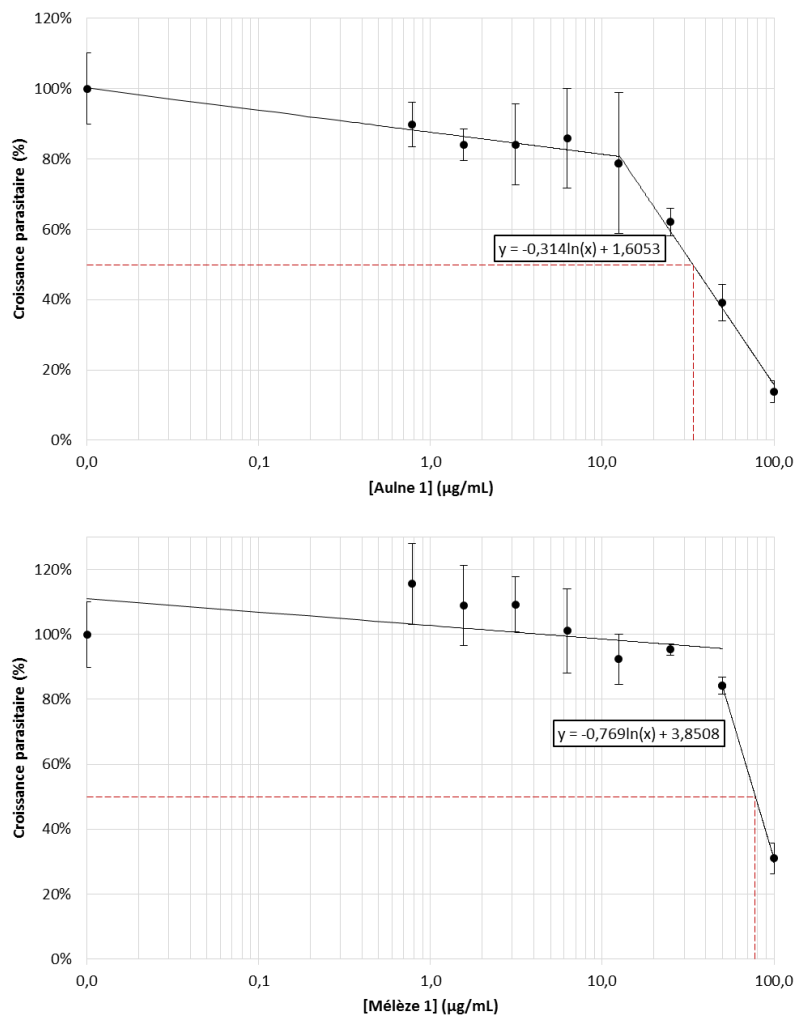


Figure 83. Chimiosensibilité de *T. gondii* à des extraits *n*-heptane de l'aulne glutineux et du mélèze d'Europe sur des tachyzoïtes de la souche RH après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 100 µg/mL.

Les extraits *n*-heptane d'aulne glutineux et de mélèze d'Europe présentent des CI_{50} respectives de $24,07 \pm 13,75$ µg/mL et de $66,67 \pm 16,10$ µg/mL. Ces valeurs de CI_{50} ont été utilisées par la suite pour le calcul des indices de sélectivité des extraits.

3) Détermination de la CC₅₀ et de la CI₅₀ des extraits actifs sur *N. caninum*

c. *Détermination de la CC₅₀*

Dans la mesure où les cellules Vero sont les cellules hôtes utilisées pour la culture de *T. gondii* et de *N. caninum*, les résultats de cytotoxicité de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux sont ceux présentés précédemment (**Figure 82**).

d. *Détermination de la CI₅₀*

Tout comme pour *T. gondii*, la CI₅₀ de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux a été déterminée sur des tachyzoïtes de *N. caninum* à l'aide d'une gamme de concentrations de 0 à 100 µg/mL pendant 72 heures (**Figure 84**).

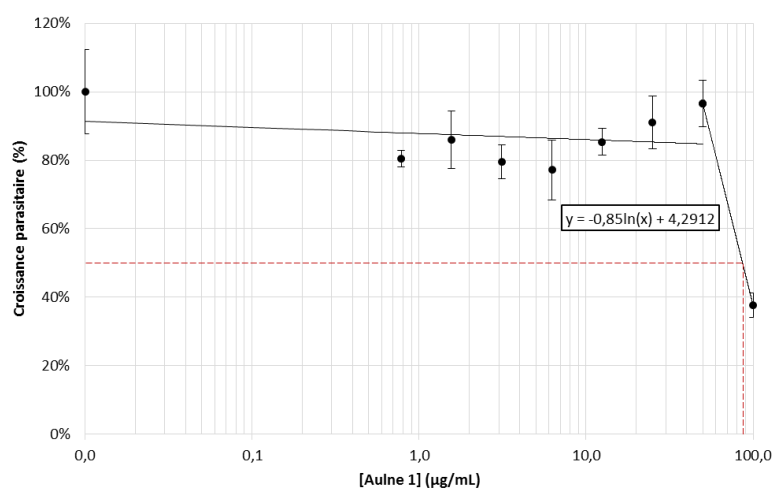


Figure 84. Chimiosensibilité de *N. caninum* à l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche NC1 après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 100 µg/mL.

La CI₅₀ ainsi obtenue est de $89,95 \pm 4,87$ µg/mL. Cette fraction active a donc été fractionnée par EPC en différents extraits.

III) Chimiosensibilité de *T. gondii* et *N. caninum* aux fractions d'extrait d'aulne glutineux obtenues par EPC

1) Fractionnement des extraits *n*-heptane et méthanol d'aulne glutineux

Au vu des résultats obtenus sur *T. gondii* principalement, l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux a été fractionné par CPC. Vingt fractions ont ainsi été isolées avant d'être testées sur les cellules Vero et les parasites pour déterminer leur cytotoxicité et leur activité antiparasitaire.

De même, en prenant en compte les effets antibactériens avérés de l'extrait méthanol d'aulne glutineux (Abedini et al., 2016; Hubert et al., 2016) et la probabilité que s'y trouvent des espèces chimiques communes à l'extrait *n*-heptane, cet extrait méthanol a également été fractionné en 20 fractions qui ont aussi été testées sur les cellules Vero et les parasites.

La totalité de ces 40 fractions a été solubilisée dans le DMSO lors de l'élaboration des gammes de concentrations pour les tests de cytotoxicité et de chimiosensibilité.

2) Evaluation de la cytotoxicité et de la chimiosensibilité par screening

a. *Evaluation de la cytotoxicité*

Comme décrite précédemment, la démarche expérimentale a été initiée par un criblage de la cytotoxicité des fractions de l'extrait *n*-heptane (**Figure 85A**) et de l'extrait méthanol (**Figure 85B**) sur cellules Vero à une concentration de 25 µg/mL après 72 heures d'incubation.

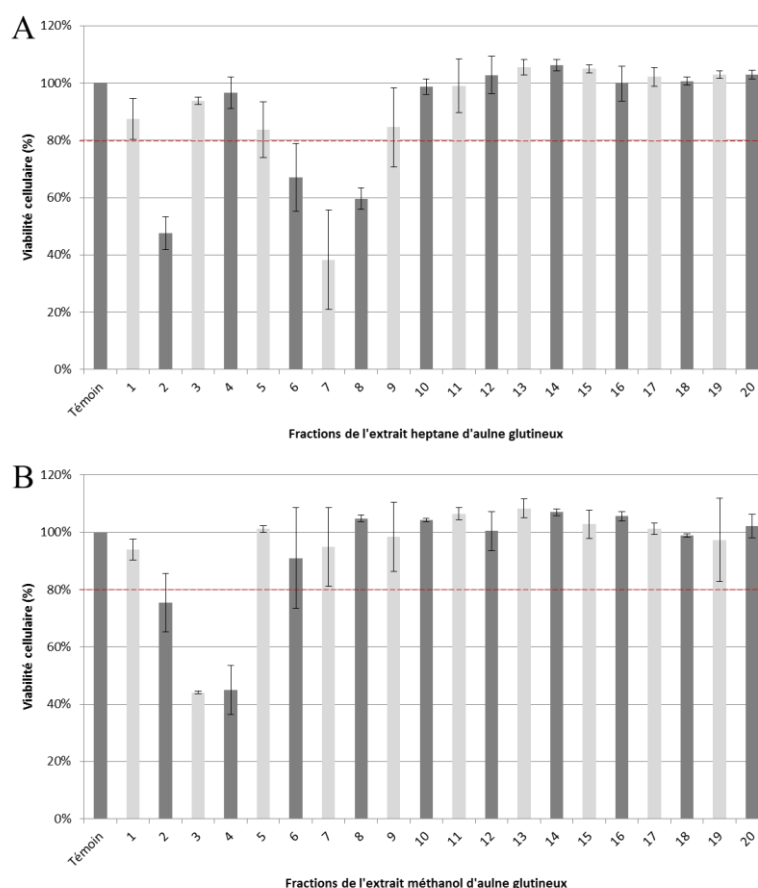


Figure 85. Cytotoxicité des fractions des extraits *n*-heptane et méthanol d'aulne glutineux évaluée par screening sur cellules Vero. Les fractions de l'extrait *n*-heptane (A) et méthanol (B) d'aulne glutineux ont été testées à une concentration de 25 µg/mL pendant 72 heures d'incubation.

Dans le cas de l'extrait *n*-heptane, il en résulte que les fractions 2, 6, 7 et 8 sont cytotoxiques à 25 µg/mL (viabilité cellulaire inférieure à 80%). Pour l'extrait méthanol, les fractions 3 et 4 ont eu un effet cytotoxique important sur les cellules Vero. Par conséquent, ces différentes fractions n'ont pas été retenues pour la suite des expérimentations sur les parasites.

b. Evaluation de la chimiosensibilité de T. gondii et N. caninum par screening

i. Chimiosensibilité de T. gondii

Consécutivement aux données du screening de la cytotoxicité, un second screening a été réalisé afin de déterminer la chimiosensibilité de *T. gondii* aux différentes fractions de l'extrait *n*-heptane (**Figure 86A**) et méthanol (**Figure 86B**) d'aulne glutineux. Les fractions considérées comme cytotoxiques n'ont pas été testées.

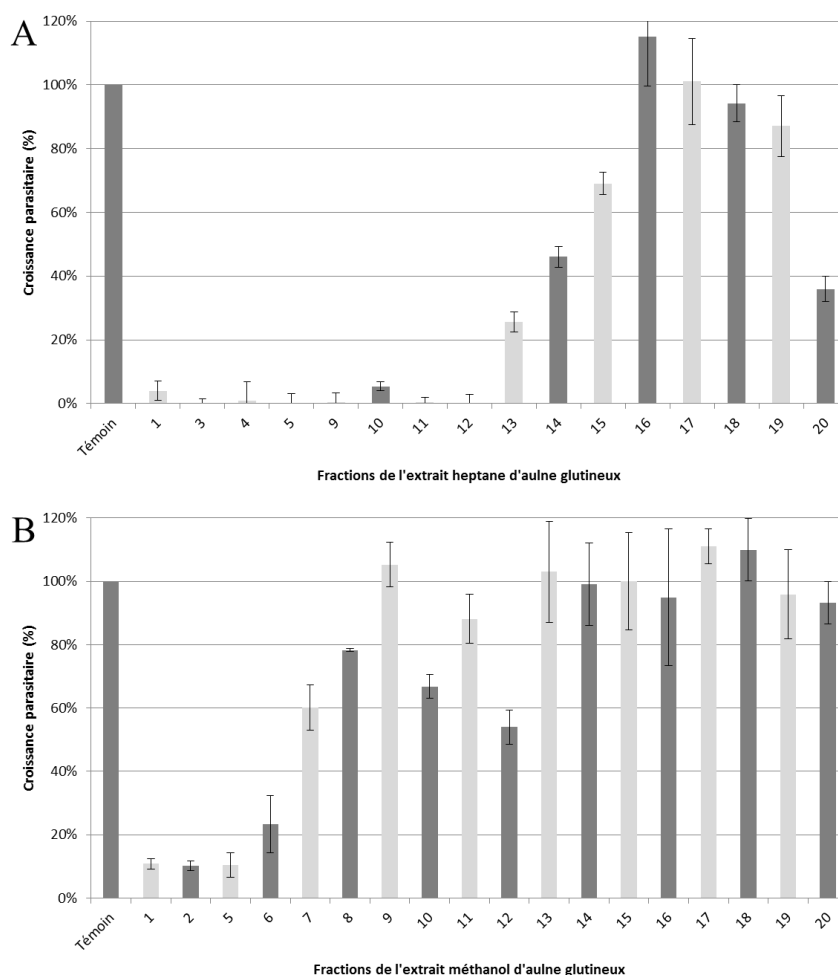


Figure 86. Chimiosensibilité de *T. gondii* aux fractions des extraits *n*-heptane et méthanol d'aulne glutineux évaluée par screening. Les fractions de l'extrait *n*-heptane (A) et méthanol (B) d'aulne glutineux ont été testées à une concentration de 25 µg/mL pendant 72 heures d'incubation.

Ainsi, pour l'extrait *n*-heptane, les fractions 1, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14 et 20 ont eu un effet anti-*T. gondii* significatif. Dans le cas de l'extrait méthanol, les fractions 1, 2, 5 et 6 se sont montrées actives contre ce parasite.

Ces fractions actives ont été retenues pour la détermination de leurs CI₅₀ respectives sur *T. gondii* dans la suite de cette étude.

ii. Chimiosensibilité de *N. caninum*

De la même façon que pour *T. gondii*, la chimiosensibilité de *N. caninum* aux différentes fractions des deux extraits d'aulne glutineux a été évaluée par screening. Les fractions de l'extrait *n*-heptane (**Figure 87A**) et de l'extrait méthanol (**Figure 87B**) ont été testées pendant 72 heures à une concentration de 25 µg/mL.

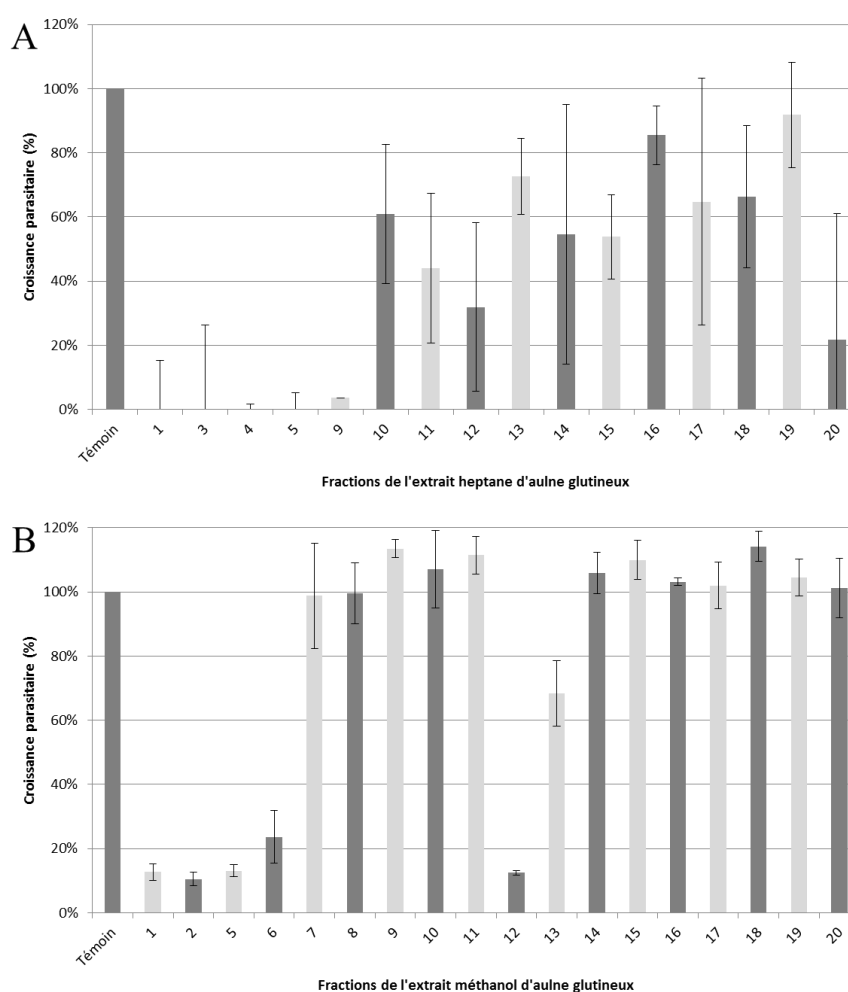


Figure 87. Chimiosensibilité de *N. caninum* aux fractions des extraits *n*-heptane et méthanol d'aulne glutineux évaluée par screening. Les fractions de l'extrait *n*-heptane (A) et méthanol (B) d'aulne glutineux ont été testées à une concentration de 25 µg/mL pendant 72 heures d'incubation.

Ainsi, pour l'extrait *n*-heptane, les fractions 1, 3, 4, 5, 9, 11, 12 et 20 ont eu un effet anti-*N. caninum* significatif d'après ces résultats mais aussi d'après les observations microscopiques réalisées conjointement au dosage ELISA. Dans le cas de l'extrait méthanol, les fractions 1, 2, 5, 6 et 12 ont été capables d'inhiber la croissance de ce parasite.

3) Détermination des CC₅₀ et des CI₅₀

a. Détermination de la CC₅₀

Pour chacune des fractions actives sur *T. gondii* ou *N. caninum*, la CC₅₀ a été évaluée après 72 heures d'incubation à l'aide d'une gamme de concentrations de 0 à 100 µg/mL pour les fractions de l'extrait *n*-heptane (**Figure 88**), et de 0 à 40 µg/mL pour les fractions de l'extrait méthanol (données non montrées).

Les fractions 13, 14 et 20 n'ont pas induit de cytotoxicité sur les cellules Vero pour la gamme de concentrations testées. De ce fait, leurs CC₅₀ respectives n'ont pas pu être déterminées. A l'inverse, les CC₅₀ des fractions 1, 3, 4, 5, 9, 10, 11 et 12 sont de l'ordre de 62,03 µg/mL, 58,23 µg/mL, 42,93 µg/mL, 44,76 µg/mL, 54,41 µg/mL, 102,01 µg/mL (extrapolée d'après la courbe de tendance), 148,48 µg/mL (extrapolée d'après la courbe de tendance) et 58,47 µg/mL, respectivement. Ces valeurs ont été utilisées par la suite pour calculer les indices de sélectivité correspondants.

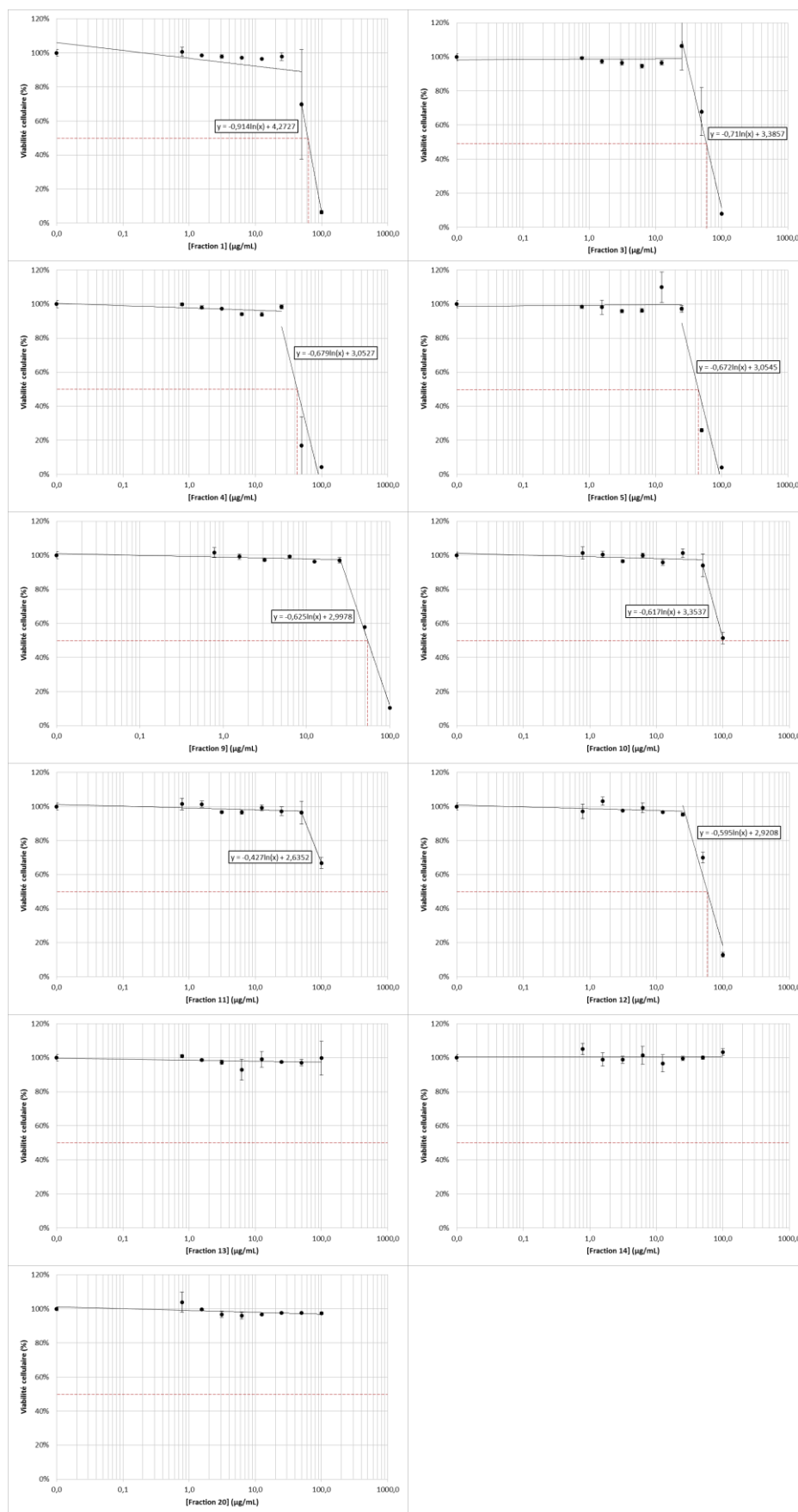


Figure 88. Cytotoxicité des fractions de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux sur cellules Vero après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 100 µg/mL.

b. Détermination de la CI_{50} *i. Chimiosensibilité de *T. gondii**

Chacune des fractions actives isolées à partir des extraits *n*-heptane (**Figure 89**) et méthanol (**Figure 90**) d'aulne glutineux ont été testées sur *T. gondii* afin d'en déterminer les CI_{50} .

Dans le cas des de l'extrait *n*-heptane, les fractions 1, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14 et 20 ont présenté des CI_{50} respectives de l'ordre de $7,24 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$, $3,31 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$, $2,64 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$, $3,85 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$, $6,25 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$, $7,11 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$, $6,21 \pm 1,77 \mu\text{g/mL}$, $2,95 \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$, $13,51 \pm 4,34 \mu\text{g/mL}$, $21,50 \pm 7,08 \mu\text{g/mL}$ et $25,08 \pm 4,63 \mu\text{g/mL}$ (extrapolée d'après la courbe de tendance).

En ce qui concerne l'extrait méthanol, les CI_{50} respectives des fractions 1, 2, 5 et 6 ont été déterminées comme étant égales à $3,10 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$, $3,50 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$, $4,86 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$ et $11,20 \pm 2,50 \mu\text{g/mL}$.

De façon intéressante, toutes les fractions de l'extrait *n*-heptane (sauf 14, 15 et 20) et toutes les fractions de l'extrait méthanol ont permis d'inhiber totalement la croissance parasitaire. Ces résultats ont été confirmés microscopiquement (données non montrées).

Ces valeurs de CI_{50} ont été utilisées pour le calcul des indices de sélectivité des différentes fractions.

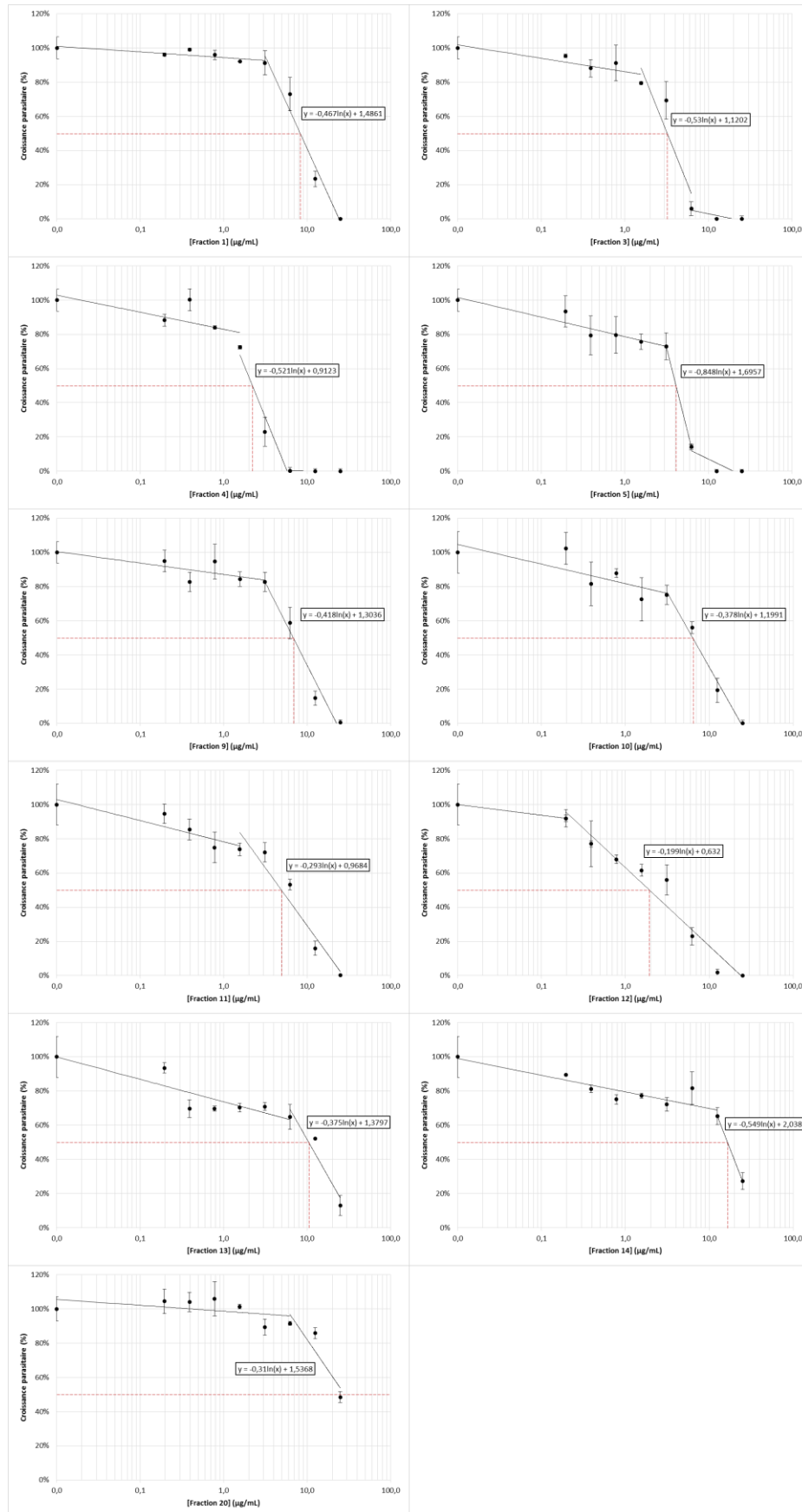


Figure 89. Chimosensibilité de *T. gondii* aux fractions de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche RH après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 25 µg/mL.

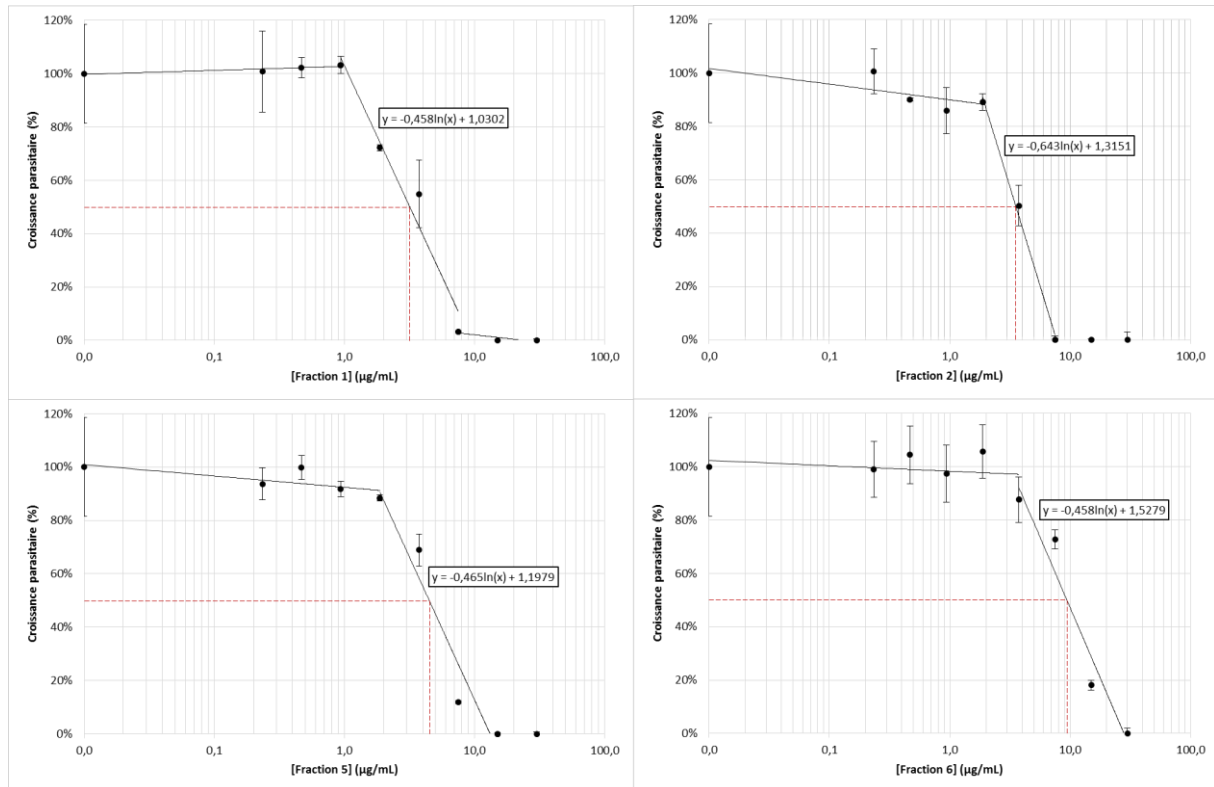


Figure 90. Chimiosensibilité de *T. gondii* aux fractions de l'extrait méthanol d'aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche RH après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 30 µg/mL.

ii. Chimiosensibilité de *N. caninum*

Comme précédemment pour *T. gondii*, les CI_{50} des fractions actives ont été déterminées sur *N. caninum*. Les fractions de l'extrait *n*-heptane (**Figure 91**) et de l'extrait méthanol (**Figure 92**) ont été testées à des gammes de concentrations de 0 à 25 µg/mL et de 0 à 30 µg/mL, respectivement.

Dans le cas des de l'extrait *n*-heptane, les fractions 1, 3, 4, 5, 9, 11 et 12 ont présenté des CI_{50} respectives de l'ordre de 20,05 µg/mL, 9,33 µg/mL, 8,70 µg/mL, 8,08 µg/mL, 25,39 µg/mL (extrapolée d'après la courbe de tendance), 26,61 µg/mL (extrapolée d'après la courbe de tendance) et 14,58 µg/mL. A l'inverse, la fraction 20 n'a pas eu d'activité antiparasitaire vis-à-vis de *N. caninum*.

En ce qui concerne l'extrait méthanol, l'effet antiparasitaire s'est avéré relativement faible puisque la CI_{50} de chaque fraction n'a pas été atteinte aux concentrations testées. De ce fait, les IS correspondants ne pourront être que théoriques.

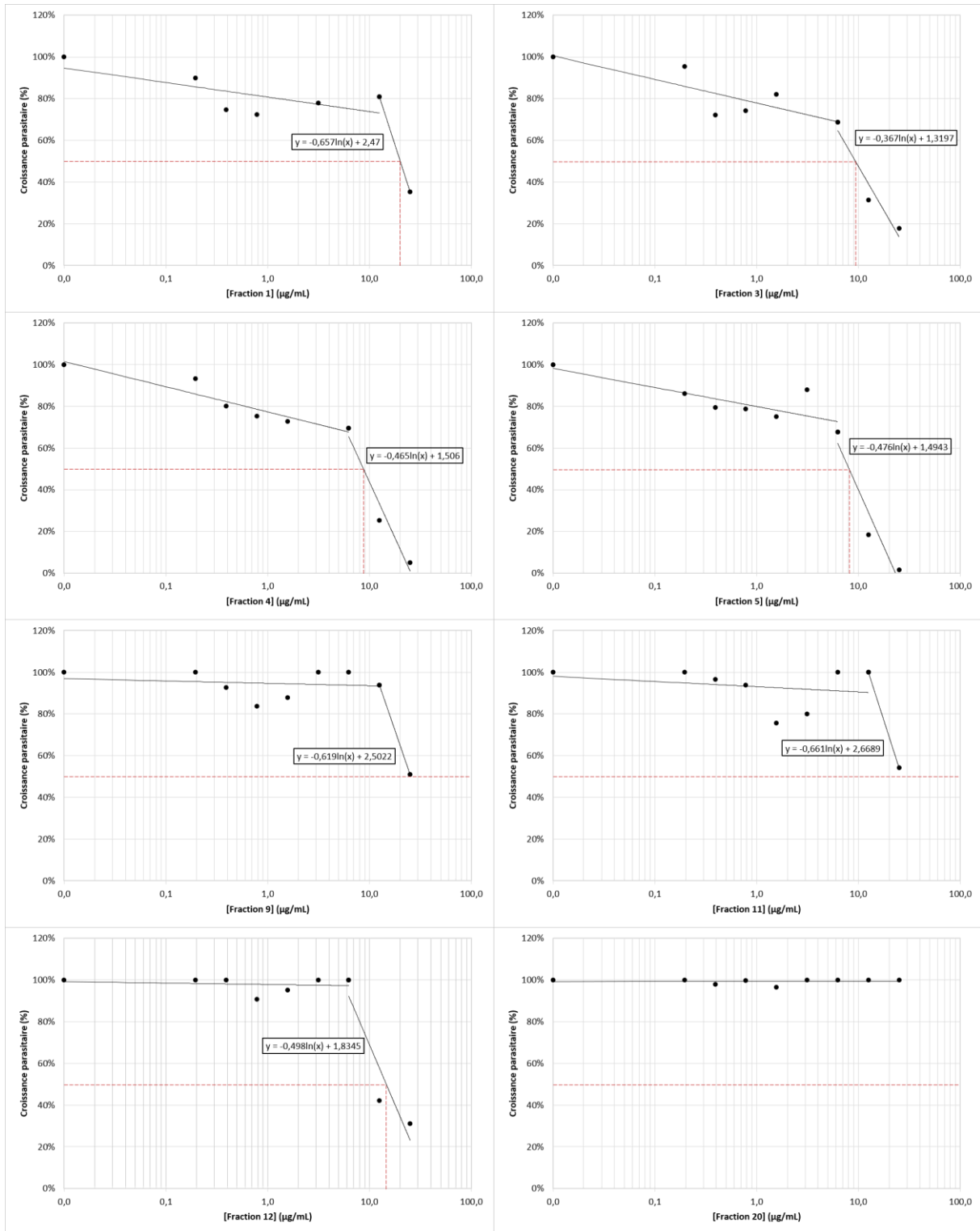


Figure 91. Chimosensibilité de *N. caninum* aux fractions de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche NC1 après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 25 µg/mL.

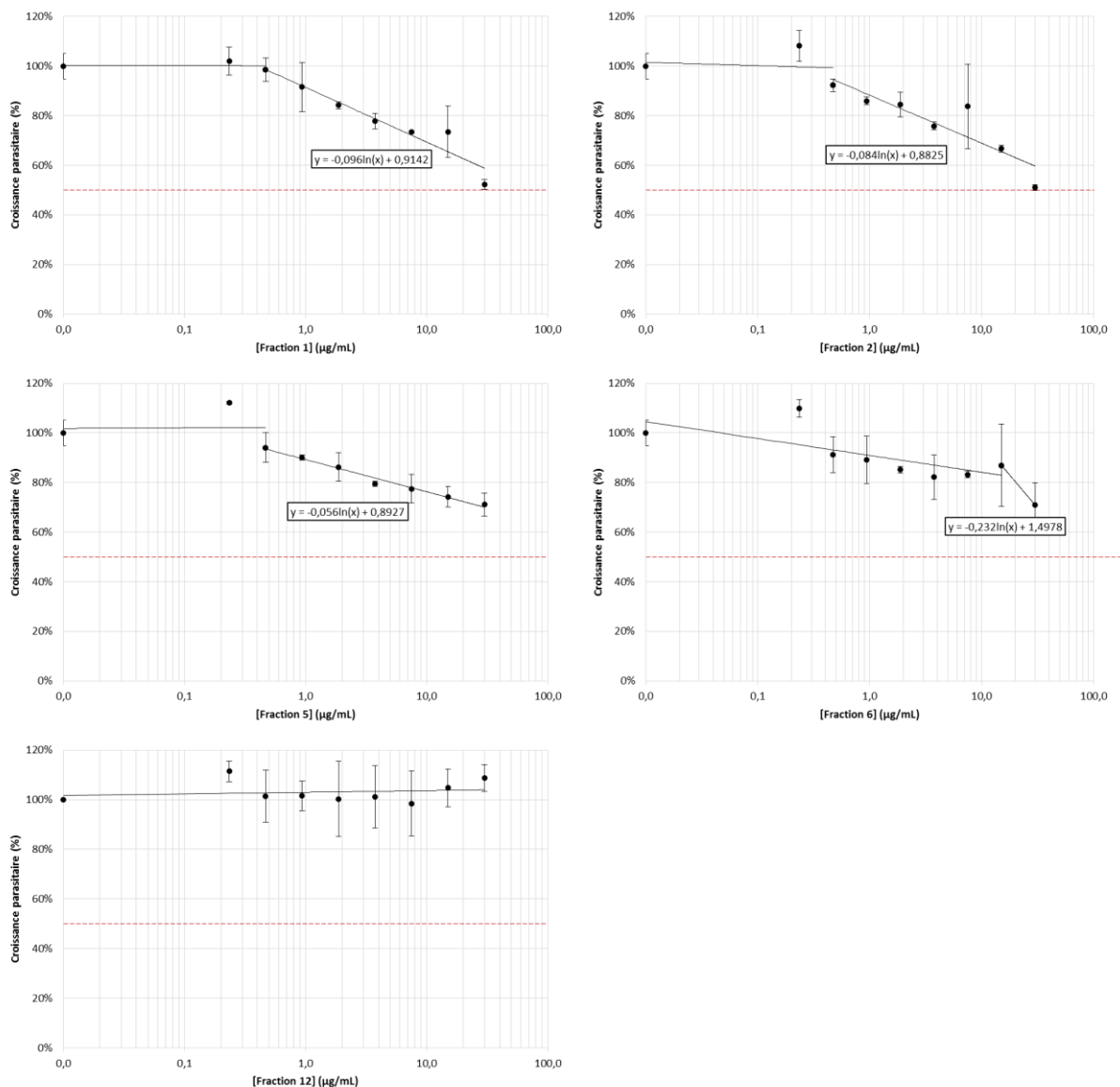


Figure 92. Chimosensibilité de *N. caninum* aux fractions de l'extrait méthanol d'aulne glutineux sur des tachyzoïtes la souche NC1 après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 30 µg/mL.

4) Indices de sélectivité

Suite à ces résultats, l'IS a été calculé pour chaque fraction active sur les parasites. Ces données, ainsi que les résultats précédents des CC_{50} et CI_{50} , sont présentées dans le **Tableau XV**.

Ainsi, toutes les fractions considérées comme actives d'après le criblage sont sélectives ($IS > 4$) ou modérément sélectives ($4 > IS > 2$), sauf dans le cas de *N. caninum* vis-à-vis des fractions issues de l'extrait méthanol d'aulne glutineux. En effet, il s'avère que ces fractions n'ont pas d'effet sélectif contre ce parasite ($IS < 2$).

Tableau XV. Indices de sélectivité des fractions actives issues des extraits *n*-heptane et méthanol d'aulne glutineux.

Extraits d'aulne glutineux testés	Fractions testées	CC ₅₀ cellules Vero (µg/mL)	CI ₅₀ <i>T. gondii</i> (µg/mL)	Indice de sélectivité <i>T. gondii</i>	CI ₅₀ <i>N. caninum</i> (µg/mL)	Indice de sélectivité <i>N. caninum</i>
Heptane	1	62,03	7,24 ± 1,45	8,57	20,05	3,09
	3	58,23	3,31 ± 0,12	17,62	9,33	6,24
	4	42,93	2,64 ± 0,61	16,26	8,70	4,93
	5	44,76	3,85 ± 0,36	11,64	8,08	5,54
	9	54,41	6,25 ± 0,83	8,71	25,39	2,14
	10	102,01	7,11 ± 1,06	14,35	Inactif	
	11	148,48	6,21 ± 1,77	23,93	26,61	5,58
	12	58,47	2,95 ± 1,42	19,85	14,58	4,01
	13	> 100	13,51 ± 4,34	> 7,40	Inactif	
	14	> 100	21,50 ± 7,08	> 4,65	Inactif	
	20	> 100	25,08 ± 4,63	> 3,99	> 30	> 3,33
Méthanol	1	> 40	3,10 ± 0,11	> 12,89	> 30	< 2
	2	> 40	3,50 ± 0,07	> 11,43	> 30	< 2
	5	> 40	4,86 ± 0,54	> 8,23	> 30	< 2
	6	> 40	11,20 ± 2,50	> 3,57	> 30	< 2
	12	> 40	Inactif		> 30	< 2

IV) Caractérisation chimique des fractions actives et identification des composés responsables de l'activité antiparasitaire

1) Fractions actives de l'extrait *n*-heptane

La caractérisation chimique des fractions actives isolées à partir de l'extrait *n*-heptane a été réalisée suite aux résultats obtenus dans cette étude. Les différentes espèces chimiques ainsi identifiées sont présentées dans la **Figure 93**.

Les fractions 1 à 5 (clusters 3, 8 et 8'), qui sont les plus actives vis-à-vis de *T. gondii* et *N. caninum*, comportent essentiellement de la bétuline et un dérivé, le bétulinaldéhyde. Du fait de leur cytotoxicité, la fraction 6 n'a pas été caractérisée tandis que la fraction 7 (cluster 5) l'a été partiellement : elle est en effet majoritairement composée de lupéol. La fraction 8 (cluster 6) comprend essentiellement du glutinol. Les fractions 9, 10 et 11 (clusters 4, 4' et 7) sont composées de β-sitosténone et de 3-*O*-acétylbétulinaldéhyde dans le cas de la fraction 9. Les fractions 12, 13, 14 et 15 (clusters 1 et 2) sont composées de lupénone (fractions 12 et 13) et d'alnusénone (fractions 13, 14 et 15). Enfin, les fractions d'extrusion 16 à 20 comportent des acides gras et diarylhéptanoïdes (fraction 16) et de l'alnusénone (fractions 17 à 20).

Les composés chimiques responsables de l'activité antiparasitaire mise en évidence chez *T. gondii* et *N. caninum* sont donc essentiellement la bétuline et des dérivés, le β-sitosténone, le lupénone et l'alnusénone. Il est intéressant de souligner que ces différents composés chimiques

appartiennent tous à la famille des triterpènes, sauf le β -sitosténone, au sein de laquelle se trouve également la trachélospérogénine E mise en évidence précédemment chez *A. leiocarpus*.

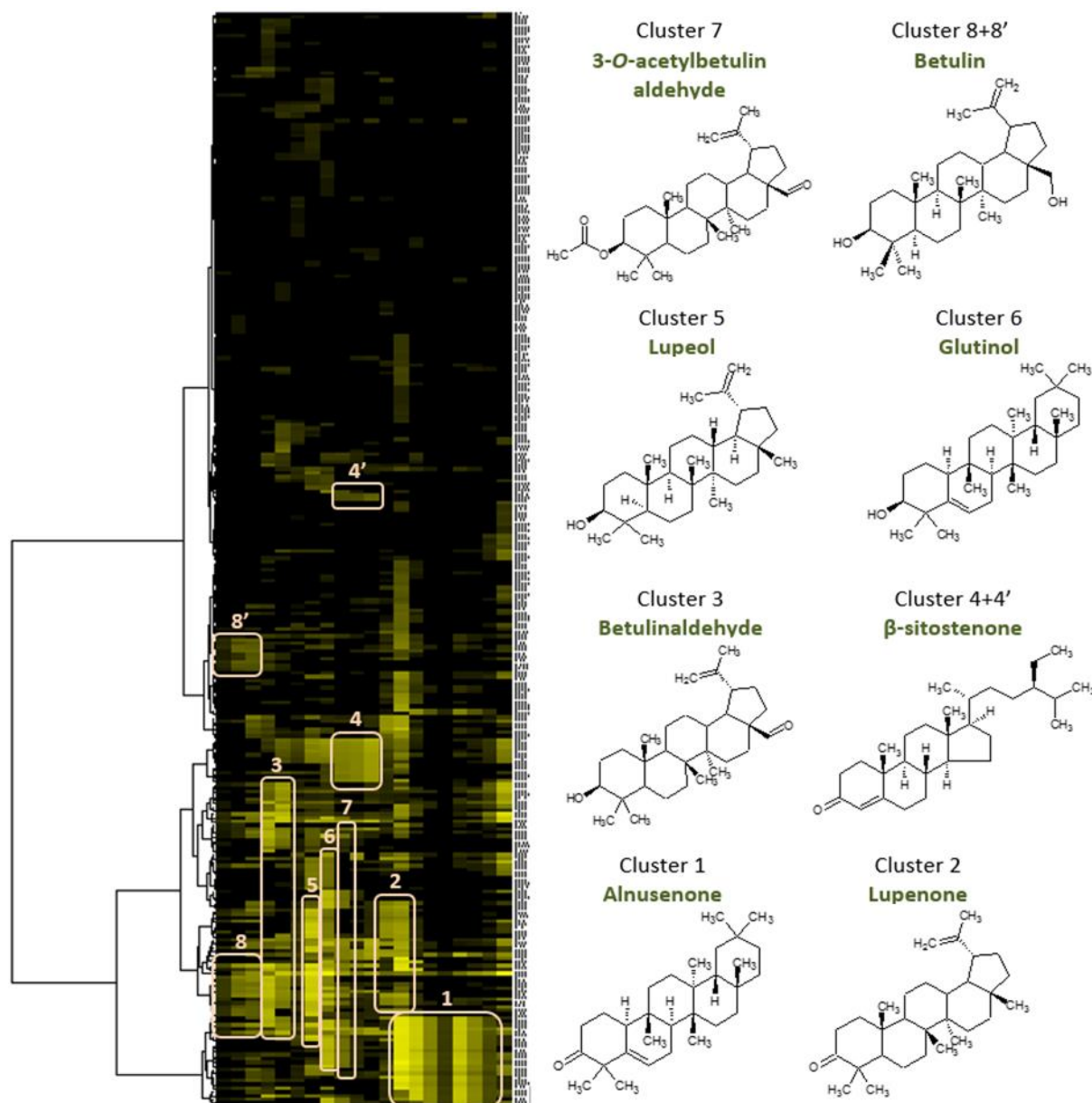


Figure 93. Identification des différents groupes ou clusters chimiques par RMN sur les fractions de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux.

2) Fractions actives de l'extrait méthanol

La caractérisation chimique des fractions actives isolées à partir de l'extrait méthanol a été réalisée parallèlement à cette étude (Abedini et al., 2016). Les différentes espèces chimiques ainsi identifiées sont présentées dans la **Figure 94**.

D'après ces données, les fractions 1 à 6, comprises dans le cluster 2, sont majoritairement composées d'acide bétulinique. Celui-ci est un triterpène, au même titre que la

trachélospérogénine E précédemment isolée à partir de l'écorce d'*A. leiocarpus*. Les fractions 8 à 15, comprises dans le cluster 1, sont majoritairement composées d'orégoneine. Il s'agit d'un diarylheptanoïde retrouvé dans les plantes du genre *Alnus*. Il paraît donc plausible que l'activité antiparasitaire mise en évidence chez *T. gondii* soit due à l'acide bétulinique. Il en est de même pour *N. caninum* bien que cette activité ne soit pas sélective à première vue.

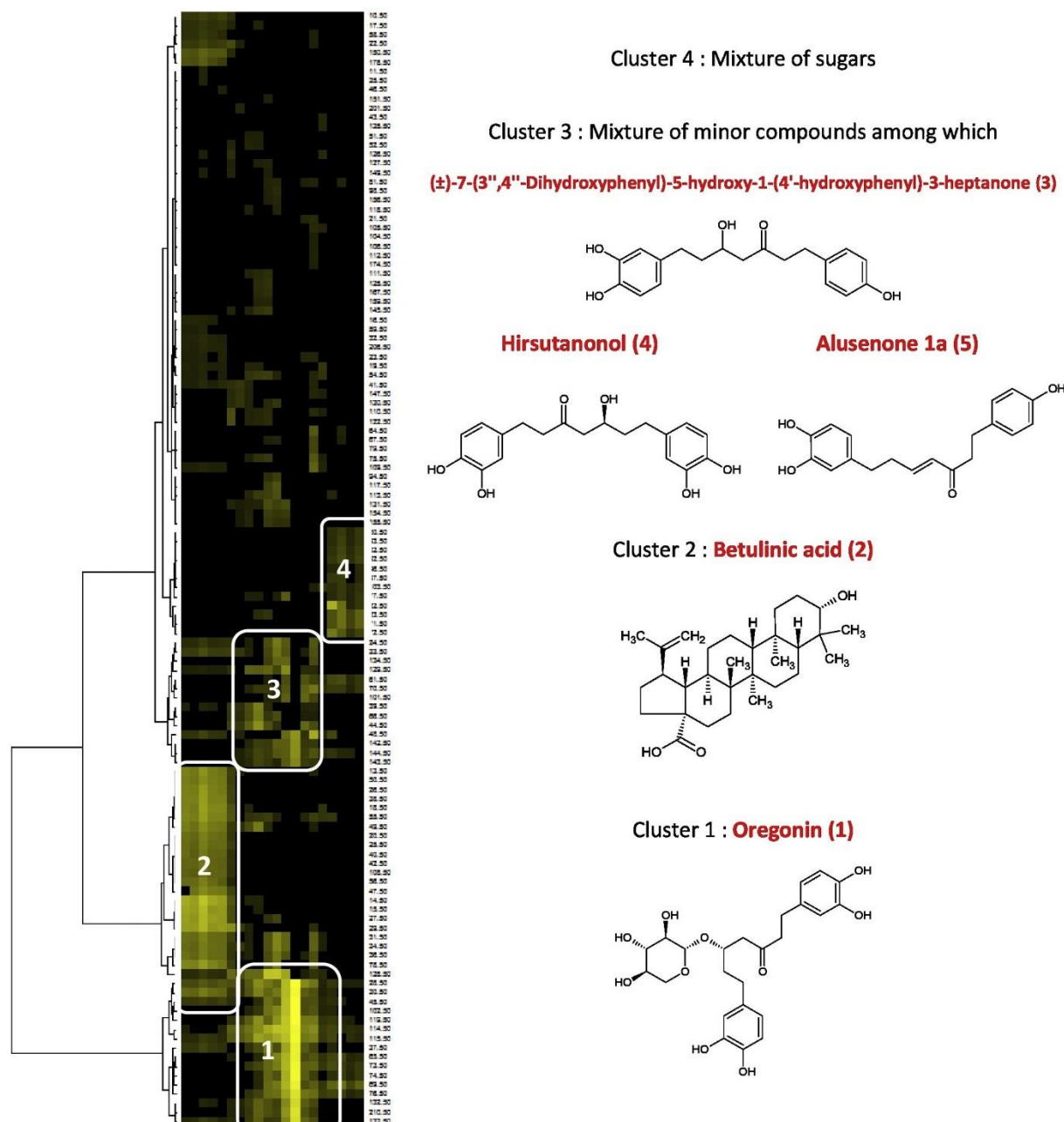


Figure 94. Identification des différents groupes ou clusters chimiques par RMN sur les fractions de l'extrait méthanol d'aulne glutineux (Abedini et al., 2016).

De par la présence de l'acide bétulinique au sein de différentes fractions des extraits *n*-heptane d'aulne glutineux, l'un de ses dérivés, l'acide bétulinique (Sigma, France), a été testé pur sur *T. gondii* en comparaison avec la fraction 1 de l'extrait méthanol.

Dans le cas de la fraction 1 de l'extrait méthanol, la CI_{50} moyenne obtenue est de $3,10 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$. Pour l'acide bétulinique, la CI_{50} moyenne est de $6,78 \pm 4,83 \mu\text{g/mL}$. Il apparaît donc que ces deux activités antiparasitaires soient similaires. L'acide bétulinique, et *a fortiori* la bétuline et ses dérivés, semble donc bel et bien responsable de l'activité antiparasitaire observée vis-à-vis de *T. gondii* et *N. caninum* lors d'un traitement par les fractions issues des extraits *n*-heptane et méthanol.

V) Bilan des résultats

L'ensemble des résultats obtenus pour cette partie de l'étude a été regroupé sous forme d'un schéma récapitulatif (**Figure 95**).

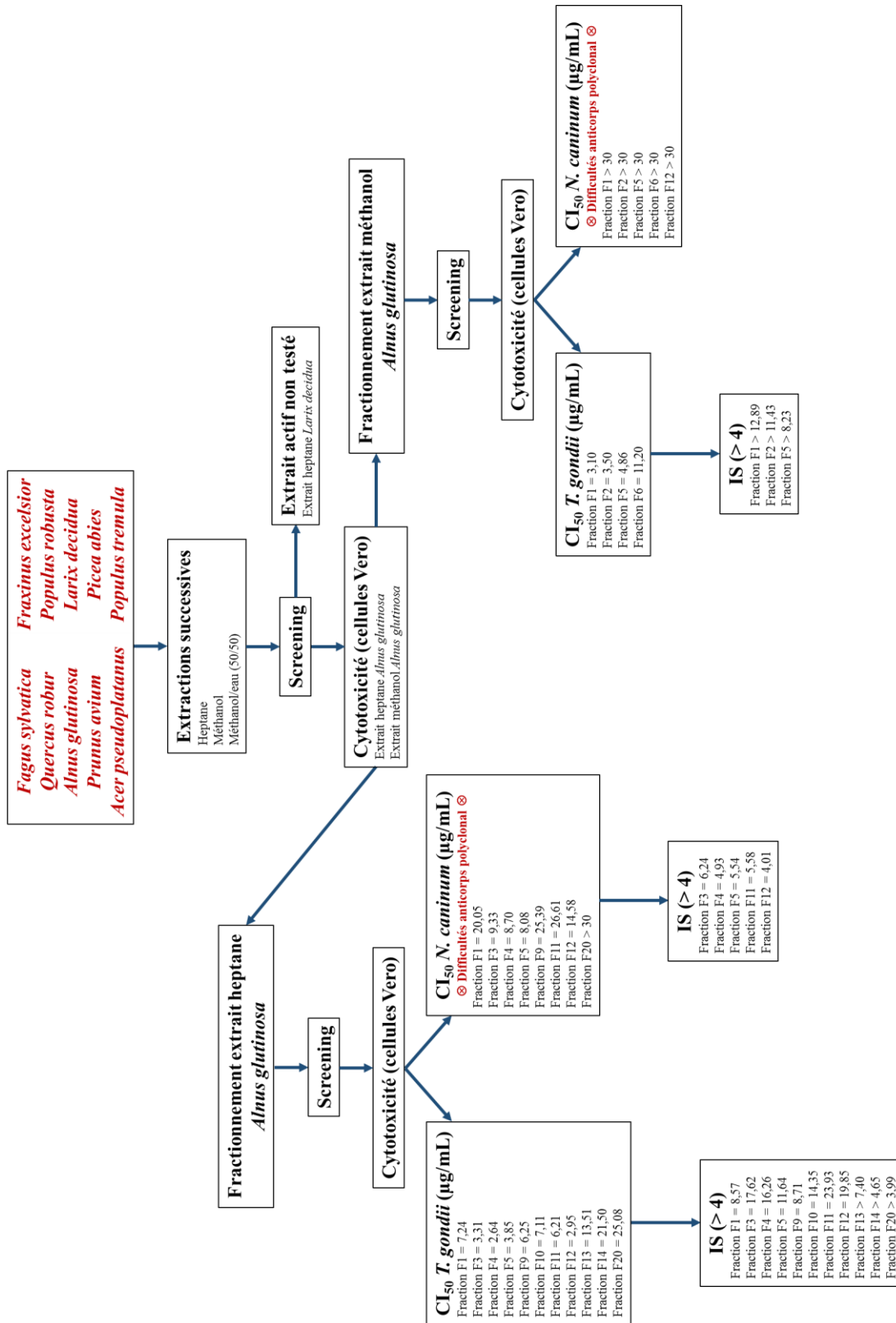


Figure 95. Bilan des résultats de l'étude portant sur l'activité antiparasitaire des extraits et fractions issus des écorces d'arbres de la région Champagne-Ardenne.

VI) Conclusion et discussion

Cette partie de l'étude avait pour objectif de mettre en application l'outil de criblage moléculaire initialement mis en place dans la partie précédente. Pour ce faire, un panel d'extraits et de fractions isolés par CPC à partir d'écorces d'arbres de la région Champagne-Ardenne a été criblé sur *T. gondii* et *N. caninum*. De plus, cet objectif revêt un intérêt écolo-économique par la valorisation des sous-produits de la filière-bois qui ne sont pas utilisés par l'industrie.

Tout d'abord, l'outil de criblage des extraits d'écorces a pu mettre en évidence l'effet antiparasitaire des extraits *n*-heptane d'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) et de mélèze d'Europe (*Larix decidua*) sur *T. gondii* et de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux sur *N. caninum* au cours d'un criblage préalable des différents extraits d'écorces à disposition. Malgré cette efficacité, toute fois inférieure à celle de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux, l'extrait *n*-heptane du mélèze d'Europe n'a pas été exploité dans la suite de l'étude. Il serait donc intéressant de creuser plus avant l'efficacité antiparasitaire de cet extrait, d'autant plus que l'écorce du mélèze d'Europe présente des propriétés antifongiques et antibactériennes prometteuses (Salem et al., 2016).

A l'inverse, et ce malgré l'absence d'effet antiparasitaire lors du criblage préliminaire, l'extrait méthanol d'aulne glutineux a été retenu pour la suite de l'étude. En effet, des espèces chimiques présentes dans l'extrait *n*-heptane peuvent se retrouver également dans l'extrait méthanol, notamment des triterpènes. De plus, conjointement à la présente étude, il a été démontré par l'équipe de l'ICMR que l'extrait méthanol présente une activité antibactérienne significative vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (Abedini et al., 2016). L'extrait aqueux d'écorce d'aulne glutineux est également actif contre *Pseudomonas aeruginosa* (Dahija et al., 2016). Nous avons donc choisi d'élargir le panel de pathogènes cibles pour tester l'efficacité de ces extraits sur des parasites protozoaires tels que *T. gondii* et *N. caninum*.

Le fractionnement des deux extraits d'aulne glutineux (*n*-heptane et méthanol) par CPC a abouti à l'obtention de 40 fractions, à raison de 20 par extrait. Toutes ces fractions ont été criblées sur cellules Vero et les deux modèles parasitaires afin d'en déterminer, respectivement, la cytotoxicité et l'efficacité antiparasitaire.

En ce qui concerne les 20 fractions de l'extrait *n*-heptane, quatre ont montré un effet cytotoxique significatif sur cellules Vero et n'ont pas été retenues par la suite. Parmi les 16

fractions restantes, 11 ont présenté une activité anti-*T. gondii* intéressante lors du criblage. Cette activité antiparasitaire a été confirmée lors de la détermination des CI_{50} et le calcul des indices de sélectivité, puisque ces 11 fractions ont effectivement un effet anti-*T. gondii* significatif. Dans le cas de *N. caninum*, le criblage a permis d'identifier huit fractions actives parmi les 16 initialement retenues. Chacune de ces huit fractions est également active contre *T. gondii*. Comme pour ce dernier, la détermination des CI_{50} et le calcul des indices de sélectivité ont confirmé que l'activité anti-*N. caninum* de ces huit fractions était significative.

Pour les 20 fractions de l'extrait méthanol, deux se sont révélées être cytotoxiques pour les cellules Vero et ont été éliminées pour le criblage sur les parasites. Parmi les 18 fractions restantes, quatre ont présenté une activité anti-*T. gondii* prometteuse. De même que précédemment, la sélectivité cette dernière a été confirmée pour chacune des quatre fractions vis-à-vis de *T. gondii*. Pour *N. caninum*, cinq fractions (dont les quatre sélectivement actives contre *T. gondii*) ont eu une activité contre ce parasite. En revanche, suite à la détermination des CI_{50} et du calcul des indices de sélectivité, il s'est avéré que les cinq fractions supposément anti-*N. caninum* n'étaient pas sélectives.

Toutefois, il est à noter que les tests sur *N. caninum* n'ont été réalisés qu'une seule fois à cause des difficultés précédemment évoquées à propos du dosage ELISA et de l'anticorps polyclonal. De plus, il est également important de souligner ici que les résultats de la détermination des CI_{50} des fractions de l'extrait méthanol sont en contradiction avec le criblage préliminaire réalisé en amont. En effet, les valeurs d'absorbance obtenues suite au dosage ELISA pour les CI_{50} étaient supérieures à celles obtenues dans le cas du criblage pour une concentration donnée. Il serait donc judicieux de réitérer ces expérimentations afin d'affiner les résultats obtenus et de déterminer si l'activité anti-*N. caninum* des fractions de l'extrait méthanol d'aulne glutineux est bel et bien sélective ou non.

Suite à l'identification des fractions actives, leur caractérisation chimique a été réalisée par ^{13}C RMN.

Concernant les fractions isolées à partir de l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux, il apparaît que toutes les fractions sélectivement actives contiennent majoritairement des triterpènes. En effet, plusieurs de ces composés ont été caractérisés : la bétuline et des dérivés, le lupénone et l'alnusenone. Le β -sitosténone, quant à lui, est un stérol et n'appartient pas à la famille des triterpènes. Dans le cas des fractions issues de l'extrait méthanol, chaque fraction sélectivement active contient également un triterpène majoritaire : l'acide bétulinique. Comme son nom l'indique, il s'agit d'un dérivé de la bétuline.

Ces données indiquent donc que ce sont les fractions les plus apolaires qui sont les plus actives. Cela s'explique par le fait que l'effet antiparasitaire des extraits d'écorce d'aulne glutineux mis évidence chez *T. gondii* et *N. caninum* est induit par les triterpènes, qui sont peu polaires, comme cela a été décrit précédemment dans le cas d'*A. leiocarpus*. Ces observations sont à mettre en parallèle avec les études antérieures qui s'attardent également sur l'activité antiparasitaire des triterpènes. En effet, l'acide bétulinique est une molécule aux propriétés anti-inflammatoires, anti-tumorales, anti-angiogéniques et antivirales (Zofou et al., 2013). Ce triterpène et ses dérivés possèdent également des propriétés antipaludiques *in vitro* et *in vivo* (de Sá et al., 2009). Le lupénone, quant à lui, est capable d'induire un effet synergique contre *Trypanosoma cruzi* lorsqu'il est couplé à l'oxyde de caryophyllène (Polanco-Hernández et al., 2013). De plus, il a été démontré que des dérivés semi-synthétiques de triterpènes étaient capables d'inhiber *in vitro* la croissance de *Leishmania infantum* et de *T. cruzi* (Bossolani et al., 2017; Mazoir et al., 2011). Un autre triterpène d'origine naturelle, l'acide maslinique, possède une activité parasitostatique vis-à-vis de certains parasites du phylum des Apicomplexa, tels que *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Neospora* et *Plasmodium* (Moneriz et al., 2011). Des triterpènes pentacycliques ont également été mis en évidence pour leur activité antiparasitaire contre *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* ainsi que certains nématodes (Isah et al., 2016).

L'outil de criblage moléculaire mis au point et évoqué lors de la partie précédente a donc permis de découvrir différentes fractions actives issues de l'aulne glutineux. Bien que les limites évoquées précédemment, concernant le dosage ELISA dans le cas de *N. caninum*, aient également été d'actualité dans cette troisième partie, la méthodologie appliquée a permis la découverte de nouveaux composés actifs contre *T. gondii* et *N. caninum*, principalement des triterpènes. Ces résultats encourageants offrent donc la possibilité de valoriser des sous-produits de la filière bois, problématique écolo-économique dont l'importance ne fait que croître, tout en confortant la création et, à terme, l'exploitation de cet outil de criblage moléculaire.

Partie III : Screening de la Pathogen Box sur *T. gondii* et *N. caninum*

I) Chimiosensibilité de *T. gondii* aux molécules de la Pathogen Box

1) Evaluation de la chimiosensibilité de *T. gondii* par screening

Parmi les 400 composés de la Pathogen Box, les 15 molécules décrites dans le **Tableau XVI** ont montré une activité antiparasitaire significative. Ces résultats ont été confirmés microscopiquement.

Tableau XVI. Caractéristiques des 15 composés présentant une activité antitoxoplasmique après criblage préliminaire à 1 μ M. Les composés sont nommés d'après leur identifiant MMV. Les masses moléculaires, les valeurs cLogP et les activités démontrées ont été fournies dans les informations de la Pathogen Box.

Composés de la Pathogen Box	Masse moléculaire (g/mol)	cLogP	Activité démontrée contre
MMV676477	383,47	3,28	Tuberculose
MMV676512	347,39	2,95	Tuberculose
MMV676604	371,46	2,11	Kinétoplastidés
MMV688853	389,88	1,75	Cryptosporidiose
MMV689480	326,43	4,69	Leishmaniose
MMV676602	460,57	2,09	Kinétoplastidés
MMV687807	383,67	2,63	Tuberculose
MMV011765	358,73	3,1	Paludisme
MMV022478	545,93	2,55	Paludisme
MMV675968	359,81	2,31	Cryptosporidiose
MMV659004	364,88	4,39	Kinétoplastidés
MMV658988	338,84	3,93	Kinétoplastidés
MMV676599	331,41	3,36	Cryptosporidiose
MMV021013	294,4	3,55	Tuberculose
MMV688703	335,42	4,03	Toxoplasmose

2) Détermination de la CC₅₀ des molécules actives

D'après les résultats du screening décrits précédemment, seules 15 molécules ont présenté une activité antiparasitaire contre *T. gondii*, d'après nos critères de sélection ($CI_{50} < 2 \mu$ M). Par conséquent, les CC₅₀ respectives de ces molécules ont été déterminées sur cellules Vero (**Tableau XVII**) à l'aide d'une gamme de concentrations de 0 à 100 μ M. Ces valeurs vont de

1,69 μM (MMV687807) à 15,92 μM (MMV021013). Elles ont été utilisées par la suite pour le calcul des indices de sélectivité.

3) Détermination de la CI_{50} des molécules actives et calcul des indices de sélectivité

Parallèlement à la détermination des CC_{50} , les CI_{50} des 15 molécules considérées comme étant actives contre *T. gondii* ont été déterminées à l'aide d'une gamme de concentrations de 0 à 2 μM . Seules huit de ces molécules ont montré une activité antitoxoplasmique sélective d'après nos critères de sélection ($\text{CI}_{50} < 2 \mu\text{M}$ et $\text{IS} > 4$) (**Tableau XVII**).

Tableau XVII. Caractéristiques des huit composés montrant une activité anti-*T. gondii* sélective. Ces molécules ont été retenues d'après les critères de sélection ($\text{CI}_{50} < 2 \mu\text{M}$ et $\text{IS} > 4$), avec la pyriméthamine (PYR) comme référence. Les composés sont nommés d'après leur identifiant MMV. Les masses moléculaires et cLogP se trouvent dans les données fournies par MMV, sauf pour la pyriméthamine pour laquelle les données ont été trouvées sur DrugCentral.org. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. * $p < 0,05$ en comparaison à la pyriméthamine.

Composés de la Pathogen Box	Masse moléculaire (g/mol)	cLogP	CI_{50} <i>T. gondii</i> (μM)	CC_{50} cellules Vero (μM)	IS
MMV675968	359,81	2,31	0,02 \pm 0,002 *	5,5	275
MMV689480	326,43	4,69	0,10 \pm 0,049 *	8,66	86,6
MMV687807	383,67	2,63	0,15 \pm 0,021 *	1,69	11,3
MMV022478	545,93	2,55	0,29 \pm 0,021 *	2,23	7,7
MMV011765	358,73	3,1	0,34 \pm 0,007 *	9,48	27,9
MMV676602	460,57	2,09	0,81 \pm 0,099 *	3,3	4,1
MMV676512	347,39	2,95	0,86 \pm 0,113 *	3,61	4,2
MMV021013	294,4	3,55	1,12 \pm 0,035	15,92	14,2
PYR	248,71	3	1,17 \pm 0,076	10,52	9,0

Sur l'ensemble des molécules actives, toutes ont une CI_{50} inférieure à 1 μM et significativement inférieure à celle de la pyriméthamine. Seule l'une d'entre elles, MMV021013, présente une CI_{50} équivalente à cette dernière.

Les huit composés actifs sont donc les suivants : MMV676512, MMV689480, MMV676602, MMV687807, MMV011765, MMV022478, MMV675968 et MMV021013. Leurs structures chimiques sont représentées dans la **Figure 96**.

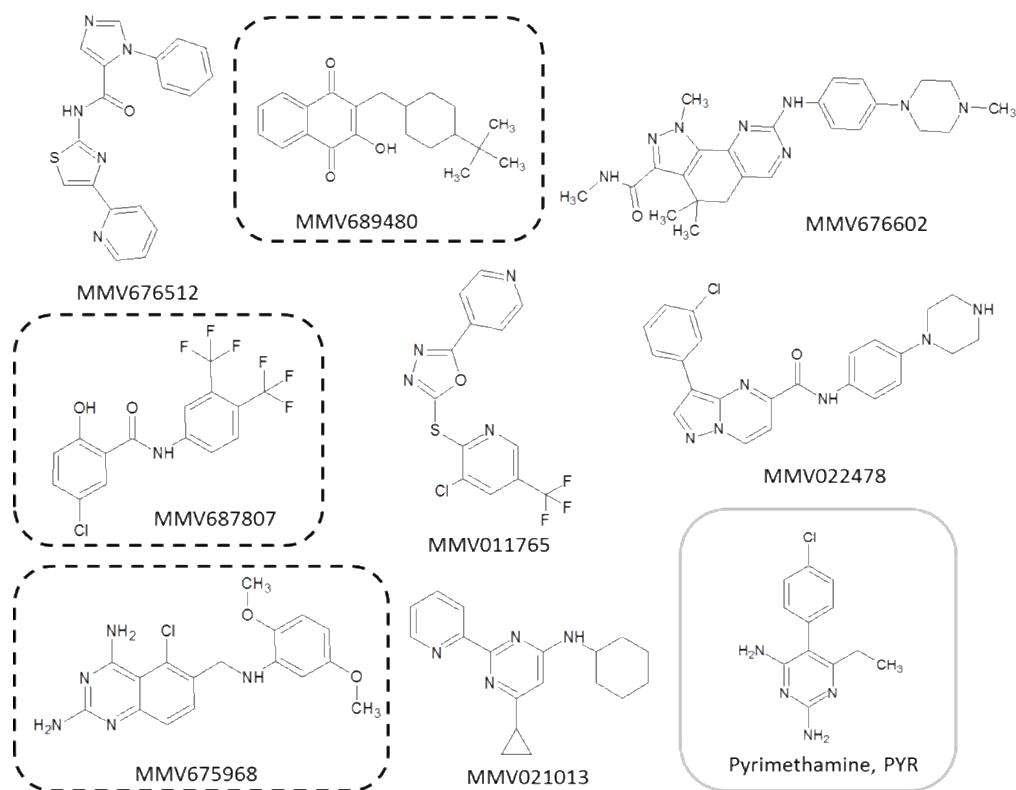


Figure 96. Structures des composés ayant montré une activité antitoxoplasmique sélective. Les structures entourées en pointillés mettent en évidence les composés les plus actifs. Ces structures, et leurs identifiants MMV, ont été fournis par MMV.

Parmi ces molécules, trois d'entre elles ont montré une activité antitoxoplasmique très importante. En effet, les CI_{50} respectives des molécules MMV675968 (**Figure 97A**), MMV689480 (**Figure 97B**) et MMV687807 (**Figure 97C**) sont de l'ordre de 0,02 μ M, 0,10 μ M et 0,15 μ M.

A l'inverse, les sept autres molécules n'ont pas montré d'activité antitoxoplasmique sélective ($SI < 4$), dont le composé anti-*T. gondii* MMV687803.

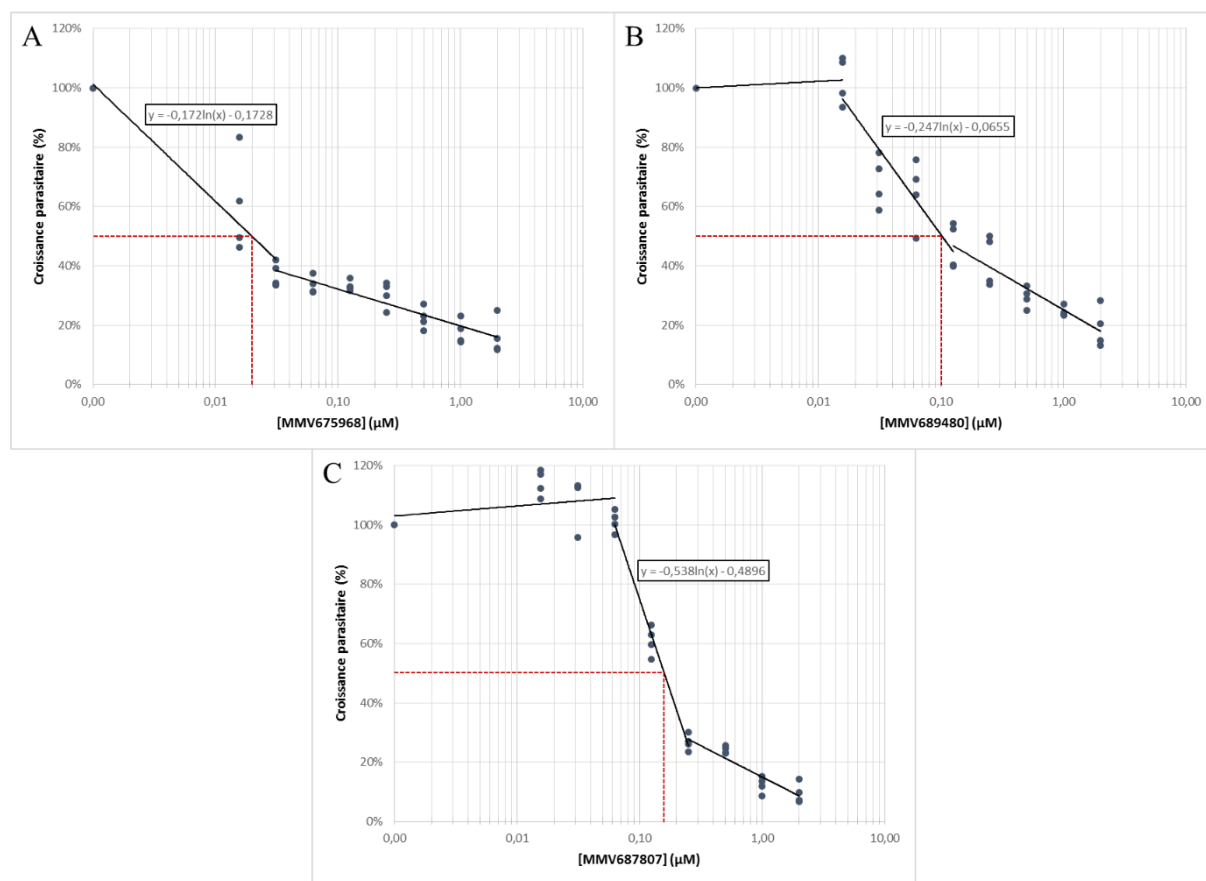


Figure 97. Chimiosensibilité de *T. gondii* aux trois molécules les plus actives de la Pathogen Box après 72 heures d'incubation. Les concentrations testées vont de 0 à 2 μM pour les molécules MMV675968 (A), MMV689480 (B) et MMV687807 (C).

4) Analyses des similarités structurelles

D'après le principe de propriété similaire, les composés présentant des structures chimiques similaires possèdent vraisemblablement les mêmes propriétés biologiques (Johnson and Maggiora, 1990). Dans un premier temps, afin d'évaluer les similarités structurelles entre les huit molécules les plus actives et la pyriméthamine, un coefficient de Tanimoto (T_c) a été calculé pour chaque paire des neuf composés sur la base de leur empreinte APfp (« Atom Pair fingerprint »). Plus le T_c tend vers 1, plus il y a de similarités entre deux molécules. La **Figure 98** représente la fréquence des valeurs de T_c entre les neuf composés sélectivement actifs.

Les valeurs les plus fréquentes étaient comprises entre 0,3 et 0,5. Ces valeurs restent passablement basses, témoignant d'une grande diversité structurelle au sein de ces neuf molécules. La plus grande valeur était de 0,64 entre les composés MMV022478 et MMV676512.

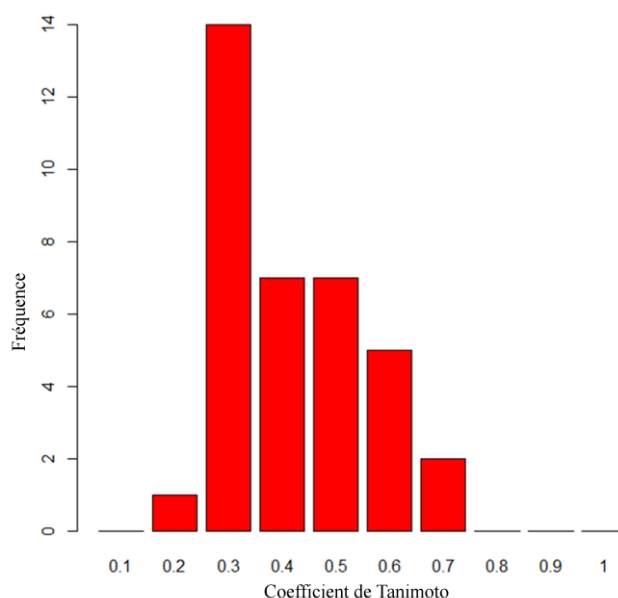


Figure 98. Fréquence des coefficients de Tanimoto entre les neuf molécules, dont la pyriméthamine, basée sur leur empreinte APfp.

Dans un second temps, la matrice de similarité des coefficients de Tanimoto qui en découle a été soumise en tant que matrice de distance à l'analyse HCA (« Hierarchical Clustering Analysis »). Celle-ci a été menée afin de mettre en évidence les similarités structurelles parmi les huit composés actifs en comparaison avec la pyriméthamine (PYR). Trois clusters ont ainsi été mis en évidence (**Figure 99**).

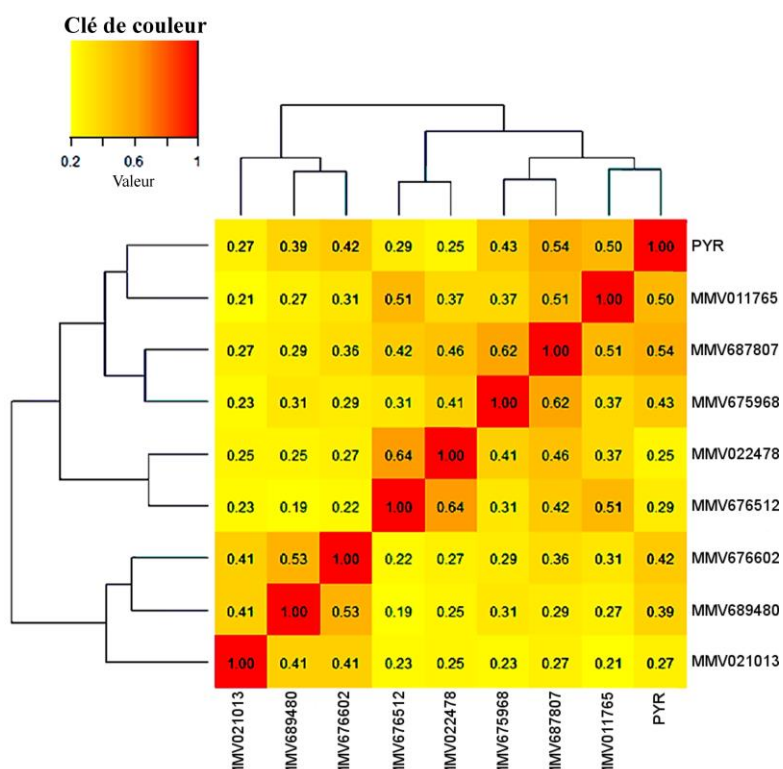


Figure 99. Mise en évidence les similarités entre les neufs composés, dont la pyriméthamine (PYR), d'après leur coefficient de Tanimoto.

Le premier cluster comprend la pyriméthamine, MMV011765, MMV675968 et MMV687807, qui a le plus grand Tc par rapport à la PYR (0,54). Les composés MMV675968 et MMV687807, qui sont parmi les trois molécules les plus actives, étaient inclus dans ce cluster. A l'inverse, la troisième molécule la plus active, MMV689480 était comprise dans le troisième cluster et a présenté peu de similitudes entre les deux autres (0,31 et 0,29, respectivement). Ces résultats donnent un aperçu des similarités structurelles entre les différentes molécules actives contre *T. gondii*, bien qu'une analyse plus exhaustive soit nécessaire pour une évaluation plus aboutie de la relation activité-structure.

II) Chimiosensibilité de *N. caninum* aux molécules de la Pathogen Box

Comme pour *T. gondii*, la chimiosensibilité de *N. caninum* aux molécules de la Pathogen Box a été réalisée dans un premier temps par criblage. Cependant, suite aux difficultés précédemment évoquées à propos de l'anticorps polyclonal utilisé lors du dosage ELISA, les résultats obtenus présentent trop de variabilité pour être concluants malgré les deux criblages ainsi effectués. Seule une molécule, MMV687807, qui a été identifiée dans notre étude comme l'une des plus actives contre *T. gondii*, s'est révélée active dans chacun des deux criblages. Le contrôle microscopique confirme son action anti-*N. caninum* (**Figure 100**) à 1 μ M, avec un taux d'inhibition moyen de 53,05% de la croissance parasitaire.

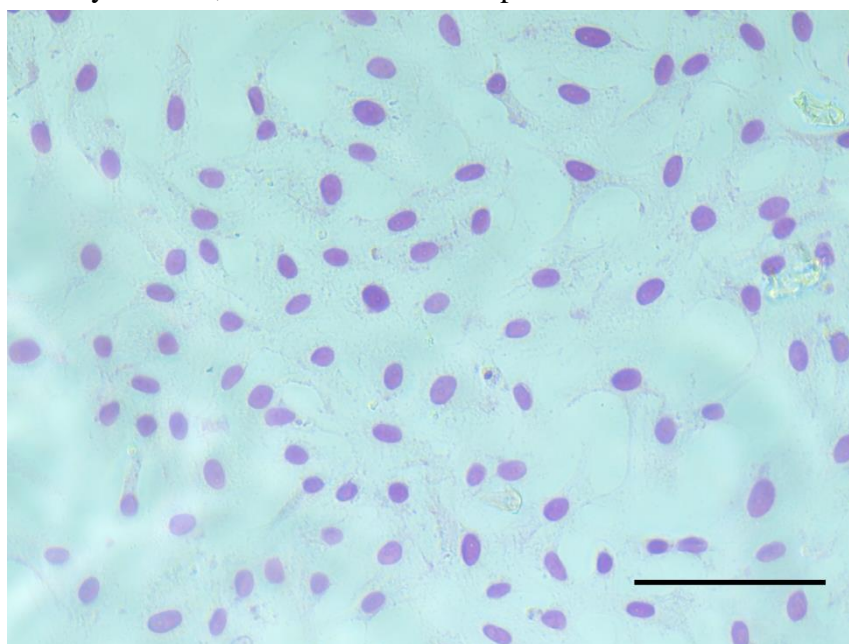


Figure 100. Observation au microscope optique de la croissance des tachyzoïtes de *N. caninum* (souche NC1) en présence de la molécule MMV687807 pendant 72 heures. Les tachyzoïtes ont été cultivés sur cellules Vero et soumis à une concentration de 1 μ M. La barre représente 100 μ m (G : X 40).

Malgré des observations similaires pour certaines molécules, il a été impossible de conclure quant à un effet avéré de celles-ci puisque le tapis cellulaire s'est décroché lors de la révélation par dosage ELISA. Il est donc nécessaire de réitérer ces expérimentations sur *N. caninum* par la suite.

III) Conclusion et discussion

La toxoplasmose est l'une des maladies les plus communes provoquées par un parasite protozoaire (Jones et al., 2014). Les traitements actuellement utilisés sont peu nombreux et la plupart d'entre eux ont été découverts il y a plusieurs dizaines d'années (Finland et al., 1941; Kitchen et al., 2006). Les chimiothérapies utilisées dans le traitement de la toxoplasmose consistent essentiellement en une combinaison de traitements, généralement une association d'antifolates tels que la pyriméthamine et la sulfadiazine. Cependant, le parasite peut devenir plus ou moins sensible aux traitements (Meneceur et al., 2008) ou développer une résistance vis-à-vis de l'un d'entre eux (Doliwa et al., 2013). Le traitement antitoxoplasmique idéal serait fortement actif et non cytotoxique tout en éliminant l'infection latente (bradyzoïtes).

Les mêmes problématiques se posent également pour *Plasmodium falciparum* (Fairhurst and Dondorp, 2016). C'est pourquoi, dans un premier temps, la fondation Medicines for Malaria Venture et plusieurs équipes de scientifiques ont décidé de collaborer pour proposer un outil de criblage puissant dénommé Malaria Box (Van Voorhis et al., 2016). Par la suite, cet outil a été utilisé pour cribler des molécules sur d'autres pathogènes tels que *T. gondii* et *Entamoeba histolytica* (Boyom et al., 2014), *Cryptosporidium parvum* (Bessoff et al., 2014), *Schistosoma* (Ingram-Sieber et al., 2014) et *Perkinsus marinus* (Alemán Resto and Fernández Robledo, 2014), entre autres. Cinquante-cinq groupes ont ainsi compilé plus de 290 résultats d'expérimentations décrivant les nombreuses activités des composés de la Malaria Box (Van Voorhis et al., 2016). Pour *T. gondii*, sept composés antitoxoplasmiques ayant une CI_{50} inférieure à 5 μ M et un IS supérieur à 6 ont été identifiés (Boyom et al., 2014). Les résultats ont ainsi permis d'initier le développement de plus de 30 programmes scientifiques à visée thérapeutique pour un grand nombre de maladies. Cette collaboration libre d'accès a connu un tel succès que la fondation MMV a distribué un autre panel de molécules, la Pathogen Box, un nouvel outil de criblage basé sur le principe de la Malaria Box et dédié à divers pathogènes (Mayer and Kronstad, 2017; Preston et al., 2016).

Dans notre étude, huit composés antitoxoplasmiques ont été identifiés d'après nos critères de sélection ($CI_{50} < 2 \mu\text{M}$ et $IS > 4$). En d'autres termes, 2% des molécules de la Pathogen Box se sont révélées actives contre le parasite.

Une autre réussite de la Pathogen Box a récemment été décrite avec la mise en évidence d'une activité inhibitrice contre la croissance planctonique et la formation de biofilm de *Candida albicans* (Vila and Lopez-Ribot, 2017). En effet, MMV675968 a été démontré comme étant actif contre la forme planctonique de *C. albicans*. De plus, ce composé est également le plus actif contre *T. gondii* avec une CI_{50} de $0,02 \mu\text{M}$ et un IS égal à 275. Les traitements antifongiques ciblent une large gamme de pathogènes fongiques de l'homme, et les antifongiques azolés ont montré un effet contre *T. gondii* (Martins-Duarte et al., 2008). Bien que le fluconazole et l'itraconazole aient des CI_{50} respectives égales à $3 \mu\text{M}$ et $0,5 \mu\text{M}$, le mécanisme responsable de leur activité antitoxoplasmique est inconnu. Egalement décrit comme anti-*Cryptosporidium*, MMV675968 a également un effet anti-*P. falciparum* (Duffy et al., 2017). MMV675968 est connu pour cibler la dihydrofolate réductase (DHFR) de *Cryptosporidium* (Popov et al., 2006). Par conséquent, il est fort probable que ce composé cible également la DHFR de *Plasmodium* et de *T. gondii*.

Il est également intéressant de souligner que l'un des composés retenus ici est un composé de référence. Il s'agit de la molécule MMV689480 (CI_{50} égale à $0,10 \mu\text{M}$ et IS égal à 86,6), qui n'est autre que la buparvaquone. Ce composé a été décrit comme ayant un effet inhibiteur contre la prolifération *in vitro* et *in vivo* de *Neospora caninum* (Müller et al., 2015) et la prolifération *in vivo* de *T. gondii* (Müller et al., 2017). Nos résultats sont en accord avec ces données puisque la burparvaquone a montré l'une des plus fortes activités antitoxoplasmique parmi les molécules actives. *N. caninum* appartient au phylum des Apicomplexa, comme *T. gondii* et *Eimeria tenella*. L'effet de la buparvaquone a en effet été décrit chez ce dernier : elle inhibe plusieurs enzymes impliquées dans le transport des électrons au sein de la mitochondrie (Fry et al., 1984). Ce mode d'action pourrait être le même dans le cas de l'inhibition de la croissance chez *T. gondii*. La buparvaquone est également active contre *P. falciparum* (Martin et al., 1973), *Theileria parva* (McHardy et al., 1985), *Leishmania donovani* (Croft et al., 1992) et *Pneumocystis carinii* (Kaneshiro et al., 2001).

La molécule MMV687807 est active contre les biofilms de *C. albicans* déjà formés (Vila and Lopez-Ribot, 2017). Ce composé anti-mycobactérie a montré une bonne activité contre *T. gondii* (CI_{50} égale à $0,15 \mu\text{M}$ et IS égal à 11,3) et une activité potentielle contre *N. caninum* d'après les deux criblages réalisés sur ce parasite. Dans le cas de ce dernier, il est toutefois nécessaire de préciser que ces résultats sont à confirmer : le tapis cellulaire s'est décroché lors

de la révélation de la première plaque et le protocole du dosage ELISA avec l'anticorps polyclonal n'était pas encore tout à fait au point lors de la révélation de la seconde, malgré la concordance des résultats avec les observations au microscope optique.

Les molécules anti-*Plasmodium* MMV022478 (CI₅₀ égale à 0,29 µM et IS égal à 7,7) et MMV011765 (CI₅₀ égale à 0,34 µM et IS égal à 27,9) se sont également montrées actives contre *T. gondii*. MMV022478 a été mise en évidence comme étant sélectivement active contre *Trypanosoma brucei brucei* (Duffy et al., 2017). Les molécules de la famille des pyrazolo[1,5-a]pyrimidines, auxquelles appartient MMV022478, ont été décrites pour leur activité inhibitrice vis-à-vis de la NADPH oxydase 4 des mammifères (Borbély et al., 2010). MMV676602 (anti-*Trypanosoma*) et MMV676512 (anti-*Cryptosporidium*) ont également eu une activité contre *T. gondii*, avec des CI₅₀ respectives de 0,81 µM (IS égal à 4,1) et 0,86 µM (IS égal à 4,2).

Le composé anti-*Mycobacterium* MMV021013 était également efficace contre *T. gondii* (CI₅₀ égale à 1,12 µM et IS égal à 14,2). Cette 2-pyridil-4-aminopyrimidine a été démontrée comme étant active contre *T. cruzi*, *L. donovani* et *T. brucei brucei* (Duffy et al., 2017). D'après la structure chimique, la cible cellulaire putative de ce composé pourrait être la méthionine aminopeptidase (Duffy et al., 2017). Ce composé a été le seul à ne pas avoir d'activité significative par rapport à la pyriméthamine.

Aucun des composés présentés comme étant actifs contre *T. gondii*, d'après les données fournies par MMV, n'ont été efficaces dans notre étude. Cela pourrait être dû aux différentes techniques utilisées et par le temps d'action des drogues (72 heures ici). De plus, *P. falciparum* est phylogénétiquement éloigné de *T. gondii*, même s'ils appartiennent tous deux au phylum des Apicomplexa. Cela pourrait expliquer pourquoi certains composés ne sont pas actifs contre *T. gondii*.

MMV688703, actif contre *Plasmodium* (Duffy et al., 2017), était inclus dans les 15 composés retenus après screening. Néanmoins, il ne rentrait pas dans les critères d'inclusion en tant que molécule active (CI₅₀ < 2 µM et IS > 4). Ce composé a été précédemment identifié comme actif contre *T. gondii* par l'inhibition de la protéine kinase cGMP-dépendante de *Toxoplasma* impliquée dans la régulation du calcium (Zhang et al., 2006). Il a été démontré que des divergences dans les résultats puissent apparaître dans le cas de composés identiques testés au cours d'expérimentations semblables par différentes équipes scientifiques (Van Voorhis et al., 2016). Ces divergences découlent des techniques de screening mises en œuvre (Van Voorhis et al., 2016) et des modèles expérimentaux (Portes et al., 2015).

Enfin, l'un des points importants pour l'évaluation de l'intérêt de nouveaux composés est la comparaison de leur efficacité avec celle de la pyriméthamine. Cette dernière est la molécule de référence communément utilisée en association avec un sulfamide pour obtenir un effet synergique contre *T. gondii* (Soheilian et al., 2011). Néanmoins, une variation des sensibilités des souches de *T. gondii* à la pyriméthamine a été observée naturellement (Meneceur et al., 2008) et une résistance vis-à-vis de cette drogue a été induite *in vitro* (Reynolds et al., 2001). De plus, des souches naturellement résistantes de *P. falciparum* ont été mises en évidence dans plusieurs pays (Roper et al., 2004). Ce problème pourrait être évité par les nouvelles molécules actives découvertes ici, puisque leurs squelettes carbonés sont très différents de celui de la pyriméthamine, qui dérive d'un squelette pyrimidine. Ces découvertes n'empêcheraient probablement pas, à terme, l'émergence de nouvelles résistances à ces nouveaux composés, mais permettraient tout de même d'étoffer l'armement thérapeutique à disposition.

Notre outil de criblage moléculaire, associé à la Pathogen Box, a donc permis la découverte de nouveaux composés au potentiel thérapeutique indéniable vis-à-vis de *T. gondii*. Ainsi, sur les 400 molécules criblées, huit d'entre elles (soit 2%) ont présenté une activité sélective contre le parasite. L'outil de criblage moléculaire est donc parfaitement adapté à cette fonction pour la découverte de nouveaux composés actifs contre *T. gondii* ou d'autres protozoaires d'intérêt médical.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* et *Plasmodium falciparum* sont trois parasites protozoaires très répandus du phylum des Apicomplexa pour lesquels il n'existe que peu de traitements à la fois efficaces et sans effets secondaires à l'heure actuelle. Cela est d'autant plus problématique que la plupart des traitements existants ont été découverts il y a de nombreuses années et que certaines souches parasitaires ont développé des résistances à certaines molécules thérapeutiques, au-delà du fait que certaines d'entre elles soient faiblement biodisponibles. Devant ces limites, il est important d'étoffer l'arsenal thérapeutique actuel. La découverte de nouveaux composés naturels actifs contre ces pathogènes revêt donc un intérêt primordial. De plus, la valorisation de molécules naturelles à des fins thérapeutiques s'inscrit dans un contexte de développement durable puisque l'écologie et, *a fortiori*, l'exploitation responsable et la valorisation des ressources naturelles font partie des enjeux majeurs de ces prochaines décennies.

Dans la première partie de notre travail, nous avons mis appliqué une méthodologie de criblage moléculaire dans le but de mettre en évidence l'effet anti-*T. gondii* de l'extrait brut sans tanin d'une poudre d'écorce de l'arbre africain *Anogeissus leiocarpus*. Il a été montré plus précisément que la trachélospérogénine E, un triterpène, contribue significativement à cette activité antiparasitaire. En effet, d'autres composés tels que l'acide ellagique ou ses dérivés méthylés ont également été actifs contre *T. gondii*, mais dans une moindre mesure. Ces travaux ont également permis d'identifier partiellement le mode d'action de la trachélospérogénine E. Celle-ci pourrait avoir le même effet qu'un inhibiteur de la dynamine, un acteur moléculaire mis en jeu lors de l'endocytose du tachyzoïte au cours de l'invasion cellulaire. Il a été démontré qu'une telle inhibition résulte en une augmentation de l'adhésion du parasite à la membrane de la cellule hôte tout en inhibant la pénétration de la membrane plasmique par *T. gondii*. Une autre hypothèse serait que la trachélospérogénine E agisse sur la synthèse et/ou la maturation de protéines impliquées dans le processus d'inhibition, de la même façon que l'acide maslinique, qui est également un triterpène. Il serait toutefois intéressant de réaliser de nouvelles études pour confirmer cette hypothèse. En effet, la microscopie électronique à balayage permettrait d'obtenir des informations complémentaires sur la localisation exacte du tachyzoïte par rapport à la cellule hôte après inhibition de l'invasion. D'autres études pourraient également être envisagées, avec pour objectif de déterminer si la dynamine est inhibée par la trachélospérogénine E ou si un autre acteur moléculaire est impliqué dans ce processus d'inhibition.

Dans la seconde partie de ce travail, en plus de *T. gondii*, nous avons appliqué l'outil de criblage moléculaire à *N. caninum* et *P. falciparum* afin de cribler différents extraits d'*A. leiocarpus*, identiques ou non à ceux étudiés dans la partie précédente. Ainsi, l'extrait brut sans tanin et la trachélospérogénine E ont inhibé la croissance de *N. caninum*, confirmant l'intérêt de cette essence naturelle dans la découverte de nouveaux composés antiparasitaires, notamment vis-à-vis des parasites protozoaires. L'activité antipaludique d'*A. leiocarpus* a également pu être confirmée, en regard des données déjà publiées dans la littérature. Malgré ces résultats, une succession d'imprévus et de difficultés diverses et variées ont eu raison de la poursuite de l'étude sur ce parasite. Il est donc nécessaire de réitérer ces expérimentations sur *P. falciparum* et d'optimiser certains aspects de la culture cellulaire, notamment en ce qui concerne les paramètres d'atmosphère avec l'absence de dioxygène. En ce qui concerne *N. caninum*, aucune fraction CPC d'*A. leiocarpus* n'a eu d'effet sélectif contre ce parasite. En revanche, des difficultés ont également ralenti le travail effectué, notamment lors de l'utilisation de l'anticorps polyclonal pour le dosage ELISA. Ces limites ont introduit de nombreux biais ayant abouti à une grande variabilité dans les résultats. A l'heure actuelle, ces difficultés ont été surmontées et les expérimentations pourront être de nouveau réalisées dans un avenir proche afin de confirmer les résultats déjà obtenus. Pour *T. gondii*, les fractions sélectivement actives se sont avérées être les fractions les plus apolaires, contenant des triterpènes tels que l'acide sérrique. Cette famille de composés semble être responsable de l'effet antiparasitaire de l'écorce d'*A. leiocarpus* ainsi observé.

Par la suite, une étude *in vivo* a été menée afin d'évaluer le potentiel antiparasitaire de l'extrait brut sans tanin et de la trachélospérogénine E issus d'*A. leiocarpus* au sein de plusieurs modèles murins infectés (toxoplasmose chronique et aiguë et néosporose aiguë). Aucun résultat significatif n'a été obtenu sauf dans le cas de la toxoplasmose chronique, où les souris ont été protégées de l'invasion de *T. gondii* par l'extrait brut sans tanin, augmentant ainsi leurs chances de survie. Toutefois, il semblerait que l'immunosuppression associée au DMSO (utilisé pour la solubilisation des composés naturels) soit responsable de la mortalité des animaux. Il est donc nécessaire d'envisager l'utilisation d'un autre solvant moins toxique, malgré sa faible concentration, pour de futures études *in vivo* sur modèle murin immunodéprimé.

Dans la troisième partie de notre travail, l'outil de criblage moléculaire a été mis en application pour le criblage de différents extraits d'écorces d'arbres provenant de la région Champagne-Ardenne sur *T. gondii* et *N. caninum*. Cette étude est également d'un intérêt écolo-économique avec, en cas de résultats positifs, la valorisation de sous-produits de la filière bois.

Parmi les différents extraits criblés sur les deux modèles parasitaires, seul l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) s'est révélé actif. Bien que l'extrait *n*-heptane de mélèze d'Europe (*Larix decidua*) ait également montré une activité anti-*T. gondii*, celle-ci était moindre que celle induite par l'extrait *n*-heptane d'aulne glutineux. Le fractionnement par CPC de ce dernier a permis d'identifier les composés actifs contre les parasites. Ainsi, de la même façon que pour les fractions de l'extrait d'écorce d'*A. leiocarpus*, les fractions les plus apolaires de l'écorce d'aulne glutineux se sont révélées être les plus actives. De façon intéressante, les métabolites secondaires majoritaires s'y trouvant sont quasiment tous des triterpènes, notamment la bétuline et ses dérivés, mais également le lupénone et l'alnusénone. Un autre composé, le β -sitosténone, est également majoritaire au sein d'une des fractions actives, mais il s'agit d'un stérol et non d'un triterpène. Ces résultats confortent les observations précédentes quant à l'activité antiparasitaire induite par les triterpènes vis-à-vis des parasites protozoaires (Bossolani et al., 2017; De Pablos et al., 2010; Mazoir et al., 2011; Moneriz et al., 2011; Sousa et al., 2014). D'autres études peuvent être envisagées en utilisant d'autres essences naturelles locales, tant leur diversité et leur utilisation, en médecine traditionnelle ou non, sont variées.

Cependant, au cours de cette étude, nous avons remarqué que le screening préalable des extraits globaux n'était pas infaillible. En effet, l'extrait méthanol s'est avéré contenir des composés actifs contre les parasites après fractionnement, alors que l'extrait en lui-même n'a présenté aucune activité antiparasitaire. Pour réaliser un criblage le plus exhaustif possible, il est donc nécessaire de fractionner les extraits à étudier, afin de limiter la présence de potentiels inhibiteurs ou pour atténuer, voire supprimer, l'effet de « dilution » de l'activité, comme cela a été le cas avec la suppression des tanins de l'extrait EB99 d'*A. leiocarpus*.

Enfin, dans la quatrième et dernière partie de ce travail, la méthodologie dont découle notre outil de criblage moléculaire a été associée à la Pathogen Box fournie par la fondation Medicines for Malaria Venture. Ainsi, 400 composés chimiques de synthèse ont été criblés sur *T. gondii* et *N. caninum*. Parmi ceux-ci, huit ont eu un effet sélectif vis-à-vis de *T. gondii*, dont trois avec une activité extrêmement intéressante. Ces trois molécules, nommées MMV675968, MMV689480 et MMV687807, ont en effet été les plus actives, avec un index de sélectivité supérieur à 10, tout en n'étant pas cytotoxiques. Cette dernière a, par ailleurs, été identifiée comme possiblement active contre *N. caninum* d'après le criblage. Parmi ces trois molécules se trouvent la buparvaquone, un composé de référence à usage vétérinaire contre *N. caninum* chez les bovins. Les comparaisons structurales de ces trois composés par rapport à la pyriméthamine ont montré que leurs squelettes carbonés sont relativement différents. Par

conséquent, il s'agit de bons candidats pour le design et la synthèse de nouveaux composés antiparasitaires non cytotoxiques en se basant sur leurs structures chimiques. Ces travaux ont été récemment publiés dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Spalenka et al., 2018), présentés en **Annexe 3**.

Afin d'étoffer toutes les données obtenues lors des expérimentations *in vitro*, il serait intéressant de réaliser le criblage des composés naturels sur des souches parasitaires résistantes à la sulfadiazine, telles que les souches RH^R et ME49^R de *T. gondii* déjà utilisées au sein de notre laboratoire. De la même façon, l'association d'un métabolite secondaire actif avec une molécule thérapeutique (sulfadiazine, pyriméthamine...) permettrait de déterminer si la potentialisation de l'effet antiparasitaire est possible. Enfin, des études de solubilité des composés naturels pourraient être mises en œuvre pour remplacer le DMSO par d'autres solvants moins toxiques.

Dans le cas des expérimentations *in vivo*, l'évaluation de la chimiosensibilité de *T. gondii* et *N. caninum* aux fractions actives de l'aulne glutineux dans un modèle murin sont envisageables à court terme. En effet, le protocole *in vivo* a été conçu pour tester une dizaine de composés sur les souris et est donc déjà prêt à être appliqué. En regard des résultats intéressants concernant la bétuline et ses dérivés, il est envisageable de réaliser à court terme de telles expérimentations pour évaluer l'effet *in vivo* de ces composés. Le stage de Master 2 de Pierre Darne a pour objectif de confirmer l'activité antiparasitaire de l'acide bétulinique pur notamment. En cas d'activité avérée, ce produit pur sera étudié ensuite pour ses propriétés antiparasitaires chez des souris infectées.

En ce qui concerne l'unité de criblage moléculaire, celle-ci peut être utilisée pour d'autres parasites protozoaires. La méthodologie peut également être appliquée au criblage sur d'autres pathogènes unicellulaires (bactéries, champignons...), nécessitant ou non quelques modifications (modèle de cellules hôtes, conditions expérimentales de culture cellulaire...), au sein d'autres laboratoires maîtrisant ces modèles. De la même façon, l'outil de criblage pourrait être utilisé pour le criblage d'autres composés naturels obtenus à partir d'écorce. Ainsi, il serait intéressant de réitérer les tests expérimentaux avec des arbres appartenant à la même famille qu'*A. leiocarpus* (Combretaceae) ou qu'*Alnus glutinosa* (Betulaceae), notamment les espèces de bouleau (du genre *Betula*), ou encore avec d'autres parties d'arbres telles que les racines ou les feuilles. De plus, grâce aux bases qui ont été posées ici, la méthodologie du criblage pourrait

permettre d'aboutir à la mise en place d'une unité locale de criblage de molécules sur d'autres parasites tels que les helminthes, les ectoparasites ou encore les vecteurs de maladies.

Du point de vue de la chimie moléculaire, le *drug design* est un élément important à prendre en compte dans la lutte contre ces parasites tant les possibilités sont vastes. En effet, puisqu'il apparaît que les triterpènes ont un rôle dans l'activité antiparasitaire mise en évidence ici, la synthèse de composés dont le squelette carboné en est proche pourrait déboucher sur la découverte de nouvelles molécules antiparasitaires de synthèse. De même, la modification chimique de triterpènes naturels serait un aspect non négligeable à envisager puisqu'elle permettrait de potentialiser les effets antiparasitaires de ces triterpènes mais aussi modifier leurs propriétés biologiques (meilleure biodisponibilité, durée d'action allongée, toxicité moindre...). Certaines expérimentations, telles que l'analyse par isobologramme, permettent d'envisager une telle approche et ont été décrites pour *L. infantum* (Sousa et al., 2014).

Ces études sur les composés naturels et la découverte de nouvelles molécules naturelles antiparasitaires permettraient la valorisation des sous-produits de la filière bois grâce à leur utilisation comme nouvelle source de composés antiparasitaires. Il s'agit, à l'heure actuelle mais aussi dans les années à venir, d'un enjeu majeur dans la lutte contre les résistances médicamenteuses et le faible nombre de traitements disponibles.

BIBLIOGRAPHIE

- Abedini, A., Chollet, S., Angelis, A., Borie, N., Nuzillard, J.-M., Skaltsounis, A.-L., Reynaud, R., Gangloff, S.C., Renault, J.-H., and Hubert, J. (2016). Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1029–1030, 121–127.
- Acerro, N., and Muñoz-Mingarro, D. (2012). Effect on Tumor Necrosis Factor- α Production and Antioxidant Ability of Black Alder, as Factors Related to Its Anti-Inflammatory Properties. *J. Med. Food* 15, 542–548.
- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., and D'Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar. J.* 10, 144.
- Afssa (2005). Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail "Toxoplasma gondii" de l'Afssa. 318 p.
- Aires, A., Dias, C., Carvalho, R., and Saavedra, M.J. (2017). Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Acta Biochim. Pol.* 64, 265–271.
- Alemán Resto, Y., and Fernández Robledo, J.A. (2014). Identification of MMV Malaria Box inhibitors of *Perkinsus marinus* using an ATP-based bioluminescence assay. *PloS One* 9, e111051.
- Al-Qassab, S.E., Reichel, M.P., and Ellis, J.T. (2010). On the Biological and Genetic Diversity in *Neospora caninum*. *Diversity* 2, 411–438.
- Aneja, B., Kumar, B., Jairajpuri, M.A., and Abid, M. (2016). A structure guided drug-discovery approach towards identification of *Plasmodium* inhibitors. *RSC Adv.* 6, 18364–18406.
- Angelis, A., Hubert, J., Aligiannis, N., Michalea, R., Abedini, A., Nuzillard, J.-M., Gangloff, S.C., Skaltsounis, A.L., and Renault, J.H. (2016). Bio-Guided Isolation of Methanol-Soluble Metabolites of Common Spruce (*Picea abies*) Bark by-Products and Investigation of Their Dermo-Cosmetic Properties. *Mol. Basel Switz.* 21.
- Anstey, N.M., Douglas, N.M., Poespoprodjo, J.R., and Price, R.N. (2012). *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv. Parasitol.* 80, 151–201.
- Appleford, P.J., and Smith, J.E. (1997). *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Trop.* 65, 97–104.
- Arbab, A.H. (2014). Review on *Anogeissus leiocarpus* a potent African traditional drug. *IJRPC* 4, 496–500.
- Aspinall, T.V., Joynson, D.H.M., Guy, E., Hyde, J.E., and Sims, P.F.G. (2002). The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 185, 1637–1643.
- Asres, K., Bucar, F., Knauder, E., Yardley, V., Kendrick, H., and Croft, S.L. (2001). *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytother. Res. PTR* 15, 613–617.

- Atchade, P.S., Doderer-Lang, C., Chabi, N., Perrotey, S., Abdelrahman, T., Akpovi, C.D., Anani, L., Bigot, A., Sanni, A., and Candolfi, E. (2013). Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa? *Malar. J.* *12*, 279.
- Attioua, B., Lagnika, L., Yeo, D., Antheaume, C., Kaiser, M., Weniger, B., Lobstein, A., and Vonthron-Sénécheau, C. (2011). *In vitro* antiplasmodial and antileishmanial activities of flavonoids from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* *11*, 1–6.
- Aydin-Schmidt, B., Thorsell, W., and Wahlgren, M. (2010). Carolus Linnaeus, the ash, wormwood and other anti-malarial plants. *Scand. J. Infect. Dis.* *42*, 941–942.
- Baatz, H., Mirshahi, A., Puchta, J., Gümbel, H., and Hattenbach, L.O. (2006). Reactivation of *Toxoplasma* retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *14*, 185–187.
- Baggish, A.L., and Hill, D.R. (2002). Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1163–1173.
- Bajusz, D., Rácz, A., and Héberger, K. (2015). Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J. Cheminformatics* *7*, 20.
- Bakhiet, A.O., and Adam, S.E. (1995). Therapeutic utility, constituents and toxicity of some medicinal plants: a review. *Vet. Hum. Toxicol.* *37*, 255–258.
- Balakin, K.V., Ivanenkov, Y.A., Skorenko, A.V., Nikolsky, Y.V., Savchuk, N.P., and Ivashchenko, A.A. (2004). *In silico* estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening. *J. Biomol. Screen.* *9*, 22–31.
- Baniecki, M.L., Wirth, D.F., and Clardy, J. (2007). High-Throughput *Plasmodium falciparum* Growth Assay for Malaria Drug Discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 716–723.
- Barber, J.S., Payne-Johnson, C.E., and Trees, A.J. (1996). Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J. Small Anim. Pract.* *37*, 568–574.
- Basco, L., and Ringwald, P. (2000). [Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches]. *Sante Montrouge Fr.* *10*, 47–50.
- Batinovic, S., McHugh, E., Chisholm, S.A., Matthews, K., Liu, B., Dumont, L., Charnaud, S.C., Schneider, M.P., Gilson, P.R., de Koning-Ward, T.F., et al. (2017). An exported protein-interacting complex involved in the trafficking of virulence determinants in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Nat. Commun.* *8*, 16044.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K.A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* *127*, 947–961.
- Beeson, J.G., Drew, D.R., Boyle, M.J., Feng, G., Fowkes, F.J.I., and Richards, J.S. (2016). Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol. Rev.* *40*, 343–372.

- Behnke, M.S., Dubey, J.P., and Sibley, L.D. (2016). Genetic Mapping of Pathogenesis Determinants in *Toxoplasma gondii*. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 63–81.
- Berger, F., Goulet, V., Le Strat, Y., and Desenclos, J.-C. (2009). Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 57, 241–248.
- Bessoff, K., Spangenberg, T., Foderaro, J.E., Jumani, R.S., Ward, G.E., and Huston, C.D. (2014). Identification of *Cryptosporidium parvum* active chemical series by Repurposing the open access malaria box. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2731–2739.
- Besteiro, S., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol.* 13, 797–805.
- Bhat, G.P., and Surolia, N. (2001). *In vitro* antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 304–308.
- Bianchi, S., Krosiakova, I., Janzon, R., Mayer, I., Saake, B., and Pichelin, F. (2015). Characterization of condensed tannins and carbohydrates in hot water bark extracts of European softwood species. *Phytochemistry* 120, 53–61.
- Bjerkås, I., and Dubey, J.P. (1991). Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Vet. Scand.* 32, 407–410.
- Bjerkås, I., Mohn, S.F., and Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd. Berl. Ger.* 70, 271–274.
- Björkman, C., Holmdahl, O.J., and Ugglå, A. (1997). An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* 68, 251–260.
- Black, M.W., and Boothroyd, J.C. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607–623.
- Borbély, G., Szabadkai, I., Horváth, Z., Markó, P., Varga, Z., Breza, N., Baska, F., Vántus, T., Huszár, M., Geiszt, M., et al. (2010). Small-molecule inhibitors of NADPH oxidase 4. *J. Med. Chem.* 53, 6758–6762.
- Bossolani, G.D.P., Ueda-Nakamura, T., Silva, S.O., Filho, D., P. B., Costa, T.O.G., Quintanilla, R.H.R., Martinez, S.T., Veiga-Junior, V.F., Pinto, A.C., et al. (2017). Anti-*Trypanosoma* Activity and Synergistic Effects of Natural and Semi-Synthetic Triterpenes and Predominant Cell Death through Autophagy in Amastigote Forms. *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 2473–2489.
- Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., and Marion, S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet.* 350, 173–177.
- Bowman, J.D., Merino, E.F., Brooks, C.F., Striepen, B., Carlier, P.R., and Cassera, M.B. (2014). Antiapicoplast and gametocytocidal screening to identify the mechanisms of action of compounds within the malaria box. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 811–819.
- Bown, D. (1995). *Encyclopaedia of Herbs and their Uses* (London: Dorling Kindersley).

- Boyom, F.F., Fokou, P.V.T., Tchokouaha, L.R.Y., Spangenberg, T., Mfopa, A.N., Kouipou, R.M.T., Mbouna, C.J., Donfack, V.F.D., and Zollo, P.H.A. (2014). Repurposing the Open Access Malaria Box To Discover Potent Inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 5848–5854.
- Boyse, E.A., Old, L.J., and Chouroulinkov, I. (1964). Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med. Res.* *10*, 39–47.
- Brantner, A., and Grein, E. (1994). Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* *44*, 35–40.
- Brenier-Pinchart, M.P., Bertini, R.L., Maubon, D., and Pelloux, H. (2010). *In vitro* differential phenotypic characteristics among Type-II *Toxoplasma gondii* strains from congenital toxoplasmosis in humans. *J. Parasitol.* *96*, 798–799.
- Briolant, S., Parola, P., Fusaï, T., Madamet-Torrentino, M., Baret, E., Mosnier, J., Delmont, J.P., Parzy, D., Minodier, P., Rogier, C., et al. (2007). Influence of oxygen on asexual blood cycle and susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine: requirement of a standardized *in vitro* assay. *Malar. J.* *6*, 44.
- Bruce-Chwatt, L.J. (1982). Transfusion malaria revisited. *Trop. Dis. Bull.* *79*, 827–840.
- Burkot, T.R., Williams, J.L., and Schneider, I. (1984). Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown *in vitro* from the same isolate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *78*, 339–341.
- Buxton, D., McAllister, M.M., and Dubey, J.P. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* *18*, 546–552.
- Bynum, W.F. (1999). Ronald Ross and the malaria-mosquito cycle. *Parassitologia* *41*, 49–52.
- Caldas, L.A., Attias, M., and de Souza, W. (2009). Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* *301*, 103–108.
- Caldas, L.A., Soares, L.L., Henrique Seabra, S., Attias, M., and de Souza, W. (2016). Monitoring of dynamin during the *Toxoplasma gondii* cell cycle. *Pathog. Dis.* *74*.
- Calderón, F., Vidal-Mas, J., Burrows, J., de la Rosa, J.C., Jiménez-Díaz, M.B., Mulet, T., Prats, S., Solana, J., Witty, M., Gamo, F.J., et al. (2012). A Divergent SAR Study Allows Optimization of a Potent 5-HT_{2c} Inhibitor to a Promising Antimalarial Scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* *3*, 373–377.
- Camps, M., Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J. (2002). An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* *43*, 1309–1318.
- Cao, Y., Charisi, A., Cheng, L.-C., Jiang, T., and Girke, T. (2008). ChemmineR: a compound mining framework for R. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *24*, 1733–1734.
- Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., and Ward, G.E. (2004). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot. Cell* *3*, 1320–1330.

- Carhart, R.E., Smith, D.H., and Venkataraghavan, R. (1985). Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* *25*, 64–73.
- Carroll, F.I., and Houghten, R.A. (2009). From rapid *in vitro* screening to rapid *in vivo* screening in the drug discovery process. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *34*, 251–252.
- Cérède, O., Dubremetz, J.F., Soète, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., and Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp. Med.* *201*, 453–463.
- Cereto-Massagué, A., Ojeda, M.J., Valls, C., Mulero, M., Garcia-Vallvé, S., and Pujadas, G. (2015). Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods* *71*, 58–63.
- Cesbron-Delauw, M.F., Tomavo, S., Beauchamps, P., Fourmaux, M.P., Camus, D., Capron, A., and Dubremetz, J.F. (1994). Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* *269*, 16217–16222.
- Cesbron-Delauw, M.F., Lecordier, L., and Mercier, C. (1996). Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *219*, 59–65.
- Chen, G.X., Mueller, C., Wendlinger, M., and Zolg, J.W. (1987). Kinetic and molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* *31*, 430–437.
- Chiej, R. (1984). *Encyclopaedia of Medicinal Plants* (MacDonald).
- Choi, W.Y., Nam, H.W., Kwak, N.H., Huh, W., Kim, Y.R., Kang, M.W., Cho, S.Y., and Dubey, J.P. (1997). Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* *175*, 1280–1282.
- Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2005). *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 570–581.
- Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2007). *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 579–592.
- Commisso, M., Bianconi, M., Di Carlo, F., Poletti, S., Bulgarini, A., Munari, F., Negri, S., Stocchero, M., Ceoldo, S., Avesani, L., et al. (2017). Multi-approach metabolomics analysis and artificial simplified phytocomplexes reveal cultivar-dependent synergy between polyphenols and ascorbic acid in fruits of the sweet cherry (*Prunus avium* L.). *PloS One* *12*, e0180889.
- Cooke, B.M., Lingelbach, K., Bannister, L.H., and Tilley, L. (2004). Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* *20*, 581–589.
- Coronado, L.M., Nadovich, C.T., and Spadafora, C. (2014). Malarial Hemozoin: From target to tool. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 2032–2041.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., and Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept.” *J. Ethnopharmacol.* *106*, 290–302.

- Cosentino, M., Marino, F., Maio, R.C., Delle Canne, M.G., Luzzani, M., Paracchini, S., and Lecchini, S. (2010). Immunomodulatory activity of the lignan 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR/lignan) extracted from the heartwood of Norway spruce (*Picea abies*). *Int. Immunopharmacol.* *10*, 339–343.
- Costa, J.G.L., Carneiro, A.C.A.V., Tavares, A.T., Andrade, G.M.Q., Vasconcelos-Santos, D.V., Januário, J.N., Menezes-Souza, D., Fujiwara, R.T., and Vitor, R.W.A. (2013). Real-Time PCR as a Prognostic Tool for Human Congenital Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 2766–2768.
- Cottrell, G., Musset, L., Hubert, V., Le Bras, J., Clain, J., and Atovaquone-Proguanil Treatment Failure Study Group (2014). Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 4504–4514.
- Cox, F.E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* *3*, 5.
- Croft, S.L., Hogg, J., Gutteridge, W.E., Hudson, A.T., and Randall, A.W. (1992). The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* *30*, 827–832.
- Crookshanks, J.L., Taylor, S.M., Haines, D.M., and Shelton, G.D. (2007). Treatment of canine pediatric *Neospora caninum* myositis following immunohistochemical identification of tachyzoites in muscle biopsies. *Can. Vet. J.* *48*, 506–508.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, (American Society of Plant Physiologists), pp. 1250–1318.
- CTFT (1989). *Techniques rurales en Afrique. Mémento du Forestier*. Ministère Coop. Dév. Nogent-Sur-Marne 362–363.
- Dahija, S., Cakar, J., Vidic, D., Maksimović, M., and Parić, A. (2014). Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. extracts. *Nat. Prod. Res.* *28*, 2317–2320.
- Dahija, S., Haveric, S., Cakar, J., and Parić, A. (2016). Antimicrobial and cytotoxic activity of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *A. incana* (L.) Moench, and *A. viridis* (Chaix) DC. extracts. *J. Health Sci.* *6*, 100–104.
- Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L., and Rosenthal, P.J. (2006). Tetracyclines Specifically Target the Apicoplast of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3124–3131.
- Dajoz, R. (2006). *Précis d'écologie* (Dunod).
- D'Angelo, J.G., Bordón, C., Posner, G.H., Yolken, R., and Jones-Brando, L. (2009). Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* *in vitro* at multiple steps in the lytic cycle. *J. Antimicrob. Chemother.* *63*, 146–150.

- Dannemann, B., McCutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J., et al. (1992). Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann. Intern. Med.* *116*, 33–43.
- Dardé, M.-L. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita* *40*, 57–63.
- Dawes, E.J., Churcher, T.S., Zhuang, S., Sinden, R.E., and Basáñez, M.-G. (2009). Anopheles mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission. *Malar. J.* *8*, 228.
- Day, K.P., Artzy-Randrup, Y., Tiedje, K.E., Rougeron, V., Chen, D.S., Rask, T.S., Rorick, M.M., Migot-Nabias, F., Deloron, P., Luty, A.J.F., et al. (2017). Evidence of strain structure in *Plasmodium falciparum* var gene repertoires in children from Gabon, West Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E4103–E4111.
- De Craeye, S., Speybroeck, N., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Collinet, F., Tavernier, P., Van Gucht, S., Dorny, P., and Dierick, K. (2011). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Vet. Parasitol.* *178*, 64–69.
- De Pablos, L.M., González, G., Rodrigues, R., García Granados, A., Parra, A., and Osuna, A. (2010). Action of a pentacyclic triterpenoid, maslinic acid, against *Toxoplasma gondii*. *J. Nat. Prod.* *73*, 831–834.
- Debache, K., Guionaud, C., Alaeddine, F., Mevissen, M., and Hemphill, A. (2008). Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* *38*, 1455–1463.
- Delemarre, B.J., and van der Kaay, H.J. (1979). [Tropical malaria contracted the natural way in the Netherlands]. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* *123*, 1981–1982.
- Derouin, F. (2001). Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* *2*, 1368–1374.
- Derouin, F. (2005), for the Eurotox Groupe (panel 2). Systematic search and analysis of preclinical published data on *in vitro* and *in vivo* activities of antitoxoplasma drugs. [Unpublished report]. Bordeaux (France): The Eurotox Groupe.
- Derouin, F., Pelloux, H., and ESCMID Study Group on Clinical Parasitology (2008). Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *14*, 1089–1101.
- Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974a). Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* *290*, 1110–1116.
- Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974b). Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull. N. Y. Acad. Med.* *50*, 146–159.
- Desmonts, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J., and Lelong, M. (1965). [Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection]. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* *10*, 952–958.

- Di Cristina, M., Marocco, D., Galizi, R., Proietti, C., Spaccapelo, R., and Crisanti, A. (2008). Temporal and Spatial Distribution of *Toxoplasma gondii* Differentiation into Bradyzoites and Tissue Cyst Formation *In Vivo*. *Infect. Immun.* *76*, 3491–3501.
- Di Minno, G., Navarro, D., Perno, C.F., Canaro, M., Gürtler, L., Ironside, J.W., Eichler, H., and Tiede, A. (2017). Pathogen reduction/inactivation of products for the treatment of bleeding disorders: what are the processes and what should we say to patients? *Ann. Hematol.* *96*, 1253–1270.
- Dinić, J., Novaković, M., Podolski-Renić, A., Stojković, S., Mandić, B., Tešević, V., Vajs, V., Isaković, A., and Pešić, M. (2014). Antioxidative activity of diarylheptanoids from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) and their interaction with anticancer drugs. *Planta Med.* *80*, 1088–1096.
- Dinić, J., Randelović, T., Stanković, T., Dragoj, M., Isaković, A., Novaković, M., and Pešić, M. (2015). Chemo-protective and regenerative effects of diarylheptanoids from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) in human normal keratinocytes. *Fitoterapia* *105*, 169–176.
- Dinić, J., Novaković, M., Podolski-Renić, A., Vajs, V., Tešević, V., Isaković, A., and Pešić, M. (2016). Structural differences in diarylheptanoids analogues from *Alnus viridis* and *Alnus glutinosa* influence their activity and selectivity towards cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* *249*, 36–45.
- Doliwa, C., Escotte-Binet, S., Aubert, D., Velard, F., Schmid, A., Geers, R., and Villena, I. (2013). Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* *133*, 131–136.
- Donahoe, S.L., Lindsay, S.A., Krockenberger, M., Phalen, D., and Šlapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* *4*, 216–238.
- Dowse, T., and Soldati, D. (2004). Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* *7*, 388–396.
- Drakeley, C.J., Corran, P.H., Coleman, P.G., Tongren, J.E., McDonald, S.L.R., Carneiro, I., Malima, R., Lusingu, J., Manjurano, A., Nkya, W.M.M., et al. (2005). Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5108–5113.
- Dubey, J.P. (1995). Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* *81*, 410–415.
- Dubey, J.P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* *41*, 1–16.
- Dubey, J.P., and Beattie, C.P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton FL *CRC Press*.
- Dubey, J.P., and de Lahunta, A. (1993). Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl. Parasitol.* *34*, 229–233.
- Dubey, J.P., and Lindsay, D.S. (1993). Neosporosis. *Parasitol. Today Pers. Ed* *9*, 452–458.

- Dubey, J.P., and Lindsay, D.S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1–59.
- Dubey, J.P., and Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140, 1–34.
- Dubey, J.P., Miller, N.L., and Frenkel, J.K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* 132, 636–662.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., and Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269–1285.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., and Topper, M.J. (1988b). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259–1263.
- Dubey, J.P., Koestner, A., and Piper, R.C. (1990). Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 857–860.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998a). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267–299.
- Dubey, J.P., Dorrough, K.R., Jenkins, M.C., Liddell, S., Speer, C.A., Kwok, O.C., and Shen, S.K. (1998b). Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.* 28, 1293–1304.
- Dubey, J.P., Schares, G., and Ortega-Mora, L.M. (2007). Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 323–367.
- Duffy, S., Sykes, M.L., Jones, A.J., Shelper, T.B., Simpson, M., Lang, R., Poulsen, S.-A., Sleebs, B.E., and Avery, V.M. (2017). Screening the MMV Pathogen Box across multiple pathogens reclassifies starting points for open source drug discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Dujovne, C.A., Chan, C.H., and Zimmerman, H.J. (1967). Sulfonamide hepatic injury. Review of the literature and report of a case due to sulfamethoxazole. *N. Engl. J. Med.* 277, 785–788.
- Ebers, G.M., and Stern, L. (1875). Facsimile and partial translation of the ancient Papyrus Ebers. *Ebers Pap.*
- Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., and Johnson, A.M. (1994). The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 303–311.
- Fairhurst, R.M., and Dondorp, A.M. (2016). Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Microbiol. Spectr.* 4.
- Faustova, N.M., Faustova, M.E., and Dejneko, I.P. (2006). [Antibacterial activity of aspen bark extracts against some pneumotropic microorganisms]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 3–7.

- Ferguson, D.J., and Hutchison, W.M. (1981). Comparison of the development of avirulent and virulent strains of *Toxoplasma gondii* in the peritoneal exudate of mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 75, 539–546.
- Feugier, A., and Lerouxel, N. (2015). Oral Anti-Parasitic Composition. WO2015032922A1.
- Finland, M., Strauss, E., and Peterson, O.L. (1941). Sulfadiazine: Therapeutic evaluation and toxic effects on four hundred and forty-six patients. *J. Am. Med. Assoc.* 116, 2641–2647.
- Fleury de la Roche, A. (1937). Hêtre. In *Les Plantes Bienfaisantes*, (Paris), p. 183.
- Foley, M., and Tilley, L. (1998). Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol. Ther.* 79, 55–87.
- Fox, B.A., Belperron, A.A., and Bzik, D.J. (1999). Stable transformation of *Toxoplasma gondii* based on a pyrimethamine resistant trifunctional dihydrofolate reductase-cytosine deaminase-thymidylate synthase gene that confers sensitivity to 5-fluorocytosine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98, 93–103.
- Frédérich, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L., and Kiss, R. (2009). *In vitro* anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest. *Planta Med.* 75, 1634–1637.
- Freiburghaus, F., Ogwal, E.N., Nkunya, M.H., Kaminsky, R., and Brun, R. (1996). *In vitro* antitrypanosomal activity of African plants used in traditional medicine in Uganda to treat sleeping sickness. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 1, 765–771.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., and Miller, N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 893–896.
- Friesen, J., Borrmann, S., and Matuschewski, K. (2011). Induction of antimalaria immunity by pyrimethamine prophylaxis during exposure to sporozoites is curtailed by parasite resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2760–2767.
- Fromont, E.G., Riche, B., and Rabilloud, M. (2009). *Toxoplasma* seroprevalence in a rural population in France: detection of a household effect. *BMC Infect. Dis.* 9, 76.
- Fry, M., Hudson, A.T., Randall, A.W., and Williams, R.B. (1984). Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in *Eimeria tenella* (Apicomplexa: Coccidia). *Biochem. Pharmacol.* 33, 2115–2122.
- Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., and Hemphill, A. (1998). Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84, 753–758.
- Fyhrquist, P., Virjamo, V., Hiltunen, E., and Julkunen-Tiitto, R. (2017). Epidihydropinidine, the main piperidine alkaloid compound of Norway spruce (*Picea abies*) shows promising antibacterial and anti-*Candida* activity. *Fitoterapia* 117, 138–146.
- Gaillard, T., Dormoi, J., Madamet, M., and Pradines, B. (2016). Macrolides and associated antibiotics based on similar mechanism of action like lincosamides in malaria. *Malar. J.* 15.

- Gielen, M., Willem, R., Dalil, H., de Vos, D., Kuiper, C.M., and Peters, G.J. (1998). Toxicity profiles *in vivo* in mice and antitumour activity in tumour-bearing mice of di- and triorganotin compounds. *Met.-Based Drugs* 5, 83–90.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., and Zemlicka, D.E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 159–161.
- Granström, K.M. (2010). Underestimation of terpene exposure in the Nordic wood industry. *J. Occup. Environ. Hyg.* 7, 144–151.
- Gratzer, W.B. (1981). The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem. J.* 198, 1–8.
- Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., and Duffy, P.E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* 118, 1266–1276.
- Grieve, M. (1984). *A modern herbal* (Penguin).
- Grosjean, J. (1950). Substances with Fungicidal Activity in the Bark of Deciduous Tree. *Nature* 165, 853–854.
- Gubb, A.S. (1919). Accidental Transference of the Malarial Parasite in the Course of Transfusion. *Br. Med. J.* 2, 74–75.
- Gubbels, M.-J., Li, C., and Striepen, B. (2003). High-Throughput Growth Assay for *Toxoplasma gondii* Using Yellow Fluorescent Protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 309–316.
- Guionaud, C., Hemphill, A., Mevissen, M., and Alaeddine, F. (2010). Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. *Parasitology* 137, 1605–1619.
- Hadley, T.J., Klotz, F.W., Pasvol, G., Haynes, J.D., McGinniss, M.H., Okubo, Y., and Miller, L.H. (1987). *Falciparum* malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin A and B (MkMk). Strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. *J. Clin. Invest.* 80, 1190–1193.
- Hamzaoui, M., Renault, J.-H., Reynaud, R., and Hubert, J. (2013). Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: an efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 937, 7–12.
- Hamzaoui, M., Renault, J.-H., Nuzillard, J.-M., Reynaud, R., and Hubert, J. (2013b). Stepwise elution of a three-phase solvent system in centrifugal partition extraction: a new strategy for the fractionation and phytochemical screening of a crude bark extract. *Phytochem. Anal. PCA* 24, 367–373.
- Hay, W.H., Shell, L.G., Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (1990). Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 87–89.

- Hecker, Y.P., Cóceres, V., Wilkowsky, S.E., Jaramillo Ortiz, J.M., Morrell, E.L., Verna, A.E., Ganuza, A., Cano, D.B., Lischinsky, L., Angel, S.O., et al. (2014). A *Neospora caninum* vaccine using recombinant proteins fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 162, 142–153.
- Hemphill, A., and Gottstein, B. (1996). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol. Res.* 82, 497–504.
- Hemphill, A., Gottstein, B., and Kaufmann, H. (1996). Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112 (Pt 2), 183–197.
- Hemphill, A., Aguado-Martínez, A., and Müller, J. (2016). Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. *Parasitology* 143, 245–259.
- Herwaldt, B.L. (2001). Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 659–688.
- Hill, D., and Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 634–640.
- Hitziger, N., Dellacasa, I., Albiger, B., and Barragan, A. (2005). Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by *in vivo* bioluminescence imaging. *Cell. Microbiol.* 7, 837–848.
- Houston-Durrant, T., de Rigo, D., and Caudullo, G. (2016). *Alnus glutinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*, (Publication Office of the European Union), pp. e01f3c0+.
- Houzé, S. (2017). [Rapid diagnostic test for malaria]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 110, 49–54.
- Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566.
- Howe, D.K., Summers, B.C., and Sibley, L.D. (1996). Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64, 5193–5198.
- Huber, W., Bautz, W., Classen, M., and Schepp, W. (1995). [Pyrimethamine-sulfadiazine resistant cerebral toxoplasmosis in AIDS]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 120, 60–64.
- Hubert, J., Nuzillard, J.M., Purson, S., Hamzaoui, M., Borie, N., Reynaud, R., and Renault, J.H. (2014). Identification of natural metabolites in mixture: a pattern recognition strategy based on (13)C NMR. *Anal. Chem.* 86, 2955–2962.
- Hubert, J., Angelis, A., Aligiannis, N., Rosalia, M., Abedini, A., Bakiri, A., Reynaud, R., Nuzillard, J.M., Gangloff, S.C., Skaltsounis, A.L., et al. (2016). *In Vitro* Dermo-Cosmetic Evaluation of Bark Extracts from Common Temperate Trees. *Planta Med.* 82, 1351–1358.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 766–778.

- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., and Work, K. (1969). Life cycle of *Toxoplasma gondii*. Br. Med. J. 4, 806.
- Idro, R., Marsh, K., John, C.C., and Newton, C.R. (2010). Cerebral Malaria; Mechanisms Of Brain Injury And Strategies For Improved Neuro-Cognitive Outcome. Pediatr. Res. 68, 267–274.
- Ingram-Sieber, K., Cowan, N., Panic, G., Vargas, M., Mansour, N.R., Bickle, Q.D., Wells, T.N.C., Spangenberg, T., and Keiser, J. (2014). Orally active antischistosomal early leads identified from the open access malaria box. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e2610.
- Isah, M.B., Ibrahim, M.A., Mohammed, A., Aliyu, A.B., Masola, B., and Coetzer, T.H.T. (2016). A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases. Parasitology 143, 1219–1231.
- Ishikawa, Y., Kozakai, T., Morita, H., Saida, K., Oka, S., and Masuo, Y. (2006). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 42, 63–69.
- Janku, J. (1923). Pathogens a pathologica anatomie tak nazvaneho vrozenko kolobou zlute skvrny v oku normalne velikem a mikrophthalmickem s nalezem parisitu v sitnici. Cas Lek Ses 62, 1021–1027.
- Jardine, J.E. (1996). The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. Vet. Parasitol. 62, 231–240.
- Jelinek, T., Schelbert, P., Löscher, T., and Eichenlaub, D. (1995). Quinine resistant *falciparum* malaria acquired in east Africa. Trop. Med. Parasitol. Off. Organ Dtsch. Tropenmedizinische Ges. Dtsch. Ges. Tech. Zusammenarbeit GTZ 46, 38–40.
- Jiménez-Díaz, M.B., Viera, S., Ibáñez, J., Mulet, T., Magán-Marchal, N., Garuti, H., Gómez, V., Cortés-Gil, L., Martínez, A., Ferrer, S., et al. (2013). A new *in vivo* screening paradigm to accelerate antimalarial drug discovery. PloS One 8, e66967.
- Jin, C., Kaewintajuk, K., Jiang, J., Jeong, W., Kamata, M., Kim, H.-S., Wataya, Y., and Park, H. (2009). *Toxoplasma gondii*: a simple high-throughput assay for drug screening *in vitro*. Exp. Parasitol. 121, 132–136.
- Jin, C., Jung, S.Y., Kim, S.Y., Song, H.O., and Park, H. (2012). Simple and efficient model systems of screening anti-*Toxoplasma* drugs *in vitro*. Expert Opin. Drug Discov. 7, 195–205.
- Johnson, M., and Maggiora, G. (1990). Concepts and applications of molecular similarity. Am. Chem. Soc.
- Jones, J.L., and Dubey, J.P. (2010). Waterborne toxoplasmosis--recent developments. Exp. Parasitol. 124, 10–25.
- Jones, J.L., Parise, M.E., and Fiore, A.E. (2014). Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 90, 794–799.

- Jossang, A., Jossang, P., and Bodo, B. (1994). Cinnamrutinoses A and B, glycosides of *Populus tremula*. *Phytochemistry* 35, 547–549.
- Jung, C., Lee, C.Y.-F., and Grigg, M.E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int. J. Parasitol.* 34, 285–296.
- Kaneshiro, E.S., Sul, D., Basselin, M., and Kayser, O. (2001). *Pneumocystis carinii* synthesizes four ubiquinone homologs: inhibition by atovaquone and buparvaquone but not by stigmatellin. *J. Eukaryot. Microbiol. Suppl.* 172S–173S.
- Kasper, L.H., and Buzoni-Gatel, D. (1998). Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol. Today.* 14, 150–156.
- Kasper, L.H., and Ware, P.L. (1985). Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.* 75, 1570–1577.
- Kastenmüller, K., Espinosa, D.A., Trager, L., Stoyanov, C., Salazar, A.M., Pokalwar, S., Singh, S., Dutta, S., Ockenhouse, C.F., Zavala, F., et al. (2013). Full-Length *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Administered with Long-Chain Poly(I·C) or the Toll-Like Receptor 4 Agonist Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-Stable Emulsion Elicits Potent Antibody and CD4+ T Cell Immunity and Protection in Mice. *Infect. Immun.* 81, 789–800.
- Kaufman, H.E., Remington, J.S., and Jacobs, L. (1958). Toxoplasmosis: the nature of virulence. *Am. J. Ophthalmol.* 46, 255-260; discussion 260-261.
- Kelava, T., Čavar, I., and Čulo, F. (2011). Biological actions of drug solvents. *Period. Biol.* 113, 311–320.
- Kelly, K. (2009). History of medicine. N. Y. Facts File 29–50.
- Kidgell, C., Volkman, S.K., Daily, J., Borevitz, J.O., Plouffe, D., Zhou, Y., Johnson, J.R., Le Roch, K.G., Sarr, O., Ndir, O., et al. (2006). A Systematic Map of Genetic Variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 2, e57.
- Kiszewski, A.E. (2010). Blocking *Plasmodium falciparum* Malaria Transmission with Drugs: The Gametocytocidal and Sporontocidal Properties of Current and Prospective Antimalarials. *Pharmaceuticals* 4, 44–68.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., and Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 935–949.
- Kitchen, L.W., Vaughn, D.W., and Skillman, D.R. (2006). Role of US military research programs in the development of US Food and Drug Administration--approved antimalarial drugs. *Clin. Infect. Dis.* 43, 67–71.
- Klonis, N., Crespo-Ortiz, M.P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P.J., and Tilley, L. (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11405–11410.

- Krylova, S.G., Zueva, E.P., Razina, T.G., Amosova, E.N., Gridneva, V.I., and Turetskova, V.F. (2000). [Effect of the dry aspen bark extract on the gastric secretory function]. *Eksp. Klin. Farmakol.* 63, 31–33.
- Kühn, D., and Weiland, G. (1969). [Experimental *Toxoplasma* infections in cats. I. Repeated transmission of *Toxoplasma gondii* through feces of cats infected by nematodes]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 82, 401–404.
- Kuliev, Z.A., Vdovin, A.D., Abdullaev, N.D., Makhmatkulov, A.B., and Malikov, V.M. (1997). Study of the catechins and proanthocyanidins of *Quercus robur*. *Chem. Nat. Compd.* 33, 642–652.
- Lamarque, M.H., Roques, M., Kong-Hap, M., Tonkin, M.L., Rugarabamu, G., Marq, J.-B., Penarete-Vargas, D.M., Boulanger, M.J., Soldati-Favre, D., and Lebrun, M. (2014). Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites. *Nat. Commun.* 5, 4098.
- Launert, E. (1981). *Edible and Medicinal Plants* (Hamlyn).
- Laveran, A. (1881). Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. J-B Baillièrre Fils.
- Ledermann, D.W. (2008). [Laveran, Marchiafava and paludism]. *Rev. Chil. Infectologia Organo Of. Soc. Chil. Infectologia* 25, 216–221.
- Leech, J.H., Barnwell, J.W., Aikawa, M., Miller, L.H., and Howard, R.J. (1984). *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *J. Cell Biol.* 98, 1256–1264.
- Legros, F., Gay, F., Belkaid, M., and Danis, M. (1997). Paludisme in France Métropolitaine en 1996. Centre National de Référence pour les Maladies d'Importation. *Bull. CNRMI* 13, 1–60.
- Lehmann, T., Blackston, C.R., Parmley, S.F., Remington, J.S., and Dubey, J.P. (2000). Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.* 86, 960–971.
- León-Gonzalez, A.J., Acero, N., Muñoz-Mingarro, D., López-Lázaro, M., and Martín-Cordero, C. (2014). Cytotoxic activity of hirsutanone, a diarylheptanoid isolated from *Alnus glutinosa* leaves. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 21, 866–870.
- Li, W., Liu, J., Wang, J., Fu, Y., Nan, H., and Liu, Q. (2015). Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 114, 2893–2902.
- Lim, L., and McFadden, G.I. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 749–763.
- Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (1989a). Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J. Parasitol.* 75, 990–992.
- Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (1989b). *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.* 75, 772–779.

- Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (1990). Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.* 76, 177–179.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., and Dubey, J.P. (1992). Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol.* 78, 70–72.
- Lindsay, D.S., Butler, J.M., Rippey, N.S., and Blagburn, B.L. (1996). Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. *Am. J. Vet. Res.* 57, 68–72.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., and Dubey, J.P. (1999). A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int. J. Parasitol.* 29, 1521–1523.
- Low, J.L., Wu, M.-L., Aziz, D.B., Laleu, B., and Dick, T. (2017). Screening of TB Actives for Activity against Nontuberculous Mycobacteria Delivers High Hit Rates. *Front. Microbiol.* 8, 1539.
- Lozano-Mena, G., Sánchez-González, M., Juan, M.E., and Planas, J.M. (2014). Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives--a promising nutraceutical? *Mol. Basel Switz.* 19, 11538–11559.
- Luft, B.J., and Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15, 211–222.
- Lunde, M.N., and Jacobs, L. (1983). Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 69, 806–808.
- Lust, J. (1983). *The Herb Book* (Bantam Books).
- Maazoun, F., Deschamps, O., Barros-Kogel, E., Ngwem, E., Fauchet, N., Buffet, P., and Froissart, A. (2015). [Hyper-reactive malarial splenomegaly]. *Rev. Med. Interne* 36, 753–759.
- MacGregor, W.S. (1967). The chemical and physical properties of DMSO. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141, 3–12.
- Maghrani, M., Zeggwagh, N.-A., Lemhadri, A., El Amraoui, M., Michel, J.-B., and Eddouks, M. (2004). Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 91, 309–316.
- Makler, M.T., Piper, R.C., and Milhous, W.K. (1998). Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. *Parasitol. Today Pers. Ed* 14, 376–377.
- Mämmelä, P. (2001). Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *The Analyst* 126, 1535–1538.
- Manger, I.D., Hehl, A.B., and Boothroyd, J.C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* 66, 2237–2244.

- Mangold, K.A., Manson, R.U., Koay, E.S.C., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R.B., Peterson, L.R., and Kaul, K.L. (2005). Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium spp.* J. Clin. Microbiol. 43, 2435–2440.
- Markina, O.V., Alekseeva, L.P., and Markin, N.V. (2013). [Effect of plant extracts on cytotoxic activity of *Vibrio cholerae* hemolysin]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 10–16.
- Markus, M.B. (2011). Malaria: origin of the term “hypnozoite.” J. Hist. Biol. 44, 781–786.
- Marsh, A.E., Howe, D.K., Wang, G., Barr, B.C., Cannon, N., and Conrad, P.A. (1999). Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. Int. J. Parasitol. 29, 1575–1582.
- Martin, S.K., Rajasekariah, G.-H., Awinda, G., Waitumbi, J., and Kifude, C. (2009). Unified parasite lactate dehydrogenase and histidine-rich protein ELISA for quantification of *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 80, 516–522.
- Martin, Y.C., Bustard, T.M., and Lynn, K.R. (1973). Relationship between physical properties and antimalarial activities of 1,4-naphthoquinones. J. Med. Chem. 16, 1089–1093.
- Martins-Duarte, E.D.S., de Souza, W., and Vommaro, R.C. (2008). Itraconazole affects *Toxoplasma gondii* endodyogeny. FEMS Microbiol. Lett. 282, 290–298.
- Marugán-Hernández, V., Alvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Regidor-Cerrillo, J., and Ortega-Mora, L.M. (2010). Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. Proteomics 10, 1740–1750.
- von Maydell, H.J. (1983). Arbres et arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et leurs utilisations. GTZ 532.
- Mayer, F.L., and Kronstad, J.W. (2017). Discovery of a Novel Antifungal Agent in the Pathogen Box. mSphere 2.
- Mayhew, I.G., Smith, K.C., Dubey, J.P., Gatward, L.K., and McGlennon, N.J. (1991). Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. J. Small Anim. Pract. 32, 609–612.
- Mazoir, N., Benharref, A., Bailén, M., Reina, M., González-Coloma, A., and Martínez-Díaz, R.A. (2011). Antileishmanial and antitrypanosomal activity of triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. Z. Naturforschung C J. Biosci. 66, 360–366.
- Mazumdar, S., Mukherjee, P., Yazdani, S.S., Jain, S.K., Mohammed, A., and Chauhan, V.S. (2010). *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1)-MSP-3 chimeric protein: immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. Infect. Immun. 78, 872–883.
- Mazuz, M.L., Fish, L., Wolkomirsky, R., Leibovich, B., Reznikov, D., Savitsky, I., Golenser, J., and Shkap, V. (2015). The effect of a live *Neospora caninum* tachyzoite vaccine in naturally infected pregnant dairy cows. Prev. Vet. Med. 120, 232–235.

- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., and McGuire, A.M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473–1478.
- McCann, C.M., Vyse, A.J., Salmon, R.L., Thomas, D., Williams, D.J.L., McGarry, J.W., Pebody, R., and Trees, A.J. (2008). Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans, England. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 978–980.
- McFadden, D.C., Tomavo, S., Berry, E.A., and Boothroyd, J.C. (2000). Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 1–12.
- McHardy, N., Wekesa, L.S., Hudson, A.T., and Randall, A.W. (1985). Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. *Res. Vet. Sci.* 39, 29–33.
- McLeod, R., Boyer, K., Karrison, T., Kasza, K., Swisher, C., Roizen, N., Jalbrzikowski, J., Remington, J., Heydemann, P., Noble, A.G., et al. (2006). Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1383–1394.
- McMillan, P.J., Millet, C., Batinovic, S., Maiorca, M., Hanssen, E., Kenny, S., Muhle, R.A., Melcher, M., Fidock, D.A., Smith, J.D., et al. (2013). Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* 15, 1401–1418.
- Meerburg, B.G., De Craeye, S., Dierick, K., and Kijlstra, A. (2012). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 184, 317–320.
- Melcher, M., Muhle, R.A., Henrich, P.P., Kraemer, S.M., Avril, M., Vigan-Womas, I., Mercereau-Pujalon, O., Smith, J.D., and Fidock, D.A. (2010). Identification of a Role for the PfEMP1 Semi-Conserved Head Structure in Protein Trafficking to the Surface of *Plasmodium falciparum* Infected Red Blood Cells. *Cell. Microbiol.* 12, 1446–1462.
- Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., and Amino, R. (2013). Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 701–712.
- Meneceur, P., Bouldouyre, M.-A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin, J.-F., and Derouin, F. (2008). *In vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1269–1277.
- Menotti, J., Garin, Y.J.-F., Thulliez, P., Sérugue, M.-C., Stanislawiak, J., Ribaud, P., de Castro, N., Houzé, S., and Derouin, F. (2010). Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 363–368.
- Mercier, C., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W., and Delauw, M.-F.-C. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35, 829–849.
- Merli, A., Canessa, A., and Melioli, G. (1985). Enzyme immunoassay for evaluation of *Toxoplasma gondii* growth in tissue culture. *J. Clin. Microbiol.* 21, 88–91.

- Meyer, B., Schneider, W., and Elstner, E.F. (1995). Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneimittelforschung*. *45*, 174–176.
- Mineo, J.R., and Kasper, L.H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* *79*, 11–20.
- Mita, T., and Tanabe, K. (2012). Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. *Jpn. J. Infect. Dis.* *65*, 465–475.
- Mohammed, H., Mindaye, T., Belayneh, M., Kassa, M., Assefa, A., Tadesse, M., Woyessa, A., Mengesha, T., and Kebede, A. (2015). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on MSP-1 and MSP-2 genes from Kolla-Shele area, Arbaminch Zuria District, southwest Ethiopia. *Malar. J.* *14*.
- Moneriz, C., Marín-García, P., García-Granados, A., Bautista, J.M., Diez, A., and Puyet, A. (2011). Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malar. J.* *10*, 82.
- Monney, T., Debache, K., and Hemphill, A. (2011). Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. *Anim. Open Access J. MDPI* *1*, 306–325.
- Montó, F., Arce, C., Noguera, M.A., Ivorra, M.D., Flanagan, J., Roller, M., Issaly, N., and D’Ocon, P. (2014). Action of an extract from the seeds of *Fraxinus excelsior* L. on metabolic disorders in hypertensive and obese animal models. *Food Funct.* *5*, 786–796.
- Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*. *363*, 1965–1976.
- Montoya, J.G., and Remington, J.S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *47*, 554–566.
- Moody, A. (2002). Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 66–78.
- Moretti, G., Favarel-Garrigues, J.C., Broustet, A., and Veyret, V. (1974). [Invasive malaria with hemoglobinuric bilious fever. Apropos of a fatal case]. *Sem. Hopitaux Organe Fonde Par Assoc. Enseign. Med. Hopitaux Paris* *50*, 989–997.
- de Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M.G., Wada, M.Y., Jones, J.L., Tuboi, S.H., Carmo, E.H., Ramalho, W.M., Camargo, N.J., Trevisan, R., Graça, R.M.T., et al. (2006). Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 326–329.
- Müller, J., and Hemphill, A. (2013). *In vitro* culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* *43*, 115–124.
- Müller, J., Aguado-Martinez, A., Manser, V., Balmer, V., Winzer, P., Ritler, D., Hostettler, I., Arranz-Solís, D., Ortega-Mora, L., and Hemphill, A. (2015). Buparvaquone is active against *Neospora caninum* *in vitro* and in experimentally infected mice. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* *5*, 16–25.

- Müller, J., Aguado-Martínez, A., Manser, V., Wong, H.N., Haynes, R.K., and Hemphill, A. (2016). Repurposing of antiparasitic drugs: the hydroxy-naphthoquinone buparvaquone inhibits vertical transmission in the pregnant neosporosis mouse model. *Vet. Res.* *47*, 32.
- Müller, J., Aguado, A., Laleu, B., Balmer, V., Ritler, D., and Hemphill, A. (2017). *In vitro* screening of the open source Pathogen Box identifies novel compounds with profound activities against *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* *47*, 801–809.
- Murata, Y., Sugi, T., Weiss, L.M., and Kato, K. (2017). Identification of compounds that suppress *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites. *PLoS ONE* *12*.
- Murphy, M.W., Dunton, R.F., Perich, M.J., and Rowley, W.A. (2001). Attraction of *Anopheles* (Diptera: culicidae) to volatile chemicals in Western Kenya. *J. Med. Entomol.* *38*, 242–244.
- Murphy, S.C., Prentice, J.L., Williamson, K., Wallis, C.K., Fang, F.C., Fried, M., Pinzon, C., Wang, R., Talley, A.K., Kappe, S.H.I., et al. (2012). Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR for Monitoring of Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infections in Malaria Human Challenge Trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *86*, 383–394.
- Mzabi, A., Escotte-Binet, S., Le Naour, R., Ortis, N., Audonnet, S., Dardé, M.-L., Aubert, D., and Villena, I. (2015). Optimization of the cryopreservation of biological resources, *Toxoplasma gondii* tachyzoites, using flow cytometry. *Cryobiology* *71*, 459–463.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Schares, G., Conraths, F.J., Björkman, C., and Hemphill, A. (2001). *Neospora caninum* Microneme Protein NcMIC3: Secretion, Subcellular Localization, and Functional Involvement in Host Cell Interaction. *Infect. Immun.* *69*, 6483–6494.
- Nam, H.W. (2009). GRA Proteins of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of Host-Parasite Interactions across the Parasitophorous Vacuolar Membrane. *Korean J. Parasitol.* *47*, S29–S37.
- Ndjonka, D., Bergmann, B., Agyare, C., Zimbres, F.M., Lüersen, K., Hensel, A., Wrenger, C., and Liebau, E. (2012). *In vitro* activity of extracts and isolated polyphenols from West African medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* *111*, 827–834.
- Ndjonka, D., Rapado, L.N., Silber, A.M., Liebau, E., and Wrenger, C. (2013). Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 3395–3439.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., and O'Connor, G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* *83*, 85–98.
- Nicolle, C., and Manceaux, L. (1908). Sur une infection {à} corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci* *147*.
- Nicu, A.I., Pirvu, L., Vamanu, A., and Stoian, G. (2016). The European beech leaves extract has an antibacterial effect by inducing oxidative stress. *Romanian Biotechnol. Lett.* *22*, 12071–12080.
- Nishikawa, Y., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., and Mikami, T. (2000). Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *Int. J. Parasitol.* *30*, 51–58.

- Nishikawa, Y., Kousaka, Y., Tragoolpua, K., Xuan, X., Makala, L., Fujisaki, K., Mikami, T., and Nagasawa, H. (2001). Characterization of *Neospora caninum* Surface Protein NcSRS2 Based on Baculovirus Expression System and Its Application for Serodiagnosis of *Neospora* Infection. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 3987–3991.
- Nogareda, F., Le Strat, Y., Villena, I., De Valk, H., and Goulet, V. (2014). Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980–2020: model-based estimation. *Epidemiol. Infect.* *142*, 1661–1670.
- Nogueira, F., Gil, J.P., and Rosário, V.E. (2006). Efflux pumps of antimalarial-resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antibiotiques* *8*, 85–92.
- Nosál'ova, G., Jureček, L., Turjan, J., Capek, P., Prisenžňáková, L., and Fraňová, S. (2014). The cough suppressive activity of sulfated glucuronoxylan from *Fagus sylvatica* L. *Int. J. Biol. Macromol.* *67*, 312–317.
- Nosten, F., Hien, T.T., and White, N.J. (1998). Use of artemisinin derivatives for the control of malaria. *Med. Trop. Rev. Corps Sante Colon.* *58*, 45–49.
- O'Boyle, N.M., and Sayle, R.A. (2016). Comparing structural fingerprints using a literature-based similarity benchmark. *J. Cheminformatics* *8*.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* *267*, 5421–5426.
- Okpekon, T., Yolou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Bories, C., Grellier, P., Frappier, F., Laurens, A., and Hocquemiller, R. (2004). Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *J. Ethnopharmacol.* *90*, 91–97.
- Oliveira, C.B., Meurer, Y.S., Andrade, J.M., Costa, M.E., Andrade, M.M., Silva, L.A., Lanza, D.C., Vítor, R.W., and Andrade-Neto, V.F. (2016). Pathogenicity and phenotypic sulfadiazine resistance of *Toxoplasma gondii* isolates obtained from livestock in northeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *111*, 391–398.
- OMS. Organisation Mondiale de la Santé (2011). Rapport sur le paludisme dans le monde 2011 : résumé.
- OMS. Organisation Mondiale de la Santé (2017). Rapport sur le paludisme dans le monde 2016 : résumé.
- Owusu-Ofori, A.K., Parry, C., and Bates, I. (2010). Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from sub-Saharan Africa. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *51*, 1192–1198.
- Pages, F., Orlandi-Pradines, E., and Corbel, V. (2007). [Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]. *Med. Mal. Infect.* *37*, 153–161.
- Pan, H., and Lundgren, L.N. (1995). Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*. *Phytochemistry* *39*, 1423–1428.

- Paredes-Santos, T.C., de Souza, W., and Attias, M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *J. Struct. Biol.* *177*, 420–430.
- Pastor-Fernández, I., Arranz-Solís, D., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Hemphill, A., García-Culebras, A., Cuevas-Martín, C., and Ortega-Mora, L.M. (2015). A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. *Vet. Parasitol.* *207*, 203–215.
- Pastor-Fernández, I., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., Marugán-Hernández, V., Hemphill, A., and Ortega-Mora, L.M. (2016). Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle. *Parasitology* *143*, 97–113.
- Pereira, D.A., and Williams, J.A. (2007). Origin and evolution of high throughput screening. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 53–61.
- Pereira, L.M., Baroni, L., and Yatsuda, A.P. (2014). A transgenic *Neospora caninum* strain based on mutations of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Exp. Parasitol.* *138*, 40–47.
- Pereira, L.M., Vigato-Ferreira, I.C., DE Luca, G., Bronzon DA Costa, C.M., and Yatsuda, A.P. (2017). Evaluation of methylene blue, pyrimethamine and its combination on an *in vitro* *Neospora caninum* model. *Parasitology* *144*, 827–833.
- Pérez, A.J., Pecio, Ł., Kowalczyk, M., Kontek, R., Gajek, G., Stopinsek, L., Mirt, I., Oleszek, W., and Stochmal, A. (2017). Triterpenoid Components from Oak Heartwood (*Quercus robur*) and Their Potential Health Benefits. *J. Agric. Food Chem.* *65*, 4611–4623.
- Perrin, L.H., Merkli, B., Gabra, M.S., Stocker, J.W., Chizzolini, C., and Richle, R. (1985). Immunization with a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen induces a partial immunity in monkeys. *J. Clin. Invest.* *75*, 1718–1721.
- Pescador, C.A., Corbellini, L.G., Oliveira, E.C., Raymundo, D.L., and Driemeier, D. (2007). Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* *150*, 159–163.
- Peters, M., Lütkefels, E., Heckerth, A.R., and Schares, G. (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* *31*, 1144–1148.
- Petersen, E., Lebech, M., Jensen, L., Lind, P., Rask, M., Bagger, P., Björkman, C., and Uggla, A. (1999). *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg. Infect. Dis.* *5*, 278–280.
- Pferschy-Wenzig, E.M., Kunert, O., Presser, A., and Bauer, R. (2008). *In vitro* anti-inflammatory activity of larch (*Larix decidua* L.) sawdust. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 11688–11693.
- Phillips, M.A., and Rathod, P.K. (2010). *Plasmodium* dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. *Infect. Disord. Drug Targets* *10*, 226–239.

- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Rosado, M.E., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K.Y., Giménez-Turba, A., Salamanca, E., and Peña-Rodríguez, L.M. (2013). Synergistic Effect of Lupenone and Caryophyllene Oxide against *Trypanosoma cruzi*. Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2013.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A.D., and Meuwissen, J.H. (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to *in vitro* culture. Trop. Geogr. Med. 33, 50–54.
- Popov, V.M., Chan, D.C.M., Fillingham, Y.A., Atom Yee, W., Wright, D.L., and Anderson, A.C. (2006). Analysis of complexes of inhibitors with *Cryptosporidium hominis* DHFR leads to a new trimethoprim derivative. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 4366–4370.
- Portes, J.A., Souza, T.G., dos Santos, T.A.T., da Silva, L.L.R., Ribeiro, T.P., Pereira, M.D., Horn, A., Fernandes, C., DaMatta, R.A., de Souza, W., et al. (2015). Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron (III) Compound. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 7374–7386.
- Preston, S., Jiao, Y., Jabbar, A., McGee, S.L., Laleu, B., Willis, P., Wells, T.N.C., and Gasser, R.B. (2016). Screening of the “Pathogen Box” identifies an approved pesticide with major anthelmintic activity against the barber’s pole worm. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 6, 329–334.
- Price, R.N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., et al. (2004). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. Lancet 364, 438–447.
- Pujol, C.A., Damonte, E.B., Turjan, J., Yanbo, K.Z., and Capek, P. (2016). The antiviral potency of *Fagus sylvatica* 4OMe-glucuronoxylan sulfates. Int. J. Biol. Macromol. 87, 195–200.
- Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., Jerome, M.E., Roos, D.S., and White, M.W. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 115, 165–175.
- Radojica Rovčanin, B., Čebović, T., Stešević, D., Kekic, D., and Ristić, M. (2015). Antibacterial effect of *Herniaria hirsuta*, *Prunus avium*, *Rubia tinctorum* and *Sempervivum tectorum* plant extracts on multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. Biosci. J. 31, 1852–1861.
- Rautio, M., Sipponen, A., Peltola, R., Lohi, J., Jokinen, J.J., Papp, A., Carlson, P., and Sipponen, P. (2007). Antibacterial effects of home-made resin salve from Norway spruce (*Picea abies*). APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 115, 335–340.
- Rautio, M., Sipponen, A., Lohi, J., Lounatmaa, K., Koukila-Kähkölä, P., and Laitinen, K. (2012). *In vitro* fungistatic effects of natural coniferous resin from Norway spruce (*Picea abies*). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31, 1783–1789.
- Razina, T.G., Krylova, S.G., Zueva, E.P., Amosova, E.N., and Turetskova, V.F. (1998). [The potential use of an extract of aspen bark for enhancing the efficacy of specific treatment methods in experimental malignant neoplasms]. Eksp. Klin. Farmakol. 61, 42–44.

- Reichel, M.P., and Ellis, J.T. (2009). *Neospora caninum*--how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int. J. Parasitol.* 39, 1173–1187.
- Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L.F.P., and Ellis, J.T. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43, 133–142.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Könen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., et al. (2012). Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog.* 8, e1002567.
- Repas, A., and Nikolin, B. (1968). The separation of phenolic glucosides and carbohydrates from the bark of *Populus tremula* by gel filtration. *J. Chromatogr.* 35, 99–100.
- Reynolds, M.G., Oh, J., and Roos, D.S. (2001). *In vitro* generation of novel pyrimethamine resistance mutations in the *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1271–1277.
- Robinson, S.A., Smith, J.E., and Millner, P.A. (2004). *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): *in vitro* analysis of host cell binding. *Parasitology* 128, 391–396.
- Rodríguez, J.C.P., Uribe, G.Á., Araújo, R.M., Narváez, P.C., and Valencia, S.H. (2011). Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1, 114–122.
- Roestenberg, M., Remarque, E., de Jonge, E., Hermsen, R., Blythman, H., Leroy, O., Imoukhuede, E., Jepsen, S., Ofori-Anyinam, O., Faber, B., et al. (2008). Safety and Immunogenicity of a Recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1 Malaria Vaccine Adjuvanted with AlhydrogelTM, Montanide ISA 720 or AS02. *PLoS ONE* 3.
- Romero, J.J., Pérez, E., and Frankena, K. (2004). Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 123, 149–159.
- Roper, C., Pearce, R., Nair, S., Sharp, B., Nosten, F., and Anderson, T. (2004). Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 305, 1124.
- Rueda, L., Castellote, I., Castro-Pichel, J., Chaparro, M.J., de la Rosa, J.C., Garcia-Perez, A., Gordo, M., Jimenez-Diaz, M.B., Kessler, A., Macdonald, S.J.F., et al. (2011). Cyclopropyl Carboxamides: A New Oral Antimalarial Series Derived from the Tres Cantos Anti-Malarial Set (TCAMS). *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 840–844.
- Russo, R., Autore, G., and Severino, L. (2009). Pharmaco-toxicological aspects of herbal drugs used in domestic animals. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1777–1784.
- de Sá, M.S., Costa, J.F.O., Krettli, A.U., Zalis, M.G., Maia, G.L. de A., Sette, I.M.F., Câmara, C. de A., Filho, J.M.B., Giulietti-Harley, A.M., Ribeiro Dos Santos, R., et al. (2009). Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol. Res.* 105, 275–279.

- Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B.Y., Maimunah, A., and Rahmah, N. (2010). Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop. Biomed.* 27, 125–130.
- Sabin, A.B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116, 801–807.
- Sabin, A.B., and Feldman, H.A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108, 660–663.
- Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J.F., and Schwartzman, J.D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39, 526–530.
- Sahr, F., Willoughby, V.R., Gbakima, A.A., and Bockarie, M.J. (2001). Apparent drug failure following artesunate treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Freetown, Sierra Leone: four case reports. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 445–449.
- Salem, M.Z.M., Elansary, H.O., Elkelish, A.A., Zeidler, A., Ali, H.M., El-Hefny, M., and Yessoufou, K. (2016). *In vitro* bioactivity and antimicrobial activity of *Picea abies* and *Larix decidua* wood and bark extracts. *Bioresources* 11, 9421–9437.
- Salimi, M., Shojaee, S., Keshavarz, H., and Mohebbali, M. (2016). Cyst Formation from Virulent RH Strain of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite: *In Vitro* Cultivation. *Iran. J. Parasitol.* 11, 81–85.
- Sams-Dodd, F. (2005). Target-based drug discovery: is something wrong? *Drug Discov. Today* 10, 139–147.
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., and Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1035–1041.
- Sanz, L.M., Jiménez-Díaz, M.B., Crespo, B., De-Cozar, C., Almela, M.J., Angulo-Barturen, I., Castañeda, P., Ibañez, J., Fernández, E.P., Ferrer, S., et al. (2011). Cyclopropyl carboxamides, a chemically novel class of antimalarial agents identified in a phenotypic screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5740–5745.
- Sardari, S., Shokrgozar, M.A., and Ghavami, G. (2009). Cheminformatics based selection and cytotoxic effects of herbal extracts. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23, 1412–1421.
- Sati, S.C., Sati, N., and Sati, O.P. (2011). Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. *Pharmacogn. Rev.* 5, 174–183.
- Schantz-Dunn, J., and Nour, N.M. (2009). Malaria and Pregnancy: A Global Health Perspective. *Rev. Obstet. Gynecol.* 2, 186–192.
- Schares, G., Dubremetz, J.F., Dubey, J.P., Bärwald, A., Loyens, A., and Conraths, F.J. (1999). *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* 92, 109–119.
- Scheibel, L.W., Ashton, S.H., and Trager, W. (1979). *Plasmodium falciparum*: microaerophilic requirements in human red blood cells. *Exp. Parasitol.* 47, 410–418.

- Schempp, H., Weiser, D., and Elstner, E.F. (2000). Biochemical model reactions indicative of inflammatory processes. Activities of extracts from *Fraxinus excelsior* and *Populus tremula*. *Arzneimittelforschung*. 50, 362–372.
- Schock, A., Innes, E.A., Yamane, I., Latham, S.M., and Wastling, J.M. (2001). Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 123, 13–23.
- Schuster, F.L. (2002). Cultivation of *Plasmodium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 355–364.
- Schwöbel, B., Alifrangis, M., Salanti, A., and Jelinek, T. (2003). Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *in vivo*: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential *in vivo* resistance marker. *Malar. J.* 2, 5.
- Sereno, D., Roy, G., Lemesre, J.L., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2001). DNA Transformation of *Leishmania infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1168–1173.
- Serge, K.B., Serges, O.A., Ludovic, M., Elvis, O.N., Bernardin, A., Francis, F., and Alfred, T. (2015). *In vitro* behaviour of *Plasmodium falciparum* strains by alkaloids and tannins extracted from root of *Mitragyna inermis*, a medicinal plant. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 7.
- Shakhmatov, E.G., Belyy, V.A., and Makarova, E.N. (2017). Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from Norway spruce (*Picea abies*). *Carbohydr. Polym.* 175, 699–711.
- Sheridan, R.E., Deshpande, S.S., and Smith, T. (1999). Comparison of *in vivo* and *in vitro* mouse bioassays for botulinum toxin antagonists. *J. Appl. Toxicol. JAT 19 Suppl 1*, S29-33.
- Sibley, L.D., and Boothroyd, J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85.
- Sibley, C.H., Hyde, J.E., Sims, P.F., Plowe, C.V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., and Nzila, A.M. (2001). Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol.* 17, 582–588.
- Sidhu, A.B.S., Verdier-Pinard, D., and Fidock, D.A. (2002). Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by *pfprt* Mutations. *Science* 298, 210–213.
- Singh, B., and Daneshvar, C. (2013). Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 165–184.
- Singh, G., and Sehgal, R. (2010). Transfusion-transmitted parasitic infections. *Asian J. Transfus. Sci.* 4, 73–77.
- Sinnis, P., and Nardin, E. (2002). Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein. *Chem. Immunol.* 80, 70–96.
- Sipponen, A., Jokinen, J.J., Sipponen, P., Papp, A., Sarna, S., and Lohi, J. (2008). Beneficial effect of resin salve in treatment of severe pressure ulcers: a prospective, randomized and controlled multicentre trial. *Br. J. Dermatol.* 158, 1055–1062.

- Sipponen, A., Kuokkanen, O., Tiihonen, R., Kauppinen, H., and Jokinen, J.J. (2012). Natural coniferous resin salve used to treat complicated surgical wounds: pilot clinical trial on healing and costs. *Int. J. Dermatol.* *51*, 726–732.
- Skalicka-Woźniak, K., and Garrard, I. (2014). Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. *Phytochem. Rev. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* *13*, 547–572.
- Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y., and Hay, S.I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* *434*, 214–217.
- Soh, P.N., Witkowski, B., Olaghier, D., Nicolau, M.-L., Garcia-Alvarez, M.-C., Berry, A., and Benoit-Vical, F. (2009). *In vitro* and *in vivo* properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 1100–1106.
- Soheilian, M., Ramezani, A., Azimzadeh, A., Sadoughi, M.M., Dehghan, M.H., Shahghadami, R., Yaseri, M., and Peyman, G.A. (2011). Randomized trial of intravitreal clindamycin and dexamethasone versus pyrimethamine, sulfadiazine, and prednisolone in treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* *118*, 134–141.
- Sonda, S., Fuchs, N., Connolly, B., Fernandez, P., Gottstein, B., and Hemphill, A. (1998). The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* *97*, 97–108.
- Sousa, M.C., Varandas, R., Santos, R.C., Santos-Rosa, M., Alves, V., and Salvador, J.A.R. (2014). Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine. *PloS One* *9*, e89939.
- Spalenka, J., Escotte-Binet, S., Bakiri, A., Hubert, J., Renault, J.-H., Velard, F., Duchateau, S., Aubert, D., Huguenin, A., and Villena, I. (2018). Discovery of New Inhibitors of *Toxoplasma gondii* via the Pathogen Box. *Antimicrob. Agents Chemother.* *62*.
- Spangenberg, T., Burrows, J.N., Kowalczyk, P., McDonald, S., Wells, T.N.C., and Willis, P. (2013). The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLOS ONE* *8*, e62906.
- Speer, C.A., Dubey, J.P., McAllister, M.M., and Blixt, J.A. (1999). Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *29*, 1509–1519.
- Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci. Sao Paulo* *3*, 109–112.
- Srivastava, I.K., and Vaidya, A.B. (1999). A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 1334–1339.
- Stefani, A., Hanf, M., Nacher, M., Girod, R., and Carme, B. (2011). Environmental, entomological, socioeconomic and behavioural risk factors for malaria attacks in Amerindian children of Camopi, French Guiana. *Malar. J.* *10*, 246.

- Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Ugglå, A., and Björkman, C. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85, 227–234.
- Stokke, B.T., Mikkelsen, A., and Elgsaeter, A. (1986). Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanochemical properties. *Biophys. J.* 49, 319–327.
- Strehl, E., Schneider, W., and Elstner, E.F. (1995). Inhibition of dihydrofolate reductase activity by alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneimittelforschung.* 45, 172–173.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., et al. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5844–5849.
- Subramanian, G., Belekar, M.A., Shukla, A., Tong, J.X., Sinha, A., Chu, T.T.T., Kulkarni, A.S., Preiser, P.R., Reddy, D.S., Tan, K.S.W., et al. (2018). Targeted Phenotypic Screening in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* Reveals Novel Modes of Action of Medicines for Malaria Venture Malaria Box Molecules. *mSphere* 3.
- Sullivan, D.J. (2002). Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int. J. Parasitol.* 32, 1645–1653.
- Sullivan, W.J., and Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *Fems Microbiol. Rev.* 36, 717–733.
- Taiwo, O., Xu, H.X., and Lee, S.F. (1999). Antibacterial activities of extracts from Nigerian chewing sticks. *Phytother. Res. PTR* 13, 675–679.
- Takken, W., and Kline, D.L. (1989). Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5, 311–316.
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., and Krudsood, S. (2009). Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J. Parasitol.* 47, 93–102.
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., and Hameed, S. (2014). Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2014.
- Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., and Perozzo, R. (2006). Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J. Med. Chem.* 49, 3345–3353.
- Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 59, 3750–3753.
- Tomley, F.M., and Soldati, D.S. (2001). Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 17, 81–88.
- Trammell, R.L., Keith, L.H., and Walters, D.B. (1990). Solubility of Organic and Inorganic Chemicals in Selected Solvents. *Natl. Tech. Rep. Libr.* 47.

- Tranas, J., Heinzen, R.A., Weiss, L.M., and McAllister, M.M. (1999). Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 765–767.
- Trebatická, J., and Ďuračková, Z. (2015). Psychiatric Disorders and Polyphenols: Can They Be Helpful in Therapy? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 248529.
- Uggla, A., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Jakubek, E.B., Thebo, P., Kindahl, H., and Björkman, C. (1998). Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28, 1467–1472.
- Van den Ende, J., Coppens, G., Verstraeten, T., Van Haegenborgh, T., Depraetere, K., Van Gompel, A., Van den Enden, E., Clerinx, J., Colebunders, R., Peetermans, W.E., et al. (1998). Recurrence of blackwater fever: triggering of relapses by different antimalarials. *Trop. Med. Int. Health* 3, 632–639.
- Van Voorhis, W.C., Adams, J.H., Adelfio, R., Ahyong, V., Akabas, M.H., Alano, P., Alday, A., Alemán Resto, Y., Alsibae, A., Alzualde, A., et al. (2016). Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. *PLoS Pathog.* 12, e1005763.
- Verhulst, N.O., Weldegergis, B.T., Menger, D., and Takken, W. (2016). Attractiveness of volatiles from different body parts to the malaria mosquito *Anopheles coluzzii* is affected by deodorant compounds. *Sci. Rep.* 6.
- Vila, T., and Lopez-Ribot, J.L. (2017). Screening the Pathogen Box for Identification of *Candida albicans* Biofilm Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61.
- Villena, I., Aubert, D., Leroux, B., Dupouy, D., Talmud, M., Chemla, C., Trenque, T., Schmit, G., Quereux, C., Guenounou, M., et al. (1998). Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand. J. Infect. Dis.* 30, 295–300.
- Villena, I., Ancelle, T., Delmas, C., Garcia, P., Brezin, A.P., Thulliez, P., Wallon, M., King, L., Goulet, V., and Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis (2010). Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 15.
- Vinciguerra, M.G., Belcaro, G., and Cacchio, M. (2015). Robuvit® and endurance in triathlon: improvements in training performance, recovery and oxidative stress. *Minerva Cardioangiol.* 63, 403–409.
- Visen, P., Saraswat, B., Visen, A., Roller, M., Bily, A., Mermet, C., He, K., Bai, N., Lemaire, B., Lafay, S., et al. (2009). Acute effects of *Fraxinus excelsior* L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers. *J. Ethnopharmacol.* 126, 226–232.
- Wahome, M.M., Nyataya, J.N., Akala, H.M., Awinda, G.O., Mutai, B.K., Waihenya, R., Kamau, E., Omar, S.A., and Waitumbi, J.N. (2014). Chloroquine tolerance in 3D7 strain of *P. falciparum* was associated with change in allelic structure and not PfCRT and PfMDR1 transporter genes nor DNA methylation. *Am. J. Biol. Life Sci.* 2, 100–107.

- Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., and Carter, R. (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 236, 1661–1666.
- Weaver, B.A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 25, 2677–2681.
- Webster, H.K., Boudreau, E.F., Pavanand, K., Yongvanitchit, K., and Pang, L.W. (1985). Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Thailand using a microdilution radioisotope method. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 228–235.
- Weinke, T., Trautmann, M., Held, T., Weber, G., Eichenlaub, D., Fleischer, K., Kern, W., and Pohle, H.D. (1991). Neuropsychiatric side effects after the use of mefloquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 86–91.
- Weiss, L.M., and Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 5, D391–D405.
- Weston, J.F., Heuer, C., and Williamson, N.B. (2012). Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 103, 136–144.
- Weyrich, L.S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., Breen, J., Morris, A.G., Alt, K.W., Caramelli, D., Dresely, V., et al. (2017). Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature* 544, 357–361.
- Willcox, M.L., and Bodeker, G. (2004). Traditional herbal medicines for malaria. *BMJ* 329, 1156–1159.
- Wolf, A., Cowen, D., and Paige, B.H. (1939). Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am. J. Pathol.* 15, 657–694.11.
- Wouda, W., Moen, A.R., Visser, I.J., and van Knapen, F. (1997). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Investig.* 9, 180–185.
- Wright, C.I., Van-Buren, L., Kroner, C.I., and Koning, M.M.G. (2007). Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. *J. Ethnopharmacol.* 114, 1–31.
- Yasumura, Y., and Kawakita, Y. (1963). A line of cells derived from African green monkey kidney. *Nippon Rinsho* 21, 1209–1210.
- Yonemura, S., Doane, S., Keil, S., Goodrich, R., Pidcoke, H., and Cardoso, M. (2017). Improving the safety of whole blood-derived transfusion products with a riboflavin-based pathogen reduction technology. *Blood Transfus.* 15, 357–364.
- Zebiri, I., Haddad, M., Duca, L., Sauvain, M., Paloque, L., Cabanillas, B., Rengifo, E., Behr, J.-B., and Voutquenne-Nazabadioko, L. (2017). Biological activities of triterpenoids from *Poraqueiba sericea* stems. *Nat. Prod. Res.* 31, 1333–1338.
- Zhang, H., and Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 33–42.

- Zhang, H., and Zhu, G. (2015). Quantitative RT-PCR assay for high-throughput screening (HTS) of drugs against the growth of *Cryptosporidium parvum in vitro*. *Front. Microbiol.* 6.
- Zhang, B., Cai, J., Duan, C.Q., Reeves, M.J., and He, F. (2015a). A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6978–7014.
- Zhang, C., Ondeyka, J.G., Herath, K.B., Guan, Z., Collado, J., Pelaez, F., Leavitt, P.S., Gurnett, A., Nare, B., Liberator, P., et al. (2006). Highly substituted terphenyls as inhibitors of parasite cGMP-dependent protein kinase activity. *J. Nat. Prod.* 69, 710–712.
- Zhang, H., Guo, Z.-J., Xu, W.-M., You, X.-J., Han, L., Han, Y.-X., and Dai, L.-J. (2014). Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *Oncol. Lett.* 7, 525–530.
- Zhang, L., Tu, Z., Yuan, T., Ma, H., Niesen, D.B., Wang, H., and Seeram, N.P. (2015b). New Gallotannin and other Phytochemicals from Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus*) Leaves. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1977–1980.
- Zhou, G., Kohlhepp, P., Geiser, D., Frasquillo, M. del C., Vazquez-Moreno, L., and Winzerling, J.J. (2007). Fate of blood meal iron in mosquitos. *J. Insect Physiol.* 53, 1169–1178.
- Zofou, D., Ntie-Kang, F., Sippl, W., and Efange, S.M.N. (2013). Bioactive natural products derived from the Central African flora against neglected tropical diseases and HIV. *Nat. Prod. Rep.* 30, 1098–1120.

ANNEXES

Dans cette section sont répertoriés les deux articles scientifiques produits et les résultats bruts de l'expérimentation *in vivo*.

Annexe 1. Publication portant sur l'activité *in vitro* et *in vivo* des extraits et fractions d'*A. leiocarpus* sur *T. gondii* (soumise au journal *Experimental Parasitology*).

In vitro* and *in vivo* activity of *Anogeissus leiocarpus* and isolated metabolites against *Toxoplasma gondii

Jérémy Spalenka ^{a,b}, Jane Hubert ^{a,*}, Dominique Aubert ^b, Sandie Escotte-Binet ^b, Nicolas Borie ^a, Frédéric Velard ^c, Isabelle Villena ^b, Jean-Hugues Renault ^a

^a UMR CNRS 7312, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP1039, 51687 Reims, Cedex 2, France.

^b Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France.

^c Biomatériaux et Inflammation en site Osseux, EA4691, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France.

* Corresponding author

Jane Hubert, UMR CNRS 7312, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP1039, 51687 Reims, Cedex 2, France.

Tel.: +33(0) 3 26 91 83 25

E-mail address: jane.hubert@univ-reims.fr

Abstract

Background: *Toxoplasma gondii*, belonging to the Apicomplexa phylum, is a cosmopolitan protozoan parasite which affects at least 30% of the world's population. In West Africa, the leaves and bark of the tree species *Anogeissus leiocarpus* are used against zoonosis in traditional medicine and play a key role in controlling diseases induced by Apicomplexans such as malaria.

Purpose: The present study is focused on the discovery of new antitoxoplasmic compound extracted from the bark of *A. leiocarpus*.

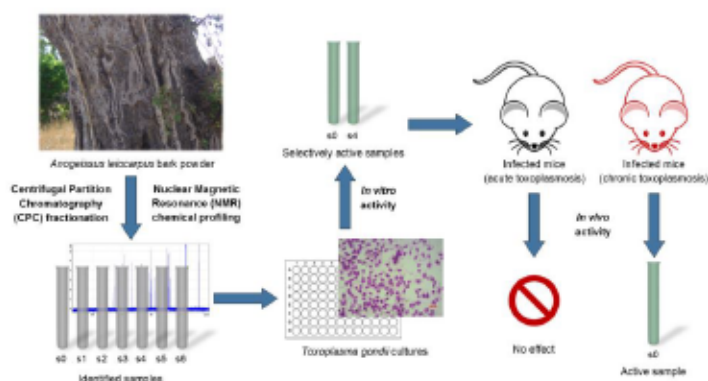
Study design: A crude ethanol extract obtained from the bark of *A. leiocarpus* showed an antitoxoplasmic activity *in vitro* on healthy Vero cells. In order to determine the compounds involved in the observed activity Centrifugation Partition Chromatography (CPC) was applied to generate simplified mixtures or even pure compounds from the crude extract. The obtained fractions were chemically profiled by NMR, tested *in vitro* (72 hours) on infected Vero cells, and the most active ones were tested *in vivo*.

Methods: Fractionation of the extract was performed on a laboratory-scale CPC column using a three-phase solvent system composed of *n*-heptane, methyl *ter*-butyl ether, acetonitrile, and water (1/1/1/1, v/v). Chemosensitivity screening and IC₅₀ determinations were performed *in vitro* by using ELISA method on infected Vero cells. The cytotoxicity was estimated on Vero cells thanks to UptiBlue. *In vivo* activity was assessed on Swiss mice. Invasion assay was performed using a monoclonal antibody coupled with AlexaFluor 488 on infected Vero cells.

Results: The crude bark extract showed a significant activity on tachyzoites from the RH strain of *T. gondii* (IC₅₀ 59.30 µg/mL). A CPC fraction containing pure trachelosperogenin E (TrachE) and the crude bark extract without tannins (CBEWT)

showed the highest activity (IC_{50} s = 26.63 μ g/mL and 12.83 μ g/mL, respectively) with satisfying selectivity indexes (SIs) of 9.75 and 9.61, respectively. Those two fractions were able to significantly inhibit host cell invasion by the parasite *in vitro*, while CBEWT showed the only significant *in vivo* activity against chronic toxoplasmosis but was not efficient against acute toxoplasmosis.

Conclusion: These results provide new data about natural compounds that could enhance the current panoply of treatments against toxoplasmosis.



Keywords

Toxoplasma gondii, *Anogeissus leiocarpus*, centrifugal partition chromatography, natural products, chemosensitivity.

Abbreviations

ATCC, American Type Culture Collection; BRC, Biological Resource Centre; CBEWT, Crude Bark Extract Without Tannin; CC_{50} , 50% Cytotoxic Concentration; CPC, Centrifugal Partition Chromatography; DMSO, Dimethylsulfoxid; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; HRP, Horseradish Peroxidase; IC_{50} , 50% Inhibitory Concentration; IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium; OD, Optical Density; PBS, Phosphate Buffered Saline; SAG-1, Surface Antigen 1; SI, Selectivity Index; TrachE, Trachelosperogenin E.

Introduction

Toxoplasmosis is an important parasitic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. Approximately 25 to 30% of the world population is exposed to this parasite (Montoya and Liesenfeld, 2004). Toxoplasmosis, a generally benign affection, can cause severe life-threatening disease, particularly in immunocompromised patients and in congenitally affected children (Weiss and Dubey, 2009). The population structure of *T. gondii* consists in three main clonal lineages: type I (including RH, a highly virulent strain in mice), type II (including avirulent strain like ME-49) and type III (avirulent strains), correlated with virulence expression in mice (Howe and Sibley, 1995).

Only a few treatments are currently available against toxoplasmosis. They mainly consist in a synergic combination of pyrimethamine and sulfonamide and act by blocking the folate biosynthesis pathway which is essential for parasite survival and

growth. However, it has been shown that treatment of toxoplasmic encephalitis and chorioretinitis by these drugs may fail due to host intolerance or bad absorption of the molecules (Baatz et al., 2006; Dannemann et al., 1992). Resistant strains toward sulfadiazine (Doliwa et al., 2013; Meneceur et al., 2008), have also led to the need of new active compounds against toxoplasmosis.

In the present study, the antitoxoplasmic activity of a crude ethanol extract obtained from the bark of the African birch *Anogeissus leiocarpus* was investigated. *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill & Perr. is a large tree growing from Senegal to Sudan that belongs to the Combretaceae family. Its leaves and bark are traditionally used in West Africa to treat skin diseases, coughing, asthma, fever, rheumatism (Mann et al., 2003) and bacterial infections (Adamu et al., 2005). Several *in vitro* studies have demonstrated these last years that the leaves, roots and bark of *A. leiocarpus* may exert a significant activity against *Plasmodium falciparum* (Gansané et al., 2010; Okpekon et al., 2004), *Trypanosoma brucei* (Okpekon et al., 2004) and nematodes (Ndjonka et al., 2012). In view of these data, we hypothesized that the ethanol bark extract of *A. leiocarpus* could inhibit the growth of *T. gondii* which also belongs to the Apicomplexa phylum like *P. falciparum*.

In a chemical point of view, we have shown previously that the bark of *A. leiocarpus* is mostly composed of highly abundant water-soluble tannins, but also of a diversity of potentially active lower molecular weight metabolites including ellagic acid derivatives, flavonoids, triterpenes and saponosides (Hamzaoui et al., 2013). The objective was therefore to evaluate the antitoxoplasmic activity of the whole bark extract of *A. leiocarpus*, and also to investigate which component(s) or component associations are required to produce a beneficial antiparasitic activity.

Antitoxoplasmic assays were firstly assessed by incubating tachyzoites of the RH strain with the extract for 72 hours. Then the crude extract was fractionated by Centrifugal Partition Chromatography (CPC). The resulting simplified mixtures of compounds or isolated molecules were chemically profiled by Nuclear Magnetic Resonance, and tested in turn on tachyzoites of *T. gondii* for 72 hours. The most active compounds were then assessed for their ability to inhibit cell invasion by tachyzoites, and finally the *in vitro* active compounds were evaluated *in vivo* on a model of infected mice.

Materials and Methods

Chemicals and plant materials

Methyl-*tert*-butyl ether (MtBE), *n*-heptane, and acetonitrile (CH₃CN) were purchased from Carlo Erba Reactifs SDS (Val de Reuil, France).

The ethanol (99%) bark extract of *A. leiocarpus* was kindly provided by the company Givaudan (Active Beauty Department, Givaudan France, Pomacle, France).

Crude extract fractionation

In a first step, the crude bark extract of *Anogeissus leiocarpus* was simply divided in two fractions in order to separate the highly abundant sugars and water-soluble tannins from the other potentially active metabolites of lower molecular weight (triterpenes, methylated ellagic acid derivatives, flavonoids and saponins). For this purpose, 504 mg of the crude bark extract were solubilized in 10 mL of a two-phase solvent system composed of MtBE / CH₃CN / H₂O in the proportions 4/1/5 (v/v). The mixture was vigorously shaken in a separatory funnel. The upper phase was recovered and evaporated to dryness, resulting in a residue of 363 mg (72 % of the crude extract mass). This residue, corresponding to the crude bark extract without tannins, was annotated CBEWT and corresponded to sample s0.

In a second step, the crude bark extract of *A. leiocarpus* was fractionated by Centrifugal Partition Chromatography on a CPC column of 303.5 mL (FCPE300®, Rousselet-Robatet-Kromaton, Annonay, France) containing seven partition disks engraved with 231 twin partition cells (\approx 1 mL per twin cell). The method was fully described previously (Hamzaoui et al., 2013). Briefly, a three-phase solvent system was prepared by mixing *n*-heptane (700 mL), MtBE (700 mL), CH₃CN (700 mL) and water (700 mL) in a funnel. After separation of the *n*-heptane rich upper phase, one equivalent volume of MtBE (700 mL) was added to the mixture of middle and lower phases in order to slightly reduce the polarity of the remaining two-phase solvent system. After decantation, the final middle and lower phases were separated. For fractionation, 3 g of the crude bark extract of *A. leiocarpus* was dissolved in a mixture of lower phase / middle phase / upper phase (45:10:5 v/v) to ensure that the three liquid phases were also in equilibrium in the sample solution. The pH of the sample solution was adjusted to 4-5 with sodium hydroxide.

The CPC column was filled with the lower phase at a minimal rotation speed of 200 rpm. The rotation speed was then increased up to 1200 rpm. The sample solution was loaded into the column by progressively pumping the less polar upper phase (first mobile phase) from 0 to 20 mL/min in 3 minutes in the ascending mode (KNAUER Preparative Pump 1800® V7115, Berlin, Germany). The flow rate of the mobile phase was then maintained at 20 mL/min until the end of the experiment. The upper phase was pumped for 50 minutes to ensure the elution of all hydrophobic compounds. The moderately polar middle phase (second mobile phase) was then pumped for 33 minutes to elute compounds with a medium hydrophobicity. Finally, the column was extruded by switching the valve selection mode from ascending to descending, in order to recover the most hydrophilic compounds retained inside the column (tannins). Fractions of 20 mL were collected over the whole experiment using a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). The separation was monitored by UV at 210, 254, 280 and 366 nm (UVD 170S detector, Dionex, Sunnivale, CA, USA).

TLC and NMR analyses of the CPC fractions

All CPC fractions were checked by Thin Layer Chromatography (TLC) on Merck 60 F254 pre-coated silica gel plates and developed with ethyl acetate / toluene / acetic

acid / formic acid (70:30:11:11 v/v). UV light was used to detect ellagic acid and its derivatives at 254 and 365 nm. TLC plates were then sprayed with a vanillin solution (5% w/v in EtOH), with a H₂SO₄ solution (50% v/v in MeOH), and finally revealed by heating at 100-120°C for 2-3 min. Fractions were combined on the basis of TLC composition similarities, resulting in a series of 25 sub-fractions. About 20 mg of each sub-fraction were dissolved in 600 µL DMSO-*d*₆ and analyzed by NMR spectroscopy at 298 K on a Bruker Avance AVIII-600 spectrometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were acquired at 600.15 MHz and 150.91 MHz, respectively. Additional HSQC, HMBC, and COSY 2D-NMR experiments were performed using standard Bruker microprograms.

Six fractions exhibiting a chemical diversity representative of the main molecular classes present in the crude bark extract were selected to perform the *in vitro* antitoxoplasmic assays. These fractions were annotated from s1 to s6.

T. gondii strains

RH (type I) and ME49 (type II) strains of *T. gondii* were provided by the French Biological *Toxoplasma* Resource Centre (BRC *Toxoplasma*, France).

Parasites growth

RH and ME49 strains tachyzoites were cultured on Vero cell monolayers (ATCC, CCL-81) at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator. Both cells and parasites were grown in complete medium Iscove's Modified Dulbecco's Medium/Glutamax (IMDM) (Invitrogen, France) supplemented with 2% (v/v) fetal calf serum (Biowest, France) and antibiotics (100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin) (GIBCO). Host cells were infected at a 1:1 parasite to cell ratio. Cells and tachyzoites were counted using a Kova Slide counting chamber with Trypan blue (v/v).

In vitro chemosensitivity of *T. gondii* and cytotoxicity evaluation

The *in vitro* chemosensitivity of *T. gondii* (IC₅₀) was assessed as previously described (Doliwa et al., 2013). The crude bark extract and all samples s0 to s6 were tested at ten concentrations obtained by twofold dilution series from a stock solution (crude bark extract and samples s0, s1, s2, s4, s5 and s6: 0.39 to 200 µg/mL; s3: 0.078 to 40 µg/mL) for 72 hours. Pyrimethamine (Pyr) was used as a positive control. *T. gondii* growth was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on the fixed infected cultures with an anti-*T. gondii* SAG-1-HRP conjugated monoclonal antibody (Argene Biosoft, France). Spectrophotometric readings (FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech, France) were made at 450 nm, corrected at 630 nm. For a visual control, the last well of each condition was fixed with cold methanol, stained with kit RAL 555 (RAL Diagnostics, France) and examined microscopically (AxioVert 200 M, Zeiss, France) at magnification 20x.

The *in vitro* cytotoxicity (CC₂₀ and CC₅₀) of samples was evaluated on Vero cell cultures using the UptiBlue viable cell counting assay (Interchim, France): wells were

emptied and washed with cold Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, France). Then, 100 μ L of IMDM supplemented with 2% (v/v) fetal calf serum and 10% (v/v) UptiBlue were added in each well. Afterwards plates were incubated at 37°C for 3 hours. The protocol was slightly the same as described above, except that no parasite was inoculated in wells. Spectrophotometric readings (FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech, France) were made at 570 nm, corrected at 600 nm. Visual control was made as described above.

IC₅₀ data analysis

The effect of the crude extract and samples s0 to s6 at various concentrations was determined by data plotting as previously described (Derouin and Chastang, 1989) with minor modifications to the y axis. Results were averaged, optical Densities (OD) values for cultures without drug treatment were used at 100% value of parasites growth and plotted as a function of the logarithm of each compound concentration. The IC₅₀ value was calculated as the sample concentration for which 50% of parasite growth was inhibited.

Selectivity indexes

A selectivity index (SI) was calculated for each sample, as the ratio between cytotoxic and antiparasitic activities:

$$SI_{Toxoplasma} = CC_{50 \text{ Vero}} / IC_{50 \text{ Toxoplasma RH}}$$

The antitoxoplasmic effect was considered selective if SI > 5.

Invasion assay

In order to determine which part of *T. gondii* life cycle was inhibited by the most selective compounds, an invasion assay was performed for each compound. A previously described protocol was adapted to our model (D'Angelo et al., 2009). Briefly, in a 96-well plate, 40,000 Vero cells were incubated for four hours at 37°C and 5% CO₂. The wells containing Vero cells were then emptied and refilled with 100,000 tachyzoites (RH strain) preincubated for 20 minutes with active compound or pyrimethamine at room temperature in 100 μ L of parasite/active compound suspension per well, except for eight wells as negative control. Eight other wells were refilled with 100,000 tachyzoites without active compound and were used as invasion positive control. The plate was incubated for one hour as described above and wells were washed with PBS. The plate was then fixed with cold methanol as described previously and rehydrated with 100 μ L of PBS per well for 10 minutes. Wells were emptied again before adding the anti-*T. gondii* SAG-1-HRP conjugated monoclonal antibody (Argene Biosoft, France) and incubated at 37°C for one hour. They were then emptied and washed before adding an anti-mouse antibody coupled with AlexaFluor 488 and incubated for one hour at room temperature. Spectrofluorimetric readings (FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech, France) were made at

490 nm and blank readings were made on the mean value of the eight negative control wells. Microscopic analysis were performed at magnification 40x (AxioVert 200M, Zeiss, France).

In vivo chemosensitivity of T. gondii

The *in vivo* experimentations were approved by the Comité d'Ethique en Experimentation Animale de Reims Champagne-Ardenne (C2EA 56), registration number 2016092210116940.

The *in vivo* antitoxoplasmic activity of the *in vitro* active and selective compounds was assessed in Swiss mice. Two groups were made. The first group was composed of immunocompetent mice infected with *T. gondii* RH strain (type I) tachyzoites to mimic acute toxoplasmosis. The second group was composed of immunocompetent mice infected with *T. gondii* ME49 strain (type II) tachyzoites to mimic chronic toxoplasmosis. The parasites inoculation and treatments injections were made intraperitoneally. A 1% (v/v) DMSO injection was used as a negative control. Each group was divided into four subgroups, each of which was submitted to the following conditions:

I: control group (n = 5): RH or ME49 parasites, no treatment.

II: DMSO group (n = 10): RH or ME49 parasites, injection of 1% (v/v) DMSO 10 minutes after parasites infestation (J₀).

III: CBEWT group (n = 10 for each condition): RH or ME49 parasites, injection of CBEWT (200 µg/mL) solubilized in 1% (v/v) DMSO at J₀, J₊₁ (24 hours after infestation), J₊₃ (72 hours after infestation) or J₋₁ (24 hours before infestation).

IV: TrachE group (n = 10 for each condition): RH or ME49 parasites, injections of trachelosperogenin E (200 µg/mL) solubilized in 1% (v/v) DMSO at J₀, J₊₁, J₊₃ or J₋₁.

Surviving mice were sacrificed 30 days after tachyzoites infestation (J₊₃₀) and brains were collected. The samples were then analyzed by Real Time (RT)-qPCR to measure the parasite load as previously described (De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012). If mice died before J₊₃₀, the day of death was recorded (J_{+x}) and their organs were not collected. The data were analyzed as survival curves.

Mice were under constant survey during the experiment in order to avoid any suffering or distress induced by the parasite load or the treatments.

Statistical analysis

For CC₅₀ and IC₅₀ assays, values were expressed as mean ± standard deviation. For the invasion assay results comparison, a one-way ANOVA test (p < 0.05) followed by a Holm-Hidak's multiple comparisons test were performed. The software used was GraphPad Prism 6.0.

For the *in vivo* active compounds, statistical analysis were performed using a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a *post hoc* nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Crude extract fractionation and chemical profiling

Due to the high chemical diversity within the *Anogeissus leiocarpus* bark extract, a three-phase solvent system was used in a sequential CPC elution mode in order to efficiently and rapidly fractionate the different *A. leiocarpus* constituents over their large polarity range. Because the initial crude extract was composed of $\approx 75\%$ (w/w) water-soluble tannins and sugars, a stationary phase rich in CH_3CN and water was selected in order to trap these highly polar compounds in the CPC column over the whole fractionation experiment. As a result, 25 fractions of highly simplified composition in comparison with the initial mixture were obtained. The mass repartition of each fraction related to the initial crude extract mass is given in Figure 1.

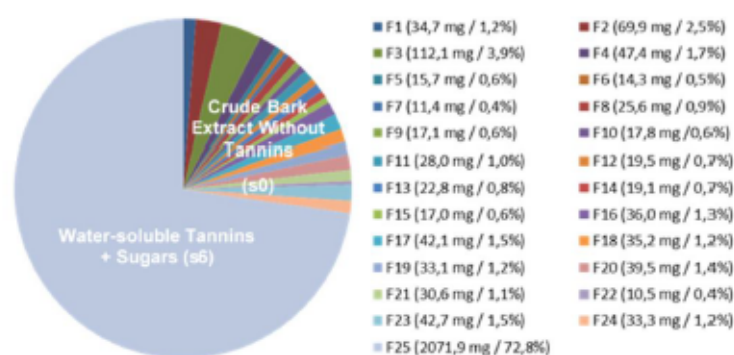


Figure 1: Mass repartition of the CPC-produced fractions.

All 25 fractions were analyzed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy in order to chemically profile the main class of compounds in the extract and unambiguously identify at least one major member of each class. As the fractionation experiment was achieved at a multi-gram scale (3 g injected), it can be emphasized here that the quantities of the recovered fractions were largely sufficient to perform the structural elucidation of potentially interesting metabolites and in parallel the biological evaluation of the same fractions exactly.

The most hydrophobic compounds were eluted with the *n*-heptane rich mobile phase during the first step of the fractionation experiment (from t_0 to 50 min), representing 10.7 % of the crude extract mass (total 305.5 mg). The corresponding fractions from F1 to F7 were mainly composed of a major triterpene, identified as sericic acid, and two methylated ellagic acid derivatives, identified as 3,3'-di-*O*-methyl ellagic acid and 3,4,3'-tri-*O*-methyl flavellagic acid on the basis of ^1H and ^{13}C NMR spectra data (Table I) and comparison with reference NMR data from the literature (Sato, 1987; Serafin et al., 2007).

Table I: ^{13}C NMR spectral assignments (ppm) of *Anogeissus leiocarpus* metabolites. Samples were dissolved in 500 μL DMSO- d_6 and analyzed at 600MHz. A: sericic acid; B: trachelosperogenin E; C: sericoside; D: ellagic acid; E: 3,3'-di-O-methylellagic acid; F: 3,4,3'-tri-O-methylflavellagic acid; G: 3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O-xylopyranoside; H: 3,4,3'-tri-O-methylflavellagic acid 4-O-glucopyranoside; I: protocatechuic acid; J: gallic acid; K: (+)-catechin; L: galocatechin; M: epigallocatechin.

triterpenes				ellagic acid derivatives						phenolic acids			Flavanols			
carbon n°	A	B	C	carbon n°	D ^a	E ^b	E ^c	G ^d	H ^e	carbon n°	I	J	carbon n°	K ^f	L ^g	M ^h
C1	47,1	47,1	47,2	C1	112,6	112,0	111,4 ^a	111,5	114,0	C1	167,6	167,8	C2	81,3	81,3	78,4
C2	67,3	67,6	67,4	C2	136,7	141,6	140,4 ^a	141,1	141,5	C2	122,1	120,8	C3	66,6	66,6	66,3
C3	84,2	77,4	84,2	C3	139,9	140,6	152,0	140,5	152,1	C3	121,9	109,1	C4	28,2	27,3	27,7
C4	43,3	39,3	43,3	C4	148,4	152,6	133,7	151,6	134,2	C4	115,4	145,8	C4a	99,4	99,3	98,9
C5	55,8	46,7	55,9	C5	110,5	111,8	147,3	111,9	147,2	C5	145,3	138,3	C5a	155,7	156,7	156,8
C6	19,2	18,8	19,2	C6	107,9	112,5	97,7	112,2	98,2	C6	150,3	145,8	C8	94,1	95,5	95,4
C7	32,6	32,6	32,2	C7	159,5	158,8	161,2	156,7	160,9	C7	116,8	109,1	C7	156,5	156,5	156,5
C8	39,2	40,3	39,5	C1'	112,6	112,0	113,2 ^a	114,6	113,4				C6	95,4	94,1	94,4
C9	47,7	47,8	47,6	C2'	136,7	141,6	140,5 ^a	142,0	141,4				C5	158,8	155,6	156,1
C10	37,9	37,6	37,9	C3'	139,9	140,6	141,5	142,2	141,8				C1'	130,9	130,1	130
C11	23,7	23,7	23,6	C4'	148,4	152,6	153,4	153,2	152,8				C2'	114,8	106,3	106,4
C12	122,4	122,5	122,5	C5'	110,5	111,8	111,9	112,2	112,1				C3'	145,1	145,9	145,7
C13	143,0	143,0	143,0	C6'	107,9	112,5	113,6	113,1	112,7				C4'	143,1	132,6	132,4
C14	41,4	41,4	41,3	C7'	159,5	158,8	158,6	158,8	158,5				C5'	115,4	145,9	145,7
C15	28,7	28,2	28,3	OCH3		61,3	62,0	62,0	62,1				C6'	116,7	106,3	106,4
C16	27,5	26,7	32,9	OCH3		61,3	61,5	61,4	62,0							
C17	45	45	45,6	OCH3			61,3		61,5							
C18	43,5	43,5	43,4	C1 xyl				102,1								
C19	80,4	80,4	80,4	C2 xyl				73,4								
C20	35,2	35,2	35,1	C3 xyl				76,4								
C21	28,4	27,5	26,6	C4 xyl				69,6								
C22	33,1	32,8	27,6	C5 xyl				66,1								
C23	22,4	60,8	23,7	C1 Glc					101,5							
C24	64,2	62,8	64,2	C2 Glc					73,6							
C25	16,7	16,7	16,8	C3 Glc					76,8							
C26	16,9	16,9	16,9	C4 Glc					69,8							
C27	24,8	24,4	24,5	C5 Glc					77,6							
C28	179,5	179,5	176,2	C6 Glc					60,8							
C29	28,2	28,4	28,4													
C30	24,4	24,8	24,8													
C1 Glc			94,4													
C2 Glc			72,7													
C3 Glc			77,0													
C4 Glc			69,6													
C5 Glc			79,1													
C6 Glc			61,0													

^a data similar to those reported by *Elisabidi and Guzmanowicz, 1996*; ^b data similar to those reported by *Sato et al., 1987*; ^c data similar to those reported by *Scotto et al., 2006*; ^d data similar to those reported by *Gao et al., 2011*; ^e data confirmed by analyzing catechins standard in DMSO- d_6 ; ^f data similar to those reported by *Rösch et al., 2004* and *Someya et al., 2002*; ^g data similar to those reported by *Adipun et al., 2000*; ^h Values in the same column can be interchanged.

Their molecular structures were validated by further 2D NMR analyses (HSQC, HMBC and COSY) (Fig. 2).

During the second step of the CPC fractionation process (from 51 to 85 min), moderately polar compounds were progressively eluted from the stationary phase to the MfBE-rich mobile phase. The corresponding fractions from F8 to F24 represented 16.5 % of the crude extract mass (469.9 mg). One major triterpene was detected in fractions F9 to F13. NMR signals detected in these fractions were consistent with the structure of Trachelosperogenin E. A saponin identified as sericoside was also detected in fractions F20 to F23. Ellagic acid was identified as the largely major compound of F12-F14. Analyses of F15-F24 also revealed the presence of a mixture of minor phenolic constituents including glycosylated ellagic acid derivatives, gallic acid, and catechin derivatives (Hamzaoui et al., 2013; Rösch et al., 2004; Someya et al., 2002). Some fractions containing the major characteristic identified compounds were selected to be evaluated against *Toxoplasma gondii*. These fractions were annotated s1 (sericoside), s2 (ellagic acid), s3 (mixture of 3,3'-di-O-methylellagic

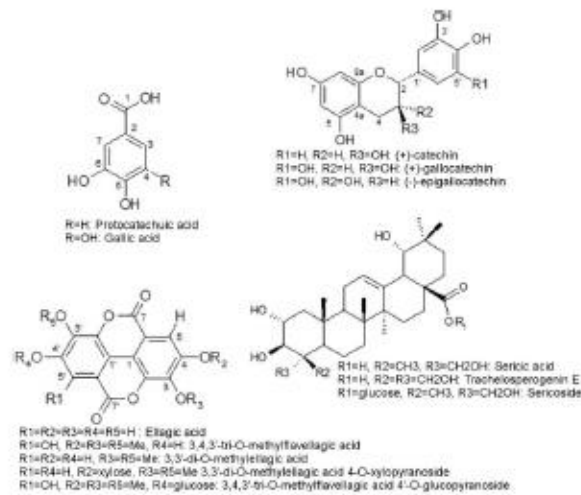


Figure 2: Chemical structures of the major compounds recovered from the crude bark extract of *Anogeissus leiocarpus*.

acid (66%) and 3,4,3'-tri-O-methylflavellagic acid (33%), **s4** (trachelosperogenin E), **s5** (mixture of trachelosperogenin E and catechin derivatives) and **s6** (fraction F25 retained inside the column until the end of the fractionation experiment enriched in tannins). The ¹³C NMR profile of all tested samples from **s0** to **s6** are given in Figure 3.

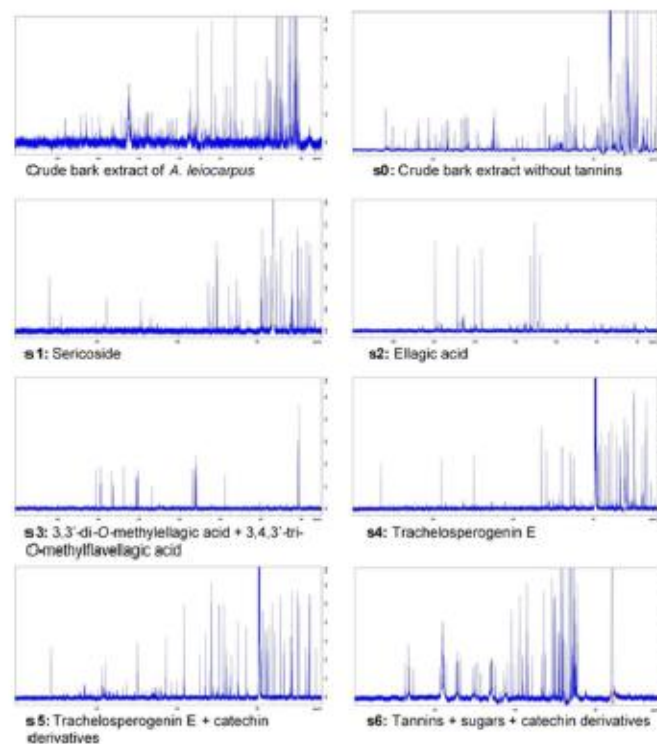


Figure 3: ¹³C NMR profiles of samples from **s0** to **s6** tested against *Toxoplasma gondii*.

Cytotoxicity on Vero cells

In Table II is presented the cytotoxicity of the crude bark extract and s0 to s6, determined by using the UptiBlue viable cell counting assay.

The 20% cytotoxic concentration (CC₂₀) values ranged from 7.27 to 85.62 µg/mL and corresponded to the acceptable limit of cell viability. Moreover, the values of 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) ranged from 38.57 to more than 200 µg/mL. These results were confirmed microscopically after coloration with the kit RAL 555: a concentration of 200 µg/mL of the crude bark extract was the most cytotoxic concentration for Vero cells, without inducing a complete cell death (data not shown). Moreover, the fraction s3 containing 3,3'-di-O-methyl ellagic acid and 3,4,3'-tri-O-methyl flavellagic acid was still very cytotoxic at 20 µg/mL and 40 µg/mL.

Table II: Cytotoxic and antitoxoplasmic activities of the eight samples obtained by CPC and pyrimethamine (Pyr). Values are expressed as mean ± SD. Underlined value is theoretical based on the trend line since CC₅₀ was not reached.

Compound	CC ₅₀ on Vero cells (µg/mL)	CC ₂₀ on Vero cells (µg/mL)	IC ₅₀ on <i>T. gondii</i> (µg/mL)	Selectivity index
Crude bark extract	137.62 ± 13.28	31.92 ± 9.07	59.30 ± 9.16	2.32
Crude bark extract without tannin (s0)	123.31 ± 12.40	7.27 ± 1.42	12.83 ± 1.85	9.61
Sericoside (s1)	> 200	81.97 ± 5.27	134.68 ± 11.92	< 5
Ellagic acid (s2)	> 200	21.30 ± 8.22	74.06 ± 19.60	> 2.70
Methylated ellagic acid derivatives (s3)	38.57 ± 8.47	8.38 ± 3.41	13.78 ± 3.52	2.80
Trachelosperogenin E (s4)	<u>259.48 ± 5.13</u>	12.39 ± 0.88	26.63 ± 0.94	9.75
Trachelosperogenin E + flavonoids (s5)	> 200	85.62 ± 19.78	152.56 ± 12.20	< 5
Tannins (s6)	> 200	46.11 ± 7.00	109.12 ± 2.35	< 5
Pyrimethamine (Pyr)	2.61 ± 0.33	1.85 ± 0.41	0.29 ± 0.19	9.00

In vitro chemosensitivity of *T. gondii*

The crude bark extract of *A. leiocarpus* and the seven fractions obtained by CPC were tested for their potential antitoxoplasmic activity.

The crude bark extract showed an average IC₅₀ of 59.30 ± 9.16 µg/mL (Fig. 4A). Without tannins, the crude bark extract showed an average IC₅₀ of 12.83 ± 1.85 µg/mL (Fig. 4B). On the contrary, tannins, sericoside and the mixture of trachelosperogenin E and flavonoids were not selective on *T. gondii* (data not shown), since the IC₅₀ of each of these fraction was very high compared to their respective CC₅₀, showing a low SI (Table II). Ellagic acid was poorly active with an average IC₅₀ of 74.06 ± 19.60 µg/mL (Table II). Interestingly, when trachelosperogenin E was tested as a pure compound, its average IC₅₀ was 26.63 ± 0.94 µg/mL and parasites were not detected at 100 µg/mL (Fig. 4C). Finally, the fraction containing 3,3'-di-O-methyl ellagic acid and 3,4,3'-tri-O-methyl flavellagic acid exhibited an average IC₅₀ of 13.78 ± 3.52 µg/mL (Table II). The IC₅₀ of the reference

drug, pyrimethamine, was $0.29 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ (Table II) for the RH strain of *T. gondii*. These results were visually confirmed by fixation of the cultures with cold methanol and coloration with the kit RAL 555 for microscopic analyses (data not shown).

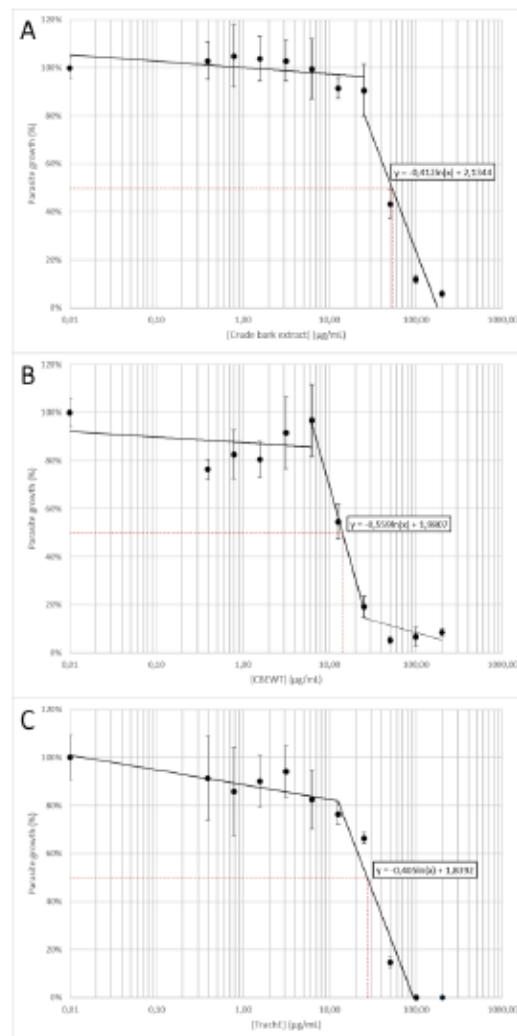


Figure 4: Representative dose-response curves of the *in vitro* effect of crude bark extract (A), s0 (B) and s4 (C) from *A. leiocarpus* on the RH strain of *T. gondii* growth after 72 h of incubation. Each graph shows the tachyzoites growth compared to a positive control and determined by ELISA with infected monolayers (y axis) versus compound concentration (x axis). Values are expressed as mean \pm SD.

Selectivity indexes

Selectivity index (SI) was calculated for each tested sample (Table II).

The SIs of two samples (the crude bark extract without tannin and trachelosperogenin E) were higher than 5 (9.61 and 9.75, respectively).

Invasion assay

Considering the interesting *in vitro* effect of CBEWT (s0) and trachelosperogenin E (s4) against *T. gondii*, the mechanism involved in *T. gondii* growth inhibition was further investigated. RH strain tachyzoites were incubated with s0 or s4 before invading Vero cells. The concentrations were slightly higher than the IC₅₀ determined previously, with 20 µg/mL of CBEWT and 30 µg/mL of trachelosperogenin E. The results showed a significant activity of both compounds ($p < 0.05$ and $p < 0.007$, respectively), with 24% inhibition for CBEWT and 56% inhibition for trachelosperogenin E (Fig. 5). As expected Pyr showed no effect on *T. gondii* invasion (Fig. 5). These results were also confirmed microscopically (data not shown).

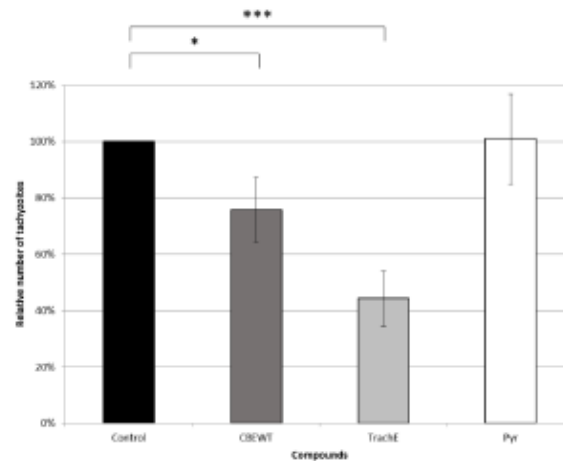


Figure 5: Relative number of parasites after incubation of tachyzoites with crude bark extract without tannin (CBEWT), trachelosperogenin E (TrachE) or pyrimethamine (Pyr). This experiment reflects the inhibition of the cell invasion by *T. gondii* tachyzoites induced by the natural compounds that showed an *in vitro* activity. * $p < 0.05$, *** $p < 0.007$ compared to the control group.

In vivo chemosensitivity of T. gondii

DMSO group showed no significant difference with control group (untreated infected mice) towards tachyzoites growth (data not shown). It was observed that CBEWT was able to significantly inhibit *T. gondii* growth in a chronic toxoplasmosis model ($p < 0.05$) (Fig. 6). An early injection of CBEWT showed more efficiency than other injection times, especially when compared to J+3. Nevertheless a prophylaxis treatment (J-1) had no effect on the parasite load. Trachelosperogenin E had no antitoxoplasmic activity in our chronic toxoplasmosis mouse model due to high mortality (data not shown).

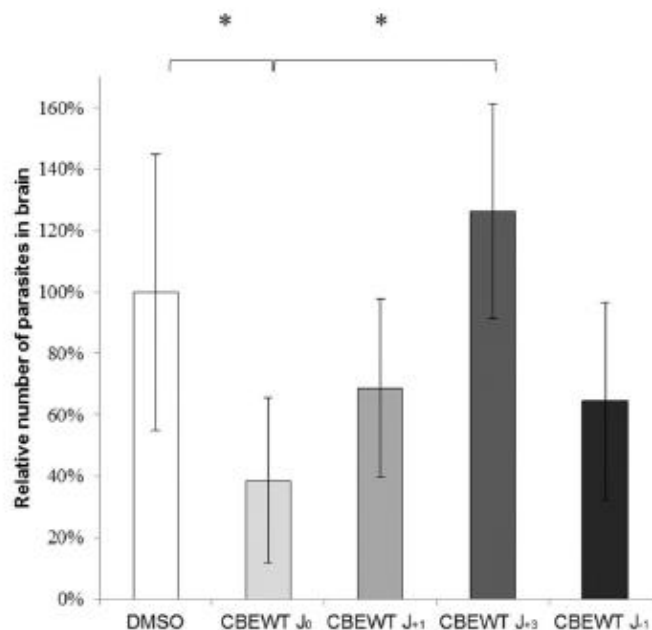


Figure 6: Antitoxoplasmic activity of the crude bark extract without tannin (CBEWT) in a chronic toxoplasmosis mouse model induced by ME49 strain tachyzoites (* $p < 0.05$ compared to DMSO control group).

No significant effect was observed, neither for trachelosperogenin E nor for CBEWT in the acute toxoplasmosis model (Fig. 7). All mice died within eight days after tachyzoites inoculation.

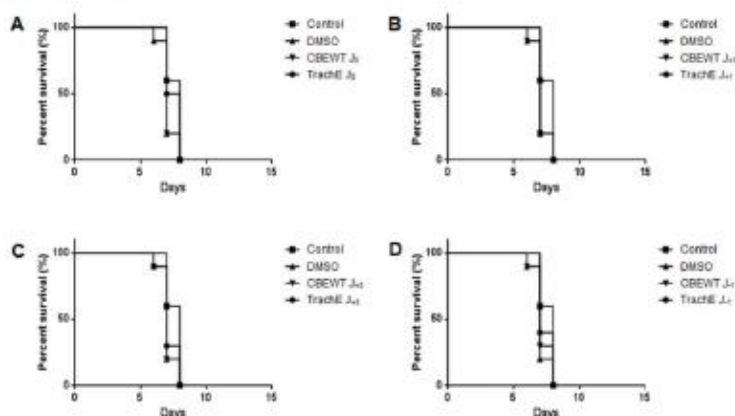


Figure 7: Absence of antitoxoplasmic activity of the crude bark extract without tannin (CBEWT) and trachelosperogenin E (TrachE) in our acute toxoplasmosis mouse model induced by RH strain tachyzoites. Treatments were intraperitoneally injected at J₀ (A), J₊₁ (B), J₊₃ (C) and J₋₁ (D). Control consisted in infected mice without treatment. DMSO consisted in 1% (v/v) DMSO injected in infected mice as a negative control.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antitoxoplasmic activity and cytotoxicity of seven fractions obtained from the ethanol (99%) bark extract of the African tree *A. leiocarpus*.

All of these fractions were obtained by CPC and their chemical profile achieved by NMR. DMSO was selected to test all samples (s0 to s6), hence providing a good standardization of the process. Moreover DMSO was shown to be a good lipophilic vehicle, making him a common solvent for *in vitro* or *in vivo* purposes (Kelava et al., 2011).

The cytotoxicity of all samples was assessed on Vero cells which have significant advantages such as yield and viability for *T. gondii* culture. The highest concentration of all samples was cytotoxic, particularly for the two highest concentrations of s3 (20 and 40 µg/mL). No cytotoxicity was measured for all other concentrations. These data could be useful to assess the antiparasitic activity of *A. leiocarpus* metabolites on another intracellular parasite that can also invade Vero cells.

The ethanol crude bark extract was effective with an IC₅₀ of 59.30 ± 9.16 µg/mL, confirming that the African birch contains efficient molecules against protozoan parasites as previously described (Okpekon et al., 2004). Remarkably this IC₅₀ was in the same order of magnitude of the IC₅₀ of sulfadiazine, which was 77 µg/mL (Doliwa et al., 2013), even though sulfadiazine is generally combined to other active molecules when used as an antitoxoplasmic treatment. That is interesting since there are very few treatments currently available against *T. gondii*. To understand which compound induced this antitoxoplasmic activity, seven fractions obtained after CPC fractionation of the crude extract were tested. Tannins and sericoside showed no antitoxoplasmic effect, what is in accordance with previous results obtained on *P. falciparum*. (Asres et al., 2001; Serge et al., 2015). Ellagic acid showed a low antitoxoplasmic activity, with an IC₅₀ value of 74.06 ± 19.60 µg/mL. The mixture of 3,3'-di-O-methyl ellagic acid and 3,4,3'-tri-O-methyl flavellagic acid showed an antitoxoplasmic activity, despite its cytotoxicity, with an IC₅₀ value of 13.78 ± 3.52 µg/mL. Another promising compound was trachelosperogenin E, with an IC₅₀ of 26.63 ± 0.94 µg/mL. Moreover its selectivity index was the highest. Trachelosperogenin E could explain at least in part the antitoxoplasmic activity of *A. leiocarpus*. Finally trachelosperogenin E mixed with flavonoids showed no activity against *T. gondii*. As trachelosperogenin E alone was effective, it is surprising that this mixture was inefficient since the effectiveness of flavonoids against *P. falciparum* was previously demonstrated, the mechanism being an inhibition of the enzymes involved in the fatty acid biosynthesis, such as FabG, FabZ and FabI (Tasdemir et al., 2006). FabG and FabI were not proven to be expressed by *T. gondii*, but FabZ is part of its fatty acid biosynthesis pathway (UniProt O97376; ToxoDB TGME49-321570). Flavonoids could inhibit FabZ from *T. gondii*, whereas it may not be enough to inhibit *T. gondii* growth. This would explain the inactivity of the mixture of trachelosperogenin E and flavonoids towards this parasite.

Since the crude bark extract without tannin and trachelosperogenin E were the most active compounds with the most satisfying SIs (9.61 and 9.75, respectively), their mechanism of action was investigated during the cell invasion by RH strain tachyzoites. Results showed a significant inhibition of the invasion process. Considering their respective efficiency against invasion it appeared that most of the s0 and s4 activity took place during this process, meaning that any effect on the parasite multiplication remained minor. Moreover, parasites seemed to be stuck on the cell membrane. These intriguing observations were also made with Dynasore, a dynamin inhibitor that impairs *T. gondii* invasion. Dynamin is a molecular actor involved in *T. gondii* endocytosis during invasion (Caldas et al., 2016). It has been described that tachyzoites treated with Dynasore were unable to penetrate host cells whereas their adhesion to the cell membrane increased (Caldas et al., 2009). These data suggest that at least trachelosperogenin E could act as a dynamin inhibitor. Further studies based on electronic or confocal microscopy would be very helpful to confirm the ability of tachyzoites to be stuck on the cell membrane.

Considering these promising results, the *in vivo* antitoxoplasmic activity of the crude bark extract without tannin (s0) and trachelosperogenin E (s4) was also assessed. Mice were infected with ME49 strain or RH strain tachyzoites. Only the crude bark extract without tannin provided a protection against brain invasion by *T. gondii* in our chronic toxoplasmosis model. Trachelosperogenin E caused high mice mortality probably because of its *in vivo* cytotoxicity. Indeed it has been shown that mice are more sensitive to a compound toxicity than their *in vitro* counterpart (Sheridan et al., 1999).

The two compounds were also unable to protect mice from an acute toxoplasmosis induced by the RH strain which is a virulent *T. gondii* strain (Sibley and Boothroyd, 1992).

To conclude, *A. leiocarpus* bark showed a promising *in vitro* antitoxoplasmic activity. The later was confirmed by isolating and testing on the parasite seven fractions from its crude ethanol bark extract. Among these fractions, the crude bark extract without tannin and trachelosperogenin E were particularly interesting. Several experiments would be useful to accurately understand the mechanism of action of *A. leiocarpus* metabolites on *T. gondii*. Moreover it would be interesting to find out whether the compounds can induce a synergy when used with a classical treatment (sulfadiazine or pyrimethamine taken alone) or not.

Conflict of interest

The authors declare there is no conflict of interest associated with this publication.

Acknowledgments

We thank the URCA PICT platform for their assistance in imagery and microscopy controls. We are very grateful to the Champagne-Ardenne region and the Robert Debré University-affiliated Hospital of Reims, which funded the thesis subject that led to this study. We also thank Regine Geers, Emilie Josse-Dupuis and Loren Andrulewicz for their great technical help in this study. The "Société d'Accélération du

Transfert de Technologie (SATT) Nord is gratefully acknowledged for its financial support.

References

- Adamu, H.M., Abayeh, O.J., Agho, M.O., Abdullahi, A.L., Uba, A., Dukku, H.U., Wufem, B.M., 2005. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 99, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.025>
- Adigun, J.O., Amupitan, J.O., Kelly, D.R., 2000. Isolation and investigation of antimicrobial effect of 3,4,3'-tri-O-methylflavellagic acid and its glucoside from *Anogeissus leiocarpus*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 14, 169–174.
- Asres, K., Bucar, F., Knauder, E., Yardley, V., Kendrick, H., Croft, S.L., 2001. *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytother. Res. PTR* 15, 613–617.
- Baatz, H., Mirshahi, A., Puchta, J., Gumbel, H., Hattenbach, L.-O., 2006. Reactivation of toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 14, 185–187. <https://doi.org/10.1080/09273940600659740>
- Caldas, L.A., Attias, M., de Souza, W., 2009. Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* 301, 103–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01799.x>
- Caldas, L.A., Soares, L.L., Henrique Seabra, S., Attias, M., de Souza, W., 2016. Monitoring of dynamin during the *Toxoplasma gondii* cell cycle. *Pathog. Dis.* 74. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw108>
- D'Angelo, J.G., Bordón, C., Posner, G.H., Yolken, R., Jones-Brando, L., 2009. Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* *in vitro* at multiple steps in the lytic cycle. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 146–150. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn451>
- De Craeye, S., Speybroeck, N., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Collinet, F., Tavemier, P., Van Gucht, S., Dorny, P., Dierick, K., 2011. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Vet. Parasitol.* 178, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.016>
- Derouin, F., Chastang, C., 1989. *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1753–1759.
- Doliwa, C., Escotte-Binet, S., Aubert, D., Velard, F., Schmid, A., Geers, R., Villena, I., 2013. Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* 133, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.019>
- Gansané, A., Sanon, S., Ouattara, L.P., Traoré, A., Hutter, S., Ollivier, E., Azas, N., Traore, A.S., Guissou, I.P., Sirima, S.B., Nebié, I., 2010. Antiplasmodial activity and toxicity of crude extracts from alternatives parts of plants widely used for the treatment of malaria in Burkina Faso: contribution for their preservation. *Parasitol. Res.* 106, 335–340. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1663-y>
- Guo, Z., Xu, Y., Han, L., Bo, X., Huang, C., Ni, L., 2011. Antioxidant and cytotoxic activity of the acetone extracts of root of *Euphorbia hylonoma* and its ellagic acid derivatives. *J. Med. Plants Res.* 5, 5584–5589.
- Hamzaoui, M., Renault, J.-H., Nuzillard, J.-M., Reynaud, R., Hubert, J., 2013. Stepwise elution of a three-phase solvent system in centrifugal partition extraction: a new strategy for the fractionation and phytochemical screening of

- a crude bark extract. *Phytochem. Anal. PCA* 24, 367–373. <https://doi.org/10.1002/pca.2418>
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566.
- Kelava, T., Čavar, I., Čulo, F., 2011. Biological actions of drug solvents. *Period. Biol.* 113, 311–320.
- Mann, A., Gbate, M., Nda Umar, A., 2003. Medicinal and economic plants of Nupeland. Jube Evans Books and Publications, Bida, Nigeria.
- Meerburg, B.G., De Craeye, S., Dierick, K., Kijlstra, A., 2012. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 184, 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.001>
- Meneceur, P., Bouldouyre, M.-A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin, J.-F., Derouin, F., 2008. *In vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1269–1277. <https://doi.org/10.1128/AAC.01203-07>
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet Lond. Engl.* 363, 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Ndjonka, D., Ajonina-Ekoti, I., Djafsia, B., Lüersen, K., Abladam, E., Liebau, E., 2012. *Anogeissus leiocarpus* extract on the parasite nematode *Onchocerca ochengi* and on drug resistant mutant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet. Parasitol.* 190, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.027>
- Okpekon, T., Yolou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Bories, C., Grellier, P., Frappier, F., Laurens, A., Hocquemiller, R., 2004. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *J. Ethnopharmacol.* 90, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.029>
- Pakulski, G., Budzianowski, J., 1996. Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from *in vitro* cultures. *Phytochemistry* 41, 775–778. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)89675-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)89675-0)
- Rösch, D., Krumbein, A., Kroh, L.W., 2004. Antioxidant gallo catechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn *Hippophaë rhamnoides* pomace. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 605–613. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1002-6>
- Sato, T., 1987. Spectral differentiation of 3,3'-di-O-methylellagic acid from 4,4'-di-O-methylellagic acid. *Phytochemistry* 26, 2124–2125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81778-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81778-1)
- Serafin, C., Nart, V., Malheiros, A., de Souza, M.M., Fischer, L., Delle Monache, G., Della Monache, F., Cechinel Filho, V., 2007. Bioactive phenolic compounds from aerial parts of *Plinia glomerata*. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 62, 196–200.
- Serge, K.B., Serges, O.A., Ludovic, M., Elvis, O.N., Bernardin, A., Francis, F., Alfred, T., 2015. *In vitro* behaviour of *Plasmodium falciparum* strains by alkaloids and tannins extracted from root of *Mitragyna inermis*, a medicinal plant. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 7.
- Sheridan, R.E., Deshpande, S.S., Smith, T., 1999. Comparison of *in vivo* and *in vitro* mouse bioassays for botulinum toxin antagonists. *J. Appl. Toxicol. JAT* 19 Suppl 1, S29-33.

- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>
- Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K., 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chem.* 79, 351–354. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00186-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00186-3)
- Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., Perozzo, R., 2006. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J. Med. Chem.* 49, 3345–3353. <https://doi.org/10.1021/jm0600545>
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39, 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>

Annexe 2. Résultats bruts obtenus pour la détection des parasites dans les cerveaux des souris atteintes de toxoplasmose chronique (lot B) et de néosporose aiguë (lot D) par qRT-PCR.

Lot B : souris inoculées par 100000 tachyzoïtes de la souche ME49/souris sous un volume de 200 µL avec ATB

• **Cage 1 : DMSO 1% – Titre ADHS compris entre 1600 et 12800**

- Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 21,69
 - Cœur : 28,87
- Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 23,56
 - Cœur : 33,59
- Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 22,96
 - Cœur : 30,29
- Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 24,18
 - Cœur : 32,03
- Ct moyen souris 5 :
 - Cerveau : 21,92
 - Cœur : 32,75
- Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 24,25
 - Cœur : 34,69
- Quatre souris décédées entre J₆ et J₉

• **Cage 2 : EBST à J₀ – Titre ADHS compris entre 1600 et 12800**

- Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 24,60
 - Cœur : 31,33
- Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 24,95
 - Cœur : 31,10
- Ct moyen souris 3 :

- Cerveau : 24,12
- Cœur : 31,05
- Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 25,27
 - Cœur : 37,95
- Ct moyen souris 5 :
 - Cerveau : 23,46
 - Cœur : 29,32
- Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 25,93
 - Cœur :
- Ct moyen souris 7 :
 - Cerveau : 23,83
 - Cœur : 34,15
- Ct moyen souris 8 :
 - Cerveau : 24,31
 - Cœur :
- Ct moyen souris 9 :
 - Cerveau : 23,74
 - Cœur : 33,23
- Une souris décédée à J₆
- **Cage 3 : EBST à J₁ – Titre ADHS compris entre 1600 et 12800**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 22,39
 - Cœur : 35,22
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 23,78
 - Cœur : 39,17
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 23,78
 - Cœur : 33,63
 - Ct moyen souris 4 :

- Cerveau : 24,55
- Cœur : 38,62
- Ct moyen souris 5 :
 - Cerveau : 23,08
 - Cœur : 30,54
- Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 22,93
 - Cœur : 31,77
- Ct moyen souris 7 :
 - Cerveau : 23,13
 - Cœur : 34,24
- Ct moyen souris 8 :
 - Cerveau : 23,91
 - Cœur : 30,97
- Ct moyen souris 9 :
 - Cerveau : 25,17
 - Cœur : 32,55
- Une souris décédée à J₇
- **Cage 4 : EBST à J₃ – Titre ADHS compris entre 400 et 12800**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 24,37
 - Cœur : 35,48
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 22,88
 - Cœur : 36,00
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 22,70
 - Cœur : 31,22
 - Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 21,75
 - Cœur : 30,23
 - Ct moyen souris 5 :

- Cerveau : 22,69
- Cœur : 31,54
- Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 23,72
 - Cœur : 43,27
- Ct moyen souris 7 :
 - Cerveau : 22,31
 - Cœur : 32,93
- Ct moyen souris 8 :
 - Cerveau : 22,51
 - Cœur : 38,27
- Ct moyen souris 9 :
 - Cerveau : 20,62
 - Cœur : 27,87
- Ct moyen souris 10 :
 - Cerveau : 24,02
 - Cœur : 32,86
- Toutes les souris ont survécu jusqu'à J₃₀
- **Cage 5 : EBST à J₋₁ – Titre ADHS compris entre 3200 et 12800**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 22,38
 - Cœur : 35,61
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 23,10
 - Cœur : 30,14
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 22,85
 - Cœur : 31,76
 - Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 24,67
 - Cœur : 32,67
 - Ct moyen souris 5 :

- Cerveau : 23,28
- Cœur : 31,44
- Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 23,57
 - Cœur : 38,44
- Ct moyen souris 7 :
 - Cerveau : 24,28
 - Cœur : 34,11
- Ct moyen souris 8 :
 - Cerveau : 25,44
 - Cœur : 35,15
- Deux souris décédées entre J₇ et J₉
- **Cage 6 : TrachE à J₀ – Titre ADHS compris entre 3200 et 12800**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 25,27
 - Cœur : NA
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 25,69
 - Cœur : 36,42
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 24,66
 - Cœur : 32,72
 - Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 24,90
 - Cœur : 35,46
 - Six souris décédées entre J₆ et J₉
- **Cage 7 : TrachE à J₁ – Titre ADHS compris entre 1600 et 6400**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 24,55
 - Cœur : 35,38
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 25,19

- Cœur : 38,71
- Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 23,25
 - Cœur : 36,04
- Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 23,54
 - Cœur : 39,23
- Ct moyen souris 5 :
 - Cerveau : 25,23
 - Cœur : 31,56
- Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 23,75
 - Cœur : 38,51
- Quatre souris décédées entre J₆ et J₉
- **Cage 8 : TrachE à J₃ – Titre ADHS compris entre 3200 et 12800**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 23,66
 - Cœur : 34,64
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 23,71
 - Cœur : 39,18
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 24,01
 - Cœur : 33,29
 - Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 22,53
 - Cœur : 30,46
 - Ct moyen souris 5 :
 - Cerveau : 24,00
 - Cœur : 32,77
 - Ct moyen souris 6 :
 - Cerveau : 21,62

- Cœur : 32,13
- Ct moyen souris 7 :
 - Cerveau : 24,05
 - Cœur : 35,10
- Trois souris décédées entre J₆ et J₉
- **Cage 9 : TrachE à J₋₁ – Titre ADHS compris entre 3200 et 6400**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 24,63
 - Cœur : 31,37
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 24,08
 - Cœur : 36,10
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 23,85
 - Cœur : 29,44
 - Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 21,90
 - Cœur : 31,92
 - Ct cerveau souris 5 :
 - Cerveau : 24,20
 - Cœur : 37,48
 - Cinq souris décédées entre J₆ et J₁₀
- **Cage 10 : Témoin**
 - Quatre souris décédées entre J₆ et J₉

Lot D : souris inoculées par 100000 tachyzoïtes de la souche NC-1/souris sous un volume de 200 μ L avec ATB

- **Cage 1 : DMSO 1%**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : NA
 - Cœur : 34,30
 - Ct moyen souris 2 :

- Cerveau : 24,89
 - Cœur : 26,65
 - Huit souris décédées entre J₆ et J₈
- **Cage 2 : EBST à J₀**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : NA
 - Cœur : 33,94
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 28,21
 - Cœur : 34,90
 - Huit souris décédées entre J₄ et J₈
- **Cage 3 : EBST à J₁**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : NA
 - Cœur : 33,82
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 29,40
 - Cœur : NA
 - Huit souris décédées entre J₆ et J₈
- **Cage 4 : EBST à J₃**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : NA
 - Cœur : 33,65
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 28,12
 - Cœur : 33,95
 - Huit souris décédées entre J₆ et J₇
- **Cage 5 : EBST à J₋₁**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 27,78
 - Cœur : 28,27
 - Ct moyen souris 2 :

- Cerveau : 30,27
 - Cœur : 36,53
 - Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 31,98
 - Cœur : NA
 - Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 27,96
 - Cœur : 25,79
 - Six souris décédées entre J₆ et J₈
- **Cage 6 : TrachE à J₀**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 26,40
 - Cœur : 33,91
 - Ct moyen souris 2 :
 - Cerveau : 32,73
 - Cœur : 32,09
 - Huit souris décédées entre J₁ et J₇
- **Cage 7 : TrachE à J₁**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : NA
 - Cœur : 36,35
 - Neuf souris décédées entre J₆ et J₈
- **Cage 8 : TrachE à J₃**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 35,46
 - Cœur : 36,14
 - Neuf souris décédées entre J₆ et J₇
- **Cage 9 : TrachE à J₋₁**
 - Ct moyen souris 1 :
 - Cerveau : 26,64
 - Cœur : 31,97
 - Ct moyen souris 2 :

- Cerveau : 23,91
- Cœur : 30,31
- Ct moyen souris 3 :
 - Cerveau : 29,12
 - Cœur : 36,46
- Ct moyen souris 4 :
 - Cerveau : 27,65
 - Cœur : 34,43
- Ct moyen souris 5 :
 - Cerveau : 29,78
 - Cœur : 35,50
- Cinq souris décédées entre J₆ et J₁₁
- **Cage 10 : Témoin**
 - Toutes les souris décédées entre J₅ et J₂₈

Annexe 3. Publication portant sur la découverte de nouveaux inhibiteurs de *T. gondii* grâce à la Pathogen Box (acceptée dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018).



Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

PHARMACOLOGY



Discovery of New Inhibitors of *Toxoplasma gondii* via the Pathogen Box

Jérémy Spalenka,^{a,b} Sandie Escotte-Binet,^a Ali Bakiri,^b Jane Hubert,^b Jean-Hugues Renault,^b Frédéric Velard,^c Simon Duchateau,^{a*} Dominique Aubert,^{a,d} Antoine Huguenin,^a Isabelle Villena^{a,d}

^aLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Centre Hospitalier de Reims et Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Cedex, France

^bUMR CNRS 7312, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Cedex 2, France

^cBiomatériaux et Inflammation en site Osseux, EA 4691, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Cedex, France

^dCentre National de Référence de la Toxoplasmose, Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Centre Hospitalier de Reims et Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Cedex, France

ABSTRACT *Toxoplasma gondii* is a cosmopolitan protozoan parasite which affects approximately 30% of the population worldwide. The drugs currently used against toxoplasmosis are few in number and show several limitations, such as drug intolerance, poor bioavailability, or drug resistance mechanism developed by the parasite. Thus, it is important to find new compounds able to inhibit parasite invasion or proliferation. In this study, the 400 compounds of the open-access Pathogen Box, provided by the Medicines for Malaria Venture (MMV) foundation, were screened for their anti-*Toxoplasma gondii* activity. A preliminary *in vitro* screening performed over 72 h by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed 15 interesting compounds that were effective against *T. gondii* at 1 μ M. Their cytotoxicity was estimated on Vero cells, and their 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were further calculated. As a result, eight anti-*Toxoplasma gondii* compounds with an IC₅₀ of less than 2 μ M and a selectivity index (SI) value of greater than 4 were identified. The most active was MMV675968, showing an IC₅₀ of 0.02 μ M and a selectivity index value equal to 275. Two other compounds, MMV689480 and MMV687807, also showed a good activity against *T. gondii*, with IC₅₀s of 0.10 μ M (SI of 86.6) and 0.15 μ M (SI of 11.3), respectively. Structure-activity relationships for the eight selected compounds also were discussed on the basis of fingerprinting similarity measurements using the Tanimoto method. The anti-*Toxoplasma gondii* compounds highlighted here represent potential candidates for the development of new drugs that could be used against toxoplasmosis.

KEYWORDS *Toxoplasma gondii*, drug screening, antitoxoplasmic compound, Pathogen Box, antitoxoplasmic activity

Toxoplasmosis is one of the most important parasitic diseases worldwide. It is caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* and affects approximately 25 to 30% of the world population (1). *Toxoplasma gondii* is able to cause severe illness that can be life-threatening in immunocompromised individuals or in fetuses when acquired congenitally (2). Moreover, ocular lesions can occur in the case of congenital toxoplasmosis or during reactivation of toxoplasmosis. For example, the proportion of people with ocular toxoplasmosis in the United States is about 2%, and this number can be much greater in other countries, especially in South America (3). Only a few treatments against toxoplasmosis are currently available, mainly consisting of a synergic combination of pyrimethamine and sulfonamide. These two drugs block the folate biosyn-

Received 10 August 2017 Returned for modification 2 October 2017 Accepted 29 October 2017

Accepted manuscript posted online 13 November 2017

Citation Spalenka J, Escotte-Binet S, Bakiri A, Hubert J, Renault J-H, Velard F, Duchateau S, Aubert D, Huguenin A, Villena I. 2018. Discovery of new inhibitors of *Toxoplasma gondii* via the pathogen box. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01640-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01640-17>.

Copyright © 2018 Spalenka et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Isabelle Villena, ivillena@chu-reims.fr.

* Present address: Simon Duchateau, Université de Lille-1 - Sciences et Technologies, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on February 7, 2018 by CEA SAACLAY

TABLE 1 Characteristics of the 15 compounds showing antitoxoplasmic activity after preliminary screening at 1 μ M

Anti-Toxoplasma gondii compound ^a	Mol wt ^b	cLogP ^b	Target ^b
MMV676477	383.47	3.28	Tuberculosis
MMV676512	347.39	2.95	Tuberculosis
MMV676604	371.46	2.11	Kinetoplastids
MMV688853	389.88	1.75	Cryptosporidiosis
MMV689480	326.43	4.69	Leishmaniasis
MMV676602	460.57	2.09	Kinetoplastids
MMV687807	383.67	2.63	Tuberculosis
MMV011765	358.73	3.10	Malaria
MMV022478	545.93	2.55	Malaria
MMV675968	359.81	2.31	Cryptosporidiosis
MMV659004	364.88	4.39	Kinetoplastids
MMV658988	338.84	3.93	Kinetoplastids
MMV676599	331.41	3.36	Cryptosporidiosis
MMV021013	294.40	3.55	Tuberculosis
MMV688703	335.42	4.03	Toxoplasmosis

^aCompounds are named by their MMV identifier codes.

^bMolecular weight (Mol wt), cLogP values, and initial activities of the compounds were obtained from the Pathogen Box supporting information.

Structural similarity analysis. According to the similar property principle, compounds with similar chemical structures tend to have similar biological properties (13). In order to evaluate the structural similarities between the eight most active molecules together with the positive reference pyrimethamine (PYR), a Tanimoto coefficient (Tc) was calculated for every pair of the nine molecules on the basis of their atom pair (AP) fingerprint. Tc takes values of 0 to 1, from the least similar to the most similar. Figure 3 represents the bar plots of the frequency of Tc values between the nine molecules.

The most frequent values were between 0.3 and 0.5. These values are relatively low, indicating a relatively high structural diversity within the set of the nine molecules. The highest value was 0.64 between the compounds MMV022478 and MMV676512. In a second step, the resulting Tc similarity matrix was submitted as a distance matrix to hierarchical clustering analysis (HCA). HCA was carried out to highlight structural similarities among the eight active compounds together with pyrimethamine (PYR). Figure 4 reveals three main clusters. The first cluster contains the positive-control PYR along with MMV011765, MMV675968, and MMV687807, which has the highest Tc to PYR (0.54). Compounds MMV675968 and MMV687807, which are among the 3 most

TABLE 2 Characteristics of the eight compounds showing antitoxoplasmic activity according to our hit criteria with pyrimethamine as reference drug^f

Anti-Toxoplasma gondii compound ^a	Mol wt ^b	cLogP ^b	IC ₅₀ ^c (μ M)	CC ₅₀ ^d (μ M)	SI ^e
MMV675968	359.81	2.31	0.02 \pm 0.002*	5.5	275
MMV689480	326.43	4.69	0.10 \pm 0.049*	8.66	86.6
MMV687807	383.67	2.63	0.15 \pm 0.021*	1.69	11.3
MMV022478	545.93	2.55	0.29 \pm 0.021*	2.23	7.7
MMV011765	358.73	3.10	0.34 \pm 0.007*	9.48	27.9
MMV676602	460.57	2.09	0.81 \pm 0.099*	3.30	4.1
MMV676512	347.39	2.95	0.86 \pm 0.113*	3.61	4.2
MMV021013	294.40	3.55	1.12 \pm 0.035	15.92	14.2
PYR	248.71	3.00	1.17 \pm 0.076	10.52	9.0

^aCompounds are named by their MMV identifier codes. PYR, pyrimethamine.

^bMolecular weight and cLogP values were obtained from Pathogen Box supporting information, except for pyrimethamine, for which data were found on <http://DrugCentral.org>.

^cCompounds were diluted by a 2-fold dilution series and tested in cell culture. Results are means from four values from two different experiments. *, $P < 0.05$ compared to values for PYR.

^dCytotoxicity against Vero cells was evaluated in cell culture. Results are means from four values from two different experiments.

^eSelectivity indexes were calculated based on the CC₅₀ Vero cells/IC₅₀ T. gondii ratio.

^fHit criteria were an IC₅₀ of $<2 \mu$ M and SI of >4 .

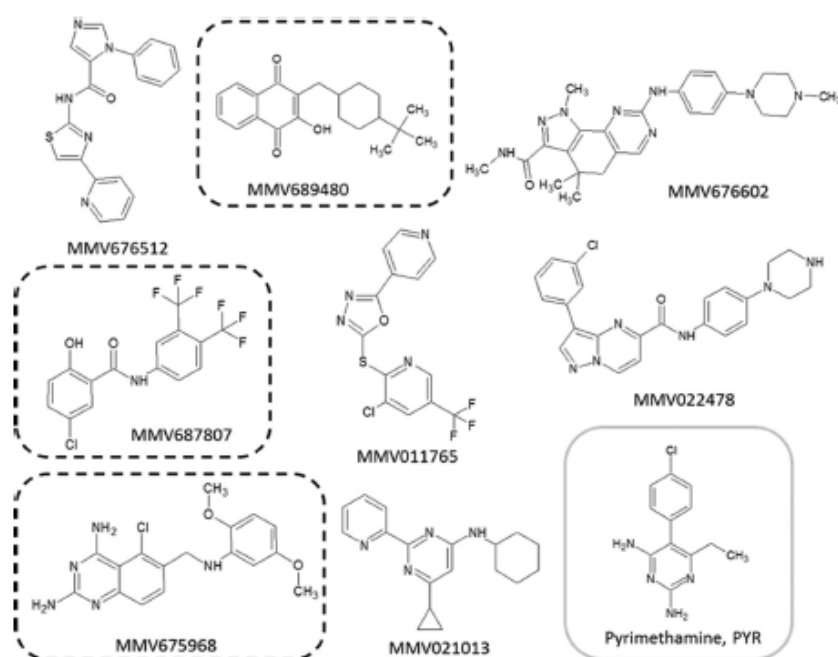


FIG 1 Structures of the compounds showing a selective antitoxoplasmic activity. The structures encircled by dotted lines highlight the most active compounds. These structures and the MMV identifiers were provided by the MMV foundation as supporting information for the open-access Pathogen Box.

active molecules, also were included in this first cluster, whereas the third compound (MMV689480), with a high antitoxoplasmic activity, was located in the third cluster and exhibited a very low T_c compared to the two others (0.31 and 0.29, respectively). These results give insight into the structural similarities between the subset of active compounds; however, deeper analysis would be necessary for a more detailed structure-activity relationship evaluation.

DISCUSSION

Toxoplasmosis ranks as one of the world's most common and neglected diseases induced by a protozoan parasite (14). The treatments currently used are not numerous, and most of them were discovered several decades ago (15, 16). Chemotherapy for treating toxoplasmosis frequently consists of combination treatments, usually the association of the antifolates pyrimethamine and sulfadiazine. To make things worse, the parasite can show a variable susceptibility toward the drugs (7) or even develop a resistance against one of those drugs (6). An ideal anti-*Toxoplasma* drug would be potent and nontoxic and would eliminate latent infection (bradyzoites).

The same issues can be found with *Plasmodium falciparum* (17). This is why, at first, the Medicines for Malaria Venture foundation and several groups of scientists decided to collaborate in order to propose a powerful screening tool, named Malaria Box (9). This tool was used to screen drugs on other pathogens, such as *T. gondii*, *Entamoeba histolytica* (8), *Cryptosporidium parvum* (12), *Schistosoma* (18), and *Perkinsus marinus* (19), among others. Fifty-five groups compiled more than 290 assay results describing the many activities of the Malaria Box compounds (9). For *Toxoplasma*, seven anti-*Toxoplasma* compounds with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) lower than 5 μM and selectivity indexes (SI) higher than 6 were identified (8). The results have ignited

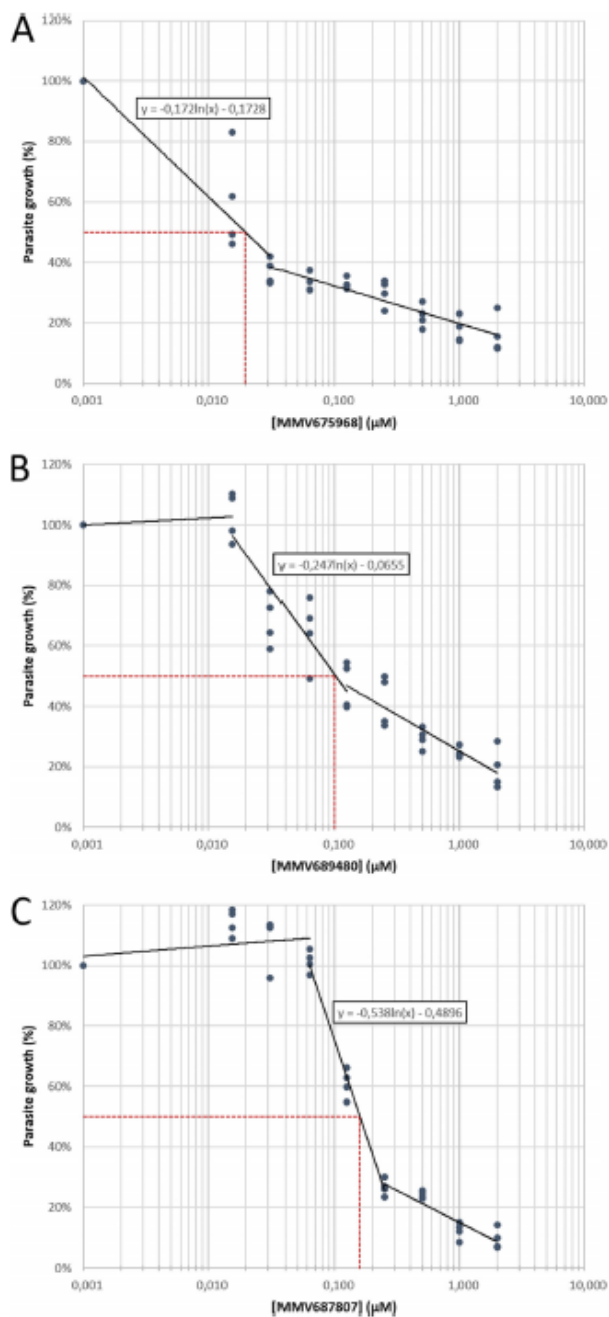


FIG 2 Representative figures of dose-response curves of the three most active compounds, MMV675968 (A), MMV689480 (B), and MMV687807 (C), against *T. gondii*. Concentrations ranged from 0 to 2 μM . Results were obtained from two different experiments consisting of two replicates per condition. Each dot represents one replicate value. The dotted line indicates 50% reduction in parasite growth.

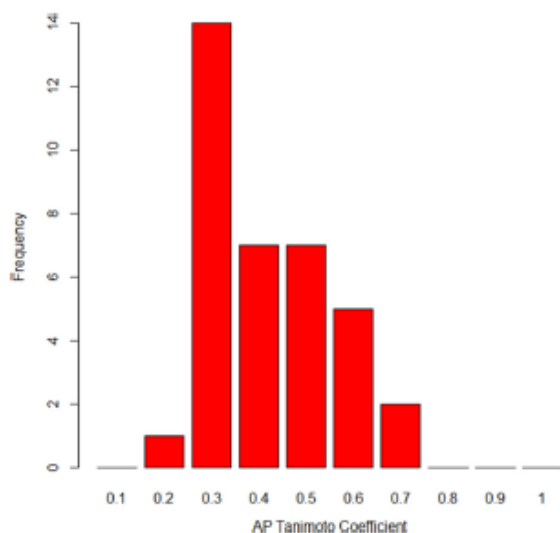


FIG 3 Frequency of the Tanimoto coefficient values between the nine molecules, including pyrimethamine, based on their atom pair fingerprints.

over 30 drug development programs for a variety of diseases. This open-access effort was so successful that the MMV foundation distributed another set of compounds: the Pathogen Box, a new screening tool dedicated to diverse pathogens (20, 21) and based on the same principle as the Malaria Box.

In our study, eight antitoxoplasmic compounds were identified (Fig. 1 and Table 2) based on our hit criteria (IC_{50} of $<2 \mu\text{M}$ and SI of >4), meaning that 2% of the compounds of the Pathogen Box were effective against the parasite.

New successes from Pathogen Box have been published recently with the demonstration of inhibitory activity against planktonic growth and *Candida albicans* biofilm (22). MMV675968 has been shown to be efficient against the planktonic form of *C. albicans*; moreover, this compound is also the most active against *Toxoplasma*, with an IC_{50} of $0.02 \mu\text{M}$ and a selectivity index value equal to 275. Antifungal agents target a broad range of eukaryotic fungal pathogens of human, and azoles have shown effect against *Toxoplasma*. Although fluconazole and itraconazole have IC_{50} s of $3 \mu\text{M}$ and $0.5 \mu\text{M}$, respectively, the mechanism responsible for their effect against *Toxoplasma gondii* is unknown. Also described as an anti-*Cryptosporidium*, MMV675968 showed an anti-plasmodial activity against *P. falciparum* (23). MMV675968 is known to target *Cryptosporidium* DHFR (24), and it is likely that this compound also targets *Plasmodium* and *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase.

Interestingly, one of our selected compounds was a well-known reference compound: buparvaquone (MMV689480; IC_{50} of $0.10 \mu\text{M}$ and SI of 86.6). Buparvaquone was previously shown to inhibit *Neospora caninum* proliferation *in vitro* and *in vivo* (25) and *Toxoplasma gondii* proliferation *in vivo* (26). This is in accordance with our results, since buparvaquone showed one of the highest antitoxoplasmic activities in the present study. *Neospora caninum* belongs to the *Apicomplexa* phylum, like *Toxoplasma gondii* or *Eimeria tenella*. Interestingly, the effect of buparvaquone has been highlighted in this parasite: it inhibits several enzymes involved in mitochondrial electron transport (27). Thus, this mechanism also could be applied for the inhibition of *T. gondii* growth.

MMV687807 is active against preformed biofilms of *Candida albicans* (22). This antimycobacterium compound has shown good activity (IC_{50} of $0.15 \mu\text{M}$ and SI of 11.3) against *Toxoplasma gondii*. The anti-*Plasmodium* compounds MMV022478 (IC_{50} of 0.29

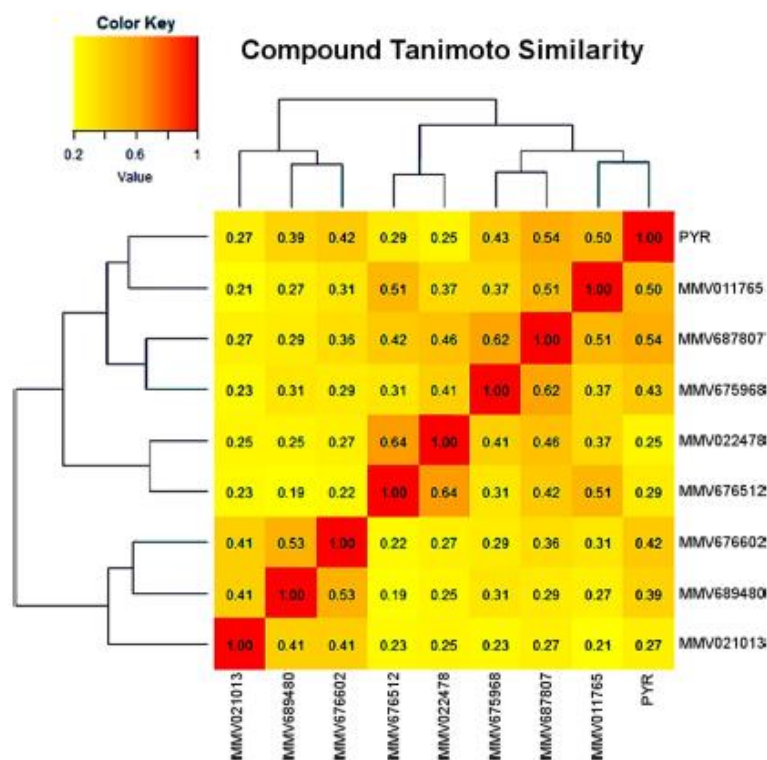


FIG 4 Hierarchical clustering analysis highlighting the structural similarities between the nine molecules, including pyrimethamine (PYR), according to their Tanimoto coefficients.

μM and SI of 7.7) and MMV011765 (IC_{50} of 0.34 μM and SI of 27.9) also were efficient against *T. gondii*. MMV022478 was identified as selective for *Trypanosoma brucei brucei* (23). Members of the pyrazolo[1,5-a]pyrimidine class, to which MMV022478 belongs, have been reported to inhibit mammalian NADPH oxidase 4 (28). MMV676602 anti-*Trypanosoma* and MMV676512 anti-*Cryptosporidium* also were active against *T. gondii* (IC_{50} of 0.81 μM and SI of 4.1 and IC_{50} of 0.86 μM and SI of 4.2).

The anti-*Mycobacterium* compound MMV021013 also was efficient against *Toxoplasma gondii* (IC_{50} of 1.12 and SI of 14.2). This 2-pyridyl-4-aminopyrimidine was active against *T. cruzi*, *L. donovani*, and *T. b. brucei* (23). Duffy et al. proposed, based on chemical structure, that the cellular target of this compound is methionine aminopeptidase (23). This compound was the only one that did not show significant activity compared to that of pyrimethamine.

None of the compounds, except MMV688703, presented as anti-*Toxoplasma* in the Pathogen Box showed activity with our method. This could be due to the different techniques used and also by the time of action of the drugs (72 h in our case). Moreover, *P. falciparum* is phylogenetically distant from *T. gondii*, even if they both belong to the *Apicomplexa* phylum. This would explain why some anti-*Plasmodium* compounds are not active against *T. gondii*.

MMV688703, which presented antiplasmodial activity (23), was included in the 15 compounds isolated by screening. Unfortunately, it did not show the criteria for inclusion as an active compound ($\text{IC}_{50} < 2 \mu\text{M}$ and SI > 4). This product was previously identified as an active compound against *Toxoplasma gondii* by inhibition of *Toxo-*

plasma cGMP-dependent protein kinase, involved in the regulation of calcium (29). Van Voorhis et al. saw some discrepancies in the values obtained for the same compounds in similar assays that were carried out by multiple groups, such as activity against *P. falciparum*, *Trypanosoma* spp., and mammalian cells (9). Some of these apparent discrepancies probably were due to variations in the techniques used for the screenings (9) or the experimental models (30).

Finally, an important point to evaluate interest in new compounds is the comparison of their efficiency to that of pyrimethamine. Pyrimethamine is the reference drug commonly used, in combination with sulfamide, to obtain a synergistic effect against *T. gondii* (31). Nevertheless, a variability in the susceptibilities of *T. gondii* strains to pyrimethamine has been observed naturally (7), and resistance toward this drug has been induced *in vitro* (32). Moreover, natural resistant strains of *Plasmodium falciparum* have been highlighted in several countries (33). This problem could be avoided by the newly discovered active drugs, since their scaffolds are completely different from the scaffold of pyrimethamine, as shown in Fig. 4, which derives from a pyrimidine skeleton. It could lead to the synthesis of new active molecules based on these structures and improve the therapeutic armamentarium.

The MMV foundation's Pathogen Box is a very powerful tool that grants easy and fast identification of new antiparasitic compounds with a very interesting yield (2%).

MATERIALS AND METHODS

Pathogen Box compounds. All tested compounds were obtained from the Medicines for Malaria Venture (MMV) foundation (Geneva, Switzerland). The Pathogen Box was supplied in 96-well plates. Each compound (one per well) was diluted in 10 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 10 mM and shipped frozen. The compounds were diluted in the culture medium at 1 or 2 μ M top concentration in accordance with MMV Instructions.

***Toxoplasma gondii* strain.** Tachyzoites of the RH strain (type I) used in this study were provided by the French Biological *Toxoplasma* Resource Centre (BRC *Toxoplasma*, Reims, France).

Parasite growth. Tachyzoites were cultured on Vero cell monolayers (ATCC CCL-81) at 37°C under 5% CO₂ in a humidified incubator. Both cells and parasites were grown in the complete medium Iscove's modified Dulbecco's medium-GlutaMAX (IMDM) (Invitrogen, Paris, France) supplemented with 2% (vol/vol) fetal calf serum (Blowest, Nuaille, France) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin) (GIBCO). Host cells were infected at a 1:1 parasite-to-cell ratio. Cells and tachyzoites were counted using a Kova Slide counting chamber with trypan blue. The parasites were routinely checked for *Mycoplasma* species contamination and found to be negative using a *Mycoplasma* species real-time PCR (34).

Screening of the Pathogen Box compounds. The 400 compounds of the Pathogen Box were prepared according to the MMV foundation Instructions provided with the Box and screened on *T. gondii* in 96-well plates, using pyrimethamine (PYR) as a positive control. The compounds were diluted at a final concentration of 1 μ M using the culture medium IMDM supplemented with 2% (vol/vol) fetal calf serum. This concentration was used to select the most active compounds at the lowest concentration. The wells were filled with 200 μ l of a cell suspension containing 20,000 Vero cells and incubated at 37°C for 4 h to adhere. Each well, except eight negative-control wells, then was filled with 50 μ l of a parasite suspension containing 60,000 tachyzoites. The plates were incubated at 37°C for 3 h. The wells were emptied to remove any parasite that did not invade host cells. One-hundred-microliter aliquots of diluted compounds were added in the wells, and plates were incubated at 37°C and 5% CO₂. After 72 h, the cultures were fixed with cold methanol. *T. gondii* growth was determined on the fixed infected cultures by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an anti-*T. gondii* SAG-1-horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody (Argene Biosoft, France), as previously described (6). Spectrophotometric readings (FLUOstar Omega microplate reader; BMG Labtech, France) were made at 450 nm and corrected at 630 nm, and blank readings were made on the mean value of the seven negative-control wells. For a visual control, the last well of each concentration was stained with kit RAL 555 (RAL Diagnostics, France) and examined microscopically (AxioVert 200M; Zeiss, France) at a magnification of $\times 20$ instead of being used for ELISA. Optical density (OD) values for cultures without drug treatment were used as the 100% value of parasite growth and plotted as a function of the logarithm of each compound concentration.

Cytotoxicity evaluation. The *in vitro* cytotoxicity of compounds was evaluated on Vero cell cultures by using 96-well plates, since these cells were used for *T. gondii* growth in our model. Briefly, 200- μ l aliquots of a cell suspension containing 20,000 Vero cells were placed into each well and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 4 h to adhere. Each well, except the eight negative-control wells, then were emptied. They were refilled with 100 μ l of each selected effective compound at eight concentrations, obtained by 2-fold dilution series in the culture medium (from 100 to 0.8 μ M), except for the eight positive-control wells. Each concentration was assessed in two replicate wells in two replicate plates. After 72 h, cytotoxicity was evaluated by using the UptiBlue viable cell counting assay (Interchim). Wells were emptied and washed with cold phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, France), and volumes of

100 μ l of IMDM supplemented with 2% (vol/vol) fetal calf serum and 10% (vol/vol) UptiBlue were added in each well. Afterwards, the plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 3 h. Spectrophotometric measurements (FLUOstar Omega microplate reader; BMG Labtech, France) were made at 570 nm and corrected at 600 nm, and blank readings were made on the mean value of the seven negative-control wells. A sample was considered toxic when the cell viability was lower than 80%. The growth inhibition percentage was calculated from the optical densities relative to the negative control, and 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) values were determined using Microsoft Excel. For a visual control, the last well of each condition was fixed with cold methanol and stained with kit RAL 555 (RAL Diagnostics, France) and examined microscopically (AxioVert 200M; Zeiss, France) at a magnification of $\times 20$ instead of being tested with UptiBlue.

Determination of IC₅₀s. The *in vitro* chemosensitivity of *T. gondii* was assessed by using 96-well plates, as previously described (6), for each compound inhibiting at least 50% of parasite growth at 1 μ M. Briefly, 200- μ l aliquots of cell suspension containing 20,000 Vero cells were placed into each well and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4 h to adhere. Each well, except the eight negative-control wells, was filled with 50 μ l of a parasite suspension containing 60,000 tachyzoites. The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 3 h. The wells then were emptied to remove any parasite that did not invade host cells. They were refilled with 100 μ l of each selected compound at eight concentrations, obtained by 2-fold dilution series in the culture medium (from 2 to 0.015 μ M), except for eight positive-control wells. Each concentration was assessed in two replicate wells in two replicate plates. Pyrimethamine was used as a positive control. After 72 h at 37°C and 5% CO₂, the plates were fixed with cold methanol. The results were obtained by using the same protocol as that previously described for the screening. Each condition was microscopically controlled (AxioVert 200M; Zeiss, France) before the ELISA. The IC₅₀s were determined as the sample concentration for which 50% of parasite growth was inhibited. IC₅₀s depend on the experimental model (30) and the techniques (9).

SI. A selectivity index (SI) was calculated for each compound as the ratio between cytotoxic and antiparasitic activities according to the following formula: $SI_{T. gondii} = CC_{50\text{Vero}}/IC_{50T. gondii}$.

Statistical analysis. For the IC₅₀ comparison, a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by a Bonferroni's multiple-comparison test were performed ($P < 0.05$). The software used was GraphPad Prism 6.0.

Structural similarity measurements. Molecular fingerprints were used as descriptors in order to structurally compare the active molecules. For this purpose, the chemical structures of the active molecules were encoded into a series of binary digits that represent the presence (1) or absence (0) of substructures within a given molecule. Among the various existing fingerprinting methods (35), atom pair fingerprints (APfp) (36) is among the most popular and has been reported to be the best method to compare close structural analogues (37). Therefore, the APfp was selected to map the molecular structures of PYR and of the eight active molecules presenting the best activity into vectors containing 1,024 bits, where each bit coded for the presence or absence of a particular molecular fragment. The obtained fingerprints were submitted to hierarchical clustering analysis in order to classify the nine molecules. The Tanimoto coefficient, Tc, and Ward's agglomeration method were used for similarity measurements.

Tc is a common fingerprint-based similarity measurement calculation method (38) with the following formula: $S_{A,B} = a/(a + b - c)$, where S represents the similarity between two molecules, A and B, a the number of 1 bits in molecule A, b the number of 1 bits in molecule B, and c the number of common bits. All calculations were performed using the Chemminer package (39) under R3.3.3. Clustering analysis was performed using the R base stats package, and the gplots package was used for the plots.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Medicines for Malaria Venture foundation (MMV; Switzerland) for having supported this study and provided the open-access Pathogen Box.

We also thank the PICT platform (University of Reims Champagne-Ardenne) for their assistance in imagery and microscopy controls. We are very grateful to the Champagne-Ardenne region and the University Hospital of Reims, which funded the thesis subject that led to this study. We also thank the anonymous reviewers for their critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).
- Dubey JP. 2009. Toxoplasmosis of animals and humans, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. <https://doi.org/10.1201/9781420092370-c19>.
- Holland GN. 2003. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol* 136:973–988.
- Baatz H, Mirshahi A, Puchta J, Gumbel H, Hattenbach L-O. 2006. Reactivation of toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul Immunol Inflamm* 14:185–187. <https://doi.org/10.1080/09273940600659740>.
- Dannemann B, McCutchan JA, Israelski D, Antoniskis D, Leport C, Luft B, Nussbaum J, Clumeck N, Morlat P, Chlu J, Vilde J-L, Orellana M, Feigal D, Bartok A, Heseltine P, Leedom J, Remington J. 1992. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS: randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. *Ann Intern Med* 116:33–43. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-116-1-33>.
- Dollwa C, Escotte-Binet S, Aubert D, Velard F, Schmid A, Geers R, Villena I. 2013. Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 133:131–136. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.019>.
- Meneceur P, Bouldouyre M-A, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V,

- Garin JF, Derouin F. 2008. *in vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1269–1277. <https://doi.org/10.1128/AAC.01203-07>.
8. Boyom FF, Fokou PVT, Tchoukouaha LRY, Spangenberg T, Mfopa AN, Kouipou RMT, Mbouna CJ, Donfack VF, Zollo PH. 2014. Repurposing the open access malaria box to discover potent inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5848–5854. <https://doi.org/10.1128/AAC.02541-14>.
 9. Van Voorhis WC, Adams JH, Adelfio R, Ahnyong V, Akabas MH, Alano P, Alday A, Aleman Resto Y, Alsibaee A, Alzualde A, Andrews KT, Avery SV, Avery VM, Ayong L, Baker M, Baker S, Ben Mamoun C, Bhatia S, Bickle Q, Bounaadja L, Bowling T, Bosch J, Boucher LE, Boyom FF, Brea J, Brennan M, Burton A, Caffrey CR, Camarda G, Carrasquilla M, Carter D, Belen Cassera M, Chih-Chien Cheng K, Chindaoudomsate W, Chubb A, Colon BL, Colón-López DD, Corbett Y, Crowther GJ, Cowan N, D'Alessandro S, Le Dang N, Delves M, DeRisi JL, Du AY, Duffy S, et al. 2016. Open source drug discovery with the malaria box compound collection for neglected diseases and beyond. *PLoS Pathog* 12:e1005763. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005763>.
 10. Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P. 2013. The open access Malaria Box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One* 8:e62906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062906>.
 11. Bowman JD, Merino EF, Brooks CF, Striepen B, Carlier PF, Cassera MB. 2014. Antipicoplast and gametocytocidal screening to identify the mechanisms of action of compounds within the malaria box. *Antimicrob Agents Chemother* 58:811–819. <https://doi.org/10.1128/AAC.01500-13>.
 12. Bessoff K, Spangenberg T, Foderaro JE, Jumani RS, Ward GE, Huston CD. 2014. Identification of *Cryptosporidium parvum* active chemical series by Repurposing the open access malaria box. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2731–2739. <https://doi.org/10.1128/AAC.02641-13>.
 13. Johnson M, Maggiora G. 1990. Concepts and applications of molecular similarity. American Chemical Society, Wiley, New York, NY.
 14. Jones JL, Partse ME, Flore AE. 2014. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 90:794–799. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0722>.
 15. Kitchen LW, Vaughn DW, Skillman DR. 2006. Role of US military research programs in the development of US Food and Drug Administration-approved antimalarial drugs. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 43:67–71. <https://doi.org/10.1086/504873>.
 16. Finland M, Strauss E, Peterson OL. 1941. Sulfadiazine: therapeutic evaluation and toxic effects on four hundred and forty-six patients. *JAMA* 116:2641–2647. <https://doi.org/10.1001/jama.1941.02820240001001>.
 17. Fairhurst RM, Dondorp AM. 10 June 2016. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiol* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.B10-0013-2016>.
 18. Ingram-Sleber K, Cowan N, Panic G, Vargas M, Mansour NR, Bickle QD, Wells TNC, Spangenberg T, Kelsler J. 2014. Orally active antischistosomal early leads identified from the open access malaria box. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2610. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002610>.
 19. Alemán Resto Y, Fernández Robledo JA. 2014. Identification of MMV Malaria Box inhibitors of *Perkinsus marinus* using an ATP-based bioluminescence assay. *PLoS One* 9:e111051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111051>.
 20. Preston S, Jiao Y, Jabbar A, McGee SL, Laleu B, Willis P, Wells TNC, Gasser RB. 2016. Screening of the “Pathogen Box” identifies an approved pesticide with major anthelmintic activity against the barber’s pole worm. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 6:329–334. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.07.004>.
 21. Mayer FL, Kronstad JW. 2017. Discovery of a novel antifungal agent in the Pathogen Box. *mSphere* 2:e00120-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00120-17>.
 22. Vila T, Lopez-Ribot JL. 2017. Screening the Pathogen Box for identification of *Candida albicans* biofilm inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02006-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02006-16>.
 23. Duffy S, Sykes ML, Jones AJ, Shelper TB, Skmpson M, Lang R, Poulsen SA, Sleebbs BE, Avery VM. 2017. Screening the MMV Pathogen Box across multiple pathogens reclassifies starting points for open source drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00379-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00379-17>.
 24. Popov VM, Chan DCM, Fillingham YA, Atom Yee W, Wright DL, Anderson AC. 2006. Analysis of complexes of inhibitors with *Cryptosporidium hominis* DHER leads to a new trimethoprim derivative. *Bioorg Med Chem Lett* 16:4366–4370. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.047>.
 25. Müller J, Aguado-Martínez A, Manser V, Balmer V, Winzer P, Rittler D, Hostettler I, Arranz-Solis D, Ortega-Mora L, Hemphill A. 2015. Buparvaquone is active against *Neospora caninum* *in vitro* and in experimentally infected mice. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.02.001>.
 26. Müller J, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora L-M, Moreno-Gonzalo J, Ferre I, Hulverson MA, Chol R, McCloskey MC, Barrett LK, Maly DJ, Ojo KK, Van Voorhis W, Hemphill A. 2017. Development of a murine vertical transmission model for *Toxoplasma gondii* oocyst infection and studies on the efficacy of bumped kinase inhibitor (BKI)-1294 and the naphthoquinone buparvaquone against congenital toxoplasmosis. *J Antimicrob Chemother* 72:2334–2341. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx134>.
 27. Fry M, Hudson AT, Randall AW, Williams RB. 1984. Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in *Eimeria tenella* (Apicomplexa: Coccidia). *Biochem Pharmacol* 33:2115–2122. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90581-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90581-1).
 28. Borbély G, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N, Baska F, Vántus T, Huszár M, Gelszt M, Hunyady L, Buday L, Orfi L, Kéri G. 2010. Small-molecule inhibitors of NADPH oxidase 4. *J Med Chem* 53:6758–6762. <https://doi.org/10.1021/jm1004368>.
 29. Zhang C, Ondeyka JG, Herath KB, Guan Z, Collado J, Pelaez F, Leavitt PS, Gurnett A, Nare B, Liberator P, Singh SB. 2006. Highly substituted terphenyls as inhibitors of parasite cGMP-dependent protein kinase activity. *J Nat Prod* 69:710–712. <https://doi.org/10.1021/mp0505418>.
 30. Portes JA, Souza TG, dos Santos TAT, da Silva LLR, Ribeiro TP, Pereira MD, Hom A, Jr, Fernandes C, DaMatta RA, de Souza W, Seabra SH. 2015. Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron(III) compound. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7374–7386. <https://doi.org/10.1128/AAC.00057-15>.
 31. Soheilian M, Ramezani A, Azimzadeh A, Sadoughi MM, Dehghan MH, Shahghadami R, Yaseri M, Peyman GA. 2011. Randomized trial of intravitreal clindamycin and dexamethasone versus pyrimethamine, sulfadiazine, and prednisolone in treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* 118:134–141. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.04.020>.
 32. Reynolds MG, Oh J, Roos DS. 2001. *In vitro* generation of novel pyrimethamine resistance mutations in the *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1271–1277. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1271-1277.2001>.
 33. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. 2004. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 305:1124. <https://doi.org/10.1126/science.1098876>.
 34. Ishikawa Y, Kozakal T, Morita H, Saida K, Oka S, Masuo Y. 2006. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42:63–69. <https://doi.org/10.1290/0505035.1>.
 35. Cereto-Massagué A, Ojeda MJ, Valls C, Mulero M, García-Valvée S, Pujadas G. 2015. Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods* 71:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.005>.
 36. Carhart RE, Smith DH, Venkataraghavan R. 1985. Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications. *J Chem Inf Comput Sci* 25:64–73. <https://doi.org/10.1021/ci00046a002>.
 37. O’Boyle NM, Sayle RA. 2016. Comparing structural fingerprints using a literature-based similarity benchmark. *J Cheminformatics* 8:2206–2219.
 38. Bajusz D, Rácz A, Heberger K. 2015. Why is Tanimoto Index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J Cheminformatics* 7:20. <https://doi.org/10.1186/s13321-015-0069-3>.
 39. Cao Y, Charisi A, Cheng LC, Jiang T, Girke T. 2008. ChemmineR: a compound mining framework for R. *Bioinformatics* 24:1733–1734. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn307>.

Screening et identification de molécules actives sur *Toxoplasma gondii* et autres protozoaires d'intérêt médical et vétérinaire.

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* et *Plasmodium falciparum* sont des parasites protozoaires intracellulaires obligatoires, respectivement responsables de la toxoplasmose, de la néosporose et du paludisme. Les différents traitements mis en œuvre reposent sur une association médicamenteuse. Cependant, des échecs thérapeutiques et des résistances aux traitements ont été décrits. Notre travail a porté sur l'identification de molécules actives isolées par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) à partir d'extraits d'écorces d'*Anogeissus leiocarpus*, un arbre d'Afrique de l'ouest connu pour son activité antipaludique, et de dix arbres de la région Champagne-Ardenne. Nous nous sommes penchés, dans un premier temps, sur l'activité antiparasitaire des fractions obtenues à partir d'extrait d'écorce d'*A. leiocarpus*. La trachelospérogénine E et l'extrait global sans tanin se sont révélés actifs, notamment en inhibant l'invasion des cellules hôtes par *T. gondii*. Cet extrait a également préservé la survie des souris atteintes de toxoplasmose chronique. Les mêmes composés naturels ont eu un effet contre *N. caninum* et *P. falciparum*. Dans une seconde partie, 30 extraits d'écorces de dix arbres de la région Champagne-Ardenne ont été testés sur *T. gondii* et *N. caninum*. Les composés responsables de l'activité antiparasitaire présents chez *Alnus glutinosa* semblent être la bétuline et ses dérivés. Dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'activité de 400 molécules de synthèse de la Pathogen Box. Huit d'entre elles ont eu un effet significatif contre *T. gondii*, dont trois avec une sélectivité importante. Des expérimentations sont toutefois à réaliser pour *N. caninum*.

Mots-clés : criblage moléculaire, parasites protozoaires, chromatographie de partage centrifuge, Pathogen Box, écorces, molécules actives.

Screening and identification of active molecules towards *Toxoplasma gondii* and other protozoans of medical and veterinary interest.

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* and *Plasmodium falciparum* are mandatory intracellular protozoan parasites and are responsible for toxoplasmosis, neosporosis and malaria, respectively. The different treatments used are based on drug combination. However therapeutic failures and drug resistances have been described. Our work focused on the identification of active compounds isolated by Centrifugal Partition Chromatography (CPC) from crude barks extracts from *Anogeissus leiocarpus*, a West African tree known for its antimalarial activity, and ten trees from the Champagne-Ardenne region. First we studied the activity of the fractions obtained from the crude bark extract from *A. leiocarpus*. Trachelosperogenin E and the global extract without tannin showed a good activity by inhibiting host cell invasion by *T. gondii*. The latter was able to preserve mice survival toward chronic toxoplasmosis. These extracts were also active on *N. caninum* and *P. falciparum*. In a second part 30 crude barks extracts from ten trees located in the Champagne-Ardenne region were screened on *T. gondii* and *N. caninum*. Compounds responsible for the antiparasitic activity found in *Alnus glutinosa* were especially betulin and its derivatives. In the last part of this study we focused on the antiparasitic activity of 400 synthetic molecules from the Pathogen Box. Eight out of them were significantly efficient against *T. gondii*, among which three showed an important selectivity. Further experiments must be completed in the case of *N. caninum*.

Keywords: molecular screening, protozoan parasites, centrifugal partition chromatography, Pathogen Box, barks, active molecules.

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Parasitologie et chimie antiparasitaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

PROTAL – EA 3800

Laboratoire de Parasitologie – Mycologie EA 3800
UFR Médecine, 51 rue Cognacq Jay
51095 Reims Cedex

