

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE - EL HARRACH

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الزراعية- الحراش-

THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Activité anti leishmanienne de quelques plantes spontanées Algériennes vis-à-vis de *Leishmania major*

Présentée par : **BENELMOUFFOK Amina-Bouchra.**

Jury

Président	M	BICHE	M	Professeur	ENSA El Harrach
Directeur de thèse	M	SELLAMI	M	Professeur	ENSA El Harrach
Examineurs	M	DJAZOULI	Z-E	Professeur	ESSAIA Oued Smar
	M ^{me}	BEHIDJ	N	Professeure	Université M'Hamed Bougara Boumerdès

Année universitaire : 2021-2022

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de ma mère,

A mon père, pour son affection, son aide et ses encouragements,

A mon frère Adnane et son épouse Amel,

A ma sœur Mouni et son époux Yazid,

A mes sœurs Wafa et Patou,

Au rayon de soleil de la famille, ma nièce Asma –Mennouba,

A tous mes amis et collègues de L'ENSA (ex : INA), l'INPV et l'IPA.

Amina

Remerciements

Mes vifs remerciements vont à Monsieur le président du jury, le Professeur **Biche Mohamed** du « Département de Zoologie Agricole et Forestière de l'ENSA El Harrach », pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur **Sellami Mahdi**, mon directeur de thèse du « Département de Zoologie Agricole et Forestière de l'ENSA El Harrach » pour avoir dirigé ce travail. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour son aide, ses encouragements, sa patience et ses précieux conseils.

Mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Djazouli Zahr-Eddine** de « L'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires - Oued Smar », pour son aide très précieuse qui sans lui, ce travail n'aurait pas vu le jour. Il n'a jamais refusé son aide à chaque fois que je l'ai sollicité.

Je le remercie également pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail. Reconnaissance éternelle.

A Madame la Professeure **Behidj Nassima** de « l'Université M'Hamed Bougara Boumerdès », que je remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Soyez assurée ma vive gratitude.

Je remercie Madame la Professeure **Guizani-Tebbane Lamia** pour m'avoir accueillie dans le « Laboratoire de Parasitologie à l'Institut Pasteur de Tunis » et de m'avoir permis de travailler dans d'excellentes conditions.

A M^{elle} **Bouabid Cyrine** Doctorante à « l'Institut Pasteur de Tunis » pour son aide, sa disponibilité, son soutien. Reconnaissance éternelle.

Mes sincères remerciements vont à Madame la Responsable du « Département de Génie des Procèdes Faculté de Bab-Ezzouar » M^{me} **Moghrani Houria** M.C.A : Maître de conférence classe A et ses collaboratrices M^{elle} **Rabahi Amina**, et M^{me} **Brahim Meriem** de m'avoir permis de réaliser toutes mes extractions huiles essentielles.

A M^{me} **Tolba Hadjer** Doctorante à Bab Ezzouar pour son aide précieuse et sa disponibilité qu'elle trouve ici mes sincères remerciements.

A M^r **Tire** du « Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, Département de Chimie de la faculté de Bab Ezzouar » pour la réalisation de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Mes remerciements vont également à M^{me} **Hassiba** et M^{me} **Nadjet** du « Laboratoire de Toxicologie Dely-Brahim » pour leur aide précieuse dans l'interprétation de la chromatographie.

A M^{me} **Madina** Doctorante à « Bab Ezzouar » pour son aide, sa disponibilité, qu'elle trouve ici mes sincères remerciements

Je tiens à remercier M^r **Boukhatem Mohamed** de la « Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie -Université Saad Dahleb, Blida 1 » et M^r **Bellatreche Mohamed** de « l'INPV », pour leur aide précieuse; qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier tout particulièrement M^{lle} **Abdelli Lilia** pour les nombreuses relectures et corrections de mon anglais désastreux, qu'elle trouve ici mes sincères remerciements.

Mes remerciements vont également à M^{lle} **Kaci Zakia** pour sa générosité et ses conseils.

J'adresse mes remerciements et exprime ma gratitude à M^{mes} **Zouai Cherifa** de « l'INPV », M^{me} **Djebbari Kenza** du « Laboratoire de Bactériologie de l'ENSA El Harrach », M^{me} **Allouache Mounia** et M^{me} **Amina** du « Laboratoire de Contrôle Qualité de l'IPA » et M^{me} **Alamir Hanane** du « Laboratoire de Bactériologie Alimentaire de l'IPA » pour leur soutien, leur aide et leurs encouragements.

Je ne pourrais oublier de remercier mon « Chef de Service de Mycologie à l'IPA » M^{me} **Kellou Dahbia**, qui m'a toujours encouragée et soutenue ; qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et mes sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....	1
Chapitre I- Données bibliographiques.....	4
I- Généralités sur les leishmanioses.....	4
1-1- Définition des leishmanioses.....	4
1-2- Répartition géographique.....	4
1-2-1- Dans le monde.....	4
1-3- Epidémiologie.....	5
1-3-1- Etude du parasite.....	5
1-3-1-1-Taxonomie.....	5
1-3-1-2- Caractères morphologiques.....	6
a)-Le stade promastigote.....	6
b)-Le stade amastigote.....	6
1-3-1-3- Répartition géographique.....	7
a)-Au Maghreb.....	7
b)-En Algérie.....	8
1-3-2- Etude du vecteur.....	9
1-3-2-1-Taxonomie.....	9
1-3-2-2- Répartition géographique.....	9
a) - Dans le monde.....	9
b)- En Algérie.....	10
1-3-2-3-Description.....	12
1-3-2-4-Biologie.....	12
1-3-2-4-1- Les différents stades de développement.....	13
1-3-3- Etude du réservoir.....	14
1-3-3-1- <i>Psammomys obesus</i> (Cretzschmer, 1828).....	14
1-3-3-1-1- Classification.....	14
1-3-3-1-2- Répartition géographique.....	15
1-3-3-1-3- Description.....	15
1-3-3-1-4- Biologie.....	16

1-3-3-2- <i>Meriones shawi</i> (Duvernoy, 1842).....	16
1-3-3-2-1- Classification.....	16
1-3-3-2-2- Répartition géographique.....	17
1-3-3-2-3- Description.....	18
1-3-3-2-4- Biologie.....	18
1-3-4 - Cycle parasitaire de la leishmaniose.....	18
1-4 - Clinique (symptomatologie).....	20
1-4-1- La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ).....	20
1-4-2- La leishmaniose cutanée chronique (LCC).....	20
1-4-3- La leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS).....	20
1-5- Diagnostic.....	22
1-5-1- Examen Direct.....	22
1-5-2- Culture.....	22
1-5-3- Identification du parasite.....	22
1-6- Traitement.....	22
1-7- Méthodes d'évaluation de l'activité antiparasitaire.....	24
1-7-1- Comptage direct.....	24
1-7-2- Méthodes alternatives.....	25
1-7-3- Méthodes colorimétrique à base de sels de tétrazolium.....	25
II- Les métabolites secondaires des plantes.....	27
2- 1- Les composés terpéniques.....	27
2-1-1- Les terpènes.....	27
2-1-1-1- Données sur les huiles essentielles.....	27
2-1-1-1-1- Définition.....	27
2-1-1-1-2- Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles.....	28
2-1-1-1-3- Caractères physico-chimiques.....	28
2-1-1-1-4- Composition Chimique des Huiles Essentielles.....	28
2-1-1-1-4-1- Les mono terpènes.....	29
2-1-1-1-4-2- Les sesquiterpènes.....	29
2-1-1-1-4-3- Les composés aromatiques.....	29
2-1-2- Les hétérosides.....	29
2-1-2-1- Les saponines.....	29
2-2- Les composés phénoliques.....	30

2-2-1- Les flavonoïdes.....	30
2-2-2- Les tanins.....	30
2-2-3- Les coumarines.....	31
2-2-4- Les quinones.....	31
2-2-5- Les anthocyanes.....	31
2-2-6- Les acides phénoliques.....	31
2-3- Les composés azotés : les alcaloïdes.....	32
III - Procédés d'extraction des métabolites secondaires.....	33
3-1- Hydro distillation.....	33
3-2- Entraînement à la vapeur d'eau.....	33
3-3- Hydro diffusion.....	33
3-4- Extraction par du CO ₂ supercritique.....	33
3-5- Extraction assistée par micro-onde.....	34
3-6- Expression à froid.....	34
3-7- Extraction par solvants volatils.....	34
Chapitre II- Matériel et Méthodes.....	35
2-1- Matériel végétal.....	35
2-1-1- Extraction des métabolites secondaires.....	35
2-1-1-1- Extraction des huiles essentielles.....	36
a/ Procédé d'extraction (Hydro distillation).....	36
b/ Méthodes d'analyse et contrôle de la qualité des huiles essentielles.....	36
➤ Analyses des caractéristiques physico-chimiques.....	37
• Détermination de la densité (Norme NF T 75-111).....	37
• Détermination de l'indice de réfraction (Norme NF T 75- 112).....	37
➤ Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	38
2-1-2-1- Extraction par un solvant : Ethanol.....	40
a/ Procédé d'extraction (solvant).....	40
b/Tests phytochimiques.....	42
• les alcaloïdes.....	42
• les anthocyanes.....	42
• les coumarines.....	42

• les flavonoïdes.....	43
• les glucosides.....	43
• les quinones.....	43
• les saponosides.....	43
• les tanins totaux.....	43
2-2- Matériel biologique.....	44
2-3- Milieux de culture et Réactifs.....	44
2-4- Activité biologique.....	45
2-4-1- Action des huiles essentielles sur les promastigotes de <i>Leishmania major</i> (Activité antileishmanienne).....	45
2-4-2- Action des huiles essentielles sur les cellules Raw 264.7 (test de cytotoxicité).....	46
➤ Indice de sélectivité des huiles essentielles.....	47
2-4-3- Action des extraits totaux sur les promastigotes de <i>Leishmania major</i>	47
2-4-4- Analyse statistique.....	48
Chapitre III- Résultats et Discussion.....	49
3-1- Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.....	49
3-2- Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	50
3-3- Composition chimique des huiles essentielles.....	52
3-3-1- Composition chimique de l'HE d' <i>Artemisia campestris</i>	52
3-3-2- Composition chimique de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i>	55
3-3-3- Composition chimique de l'HE de <i>Ruta montana</i>	57
3-3-4- Composition chimique de l'HE de <i>Thymus palleescens</i>	59
3-3-5- Composition chimique de l'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	61
3-4- Les tests phytochimiques des extraits totaux.....	67
3-5 -Activité biologique.....	70
3-5-1- Action des huiles essentielles sur les promastigotes de <i>Leishmania major</i> (Activité antileishmanienne).....	70
3-5-2- Action des huiles essentielles sur les cellules Raw 264.7 : Test de cytotoxicité et indice de sélectivité.....	75
3-5-3- Action des extraits totaux sur les promastigotes de <i>Leishmania major</i>	81
Conclusion générale et perspectives.....	88

Références bibliographiques	91
Annexes	112
Annexe 01 : Caractéristiques des plantes étudiées.....	112
Annexe 02 : Composition du milieu NNN.....	124
Annexe 03 et 04 : Publications.....	125

Liste des figures

Figure 1: Phlébotome.....	4
Figure 2 : Répartition géographique et nombre de cas des leishmanioses cutanées dans le Monde.....	5
Figure 3: Formes promastigotes de <i>Leishmania</i>	6
Figure 4: Formes amastigotes de <i>Leishmania</i>	7
Figure 5: Répartition géographique des différentes espèces de leishmanies agents de la Leishmaniose Cutanée au Maghreb.....	8
Figure 6: Répartition géographique des différentes espèces de leishmanioses en Algérie.....	9
Figure 7: Répartition des principaux genres de phlébotomes dans le monde.....	10
Figure 8: Répartition géographique de <i>Phlebotomus papatasi</i>	12
Figure 9: Différents stades de développement des phlébotomes.....	13
Figure 10: Répartition géographique de <i>Psammomys obesus</i>	15
Figure 11: <i>Psammomys obesus</i>	16
Figure 12: Répartition géographique de <i>Meriones shawi</i>	17
Figure 13: <i>Meriones shawi</i>	18
Figure 14: Cycle parasitaire de la leishmaniose.....	19
Figure 15: Différents types de lésions cutanées de (LCZ).....	21
Figure 16: Lésion cutanée de (LCC).....	21
Figure 17: Lésion cutanée de (LCS).....	21
Figure 18: Structure des différents sels de tétrazolium.....	25
Figure 19: Mécanisme de réduction du MTT en formazan.....	26
Figure 20: Procédé d'analyse de la composition chimique d'une huile essentielle.....	39
Figure 21: Plan de la plaque pour l'activité antileishmanienne.....	46
Figure 22: Répartition en (%) des principales familles de composé d'HE d' <i>Artemisia campestris</i>	54
Figure 23: Répartition en (%) des principales familles de composé d'HE d' <i>Anethum graveolens</i>	56
Figure 24: Répartition en (%) des principales familles de composé d'HE de <i>Ruta montana</i>	58
Figure 25: Répartition en (%) des principales familles de composé d'HE de <i>Thymus pallelescens</i>	60

Figure 26: Répartition en (%) des principales familles de composé d'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	62
Figure 27: Les principaux composants de nos huiles essentielles	65
Figure 28: Structure chimique des principaux composés détectés dans nos huiles essentielles	65
Figure 29: Résultats du test MTT sur plaque après solubilisation.....	70
Figure 30: Pourcentage d'inhibition des promastigotes vis-vis des différentes concentrations	71
Figure 31: Pourcentage d'inhibition des promastigotes en fonction du Log des différentes concentrations.....	73
Figure 32: Résultats du test MTT sur plaque après solubilisation.....	75
Figure 33: Pourcentage de mortalité des macrophages vis-à-vis des différentes concentrations	76
Figure 34: Pourcentage d'inhibition des macrophages en fonction du Log des différentes concentrations.....	77
Figure 35: Résultats du test MTT sur plaque avant solubilisation.....	81
Figure 36: Résultats du test MTT sur plaque après solubilisation.....	82
Figure 37: Pourcentage d'inhibition des promastigotes vis-vis des différentes concentrations.	82
Figure 38: Pourcentage d'inhibition des promastigotes en fonction du Log des différentes Concentrations.....	83

Liste des tableaux

Tableau I: Quelques plantes ayant une activité antileishmanienne vis-à-vis de <i>L. major</i>	23
Tableau II: Les différentes plantes étudiées par hydrodistillation.....	36
Tableau III: Les différentes plantes étudiées par macération (Ethanol).....	41
Tableau IV: Résultats des analyses organo-leptiques des plantes étudiées par hydrodistillation.....	49
Tableau V: Résultats des analyses physico-chimiques des plantes étudiées par hydrodistillation.....	50
Tableau VI: Données bibliographiques des caractéristiques organo-leptiques et physico-chimiques des huiles essentielles.....	51
Tableau VII: Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE d' <i>Artemisia campestris</i>	53
Tableau VIII: Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i>	56
Tableau IX: Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE de <i>Ruta montana</i>	58
Tableau X: Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE de <i>Thymus pallescens</i>	60
Tableau XI: Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	62
Tableau XII: Composition chimique en pourcentage (%) des HEs par hydrodistillation.....	64
Tableau XIII: Résultats du screening phytochimique.....	67
Tableau XIV: Activité antileishmanienne in vitro des HE sur les promastigotes de <i>Leishmania major</i>	74
Tableau XV: Analyse de la variance et le test de Tukey des HE par le logiciel Graph Pad 5.....	74
Tableau XVI: Activité cytotoxique des HE sur les cellules Raw 264.7 et indice de sélectivité.....	78
Tableau XVII: Activité antileishmanienne des Ex.T in vitro sur les promastigotes de <i>Leishmania major</i>	84
Tableau XVIII: Analyse de la variance et le test de Tukey des (Ex.T) par le logiciel Graph Pad 5.....	84

Liste des Abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

A.c : *Artemisia campestris*

A.g : *Anethum graveolens*

ANOFEL : Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie

CDC: Centers for disease control and prevention

CG/MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

C.p : *Calotropis procera*

CPG : chromatographie en phase gazeuse

C.v : *Colocynthis vulgaris*

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO: Densité optique

ECD : Détecteur à capture d'électron

FID : Détecteur à ionisation de flamme

FeCl₃: Chlorure de fer

Hcl: Acide chlorhydrique

HE : Huile essentielle

H₂SO₄: Acide sulfurique

INPV : Institut National de la Protection des Végétaux

IR : Indice de rétention

I.v : *Inula viscosa*

KOH: Hydroxyde de potassium

L. : *Leishmania*

LC : Leishmaniose cutanée

LCC : Leishmaniose cutanée chronique

LCS : Leishmaniose cutanée sporadique

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique

Log : Logarithme népérien

LV : Leishmaniose viscérale

Mg: Magnésium

MSPRH : Ministère de la santé de la population et de la réforme hospitalière.

MTS:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium

MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide .

NIST : National Institute of Standards and Technology

NNN: Novy-Mac Neal- Nicolle

OMS : Organisation mondiale de la santé

P: *Phlebotomus*

P: Probabilité

PBS: Phosphate Buffered Saline

P.h: *Peganum harmala*

R.m: *Ruta montana*

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S : *Sergentomyia*

SVF: Sérum de Veau Fœtal

T(+) : Témoin positif

T(-) : Témoin négatif

T.p : *Thymus pallescens*

TR : Temps de rétention

T.v : *Thymus vulgaris*

TSD : Détecteur termo-ionique spécifique

WST-1: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

WST-8:2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

XTT: 2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide.

INTRODUCTION

Introduction

Les maladies à transmission vectorielle sont responsables de plus de 17% des maladies infectieuses et provoquent plus d'un million de décès chaque année dans le monde (OMS, 2020).

Elles dépendent des modifications environnementales qui sont dues essentiellement aux changements climatiques et aux activités de l'homme.

Ces changements entraînent l'introduction d'un pathogène dans une région où le vecteur est présent et/ou l'introduction de vecteurs dans une région préalablement indemne.

Les infections dues à des protozoaires flagellés occupent une place centrale, appartenant à la famille des Trypanosomatidae, *Leishmania sp* est responsable des leishmanioses avec 700 000 à 1 million de nouveaux cas chaque année (OMS, 2020).

Les leishmanioses représentent un véritable problème de santé publique en Algérie et occupent la première place des maladies parasitaires à déclaration obligatoire (Achour-Barchiche et Madiou, 2009). Deux formes cliniques sévissent à l'état endémique : La leishmaniose viscérale (LV) et la leishmaniose cutanée (LC).

La (LC), plus fréquente et plus extensive que la (LV) est représentée par trois entités cliniques et trois parasites différents. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) du sud à *Leishmania major* inféodé aux régions steppique et saharienne (Harrat et al., 1996 et Bachi, 2006), la leishmaniose cutanée chronique à *Leishmania killicki* proche de *Leishmania tropica* limitée pour le moment à Ghardaïa, au sud du pays (Harrat et al., 2009) et La leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) à *Leishmania infantum* dans la région du Tell (Harrat et al., 1996 et Bachi, 2006).

Longtemps confinée au Sahara, la (LCZ) à *Leishmania major* connaît une extension géographique en dehors des foyers naturels de la maladie ceux de Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest vers les Hauts Plateaux avec une survenue d'épidémie, en 1982 à M'sila (Belazzoug, 1982) suivie d'une autre en 1985 à Ksar Chellala (Tiaret) (Belazzoug, 1986). Ces dernières années, la barrière géographique formée par l'Atlas tellien, qui sépare la forme cutanée du nord et la forme cutanée du sud a été franchie avec une avancée rapide de cette dernière vers le nord du pays (Boudrissa et al., 2012). Le réservoir de la (LCZ) est représenté essentiellement par deux rongeurs gerbillidés. Le premier étant *Psammomys obesus* (le Rat des sables), (Belazzoug, 1983 et Ashford, 2000) et le second *Meriones shawi* (la Merione de

Shaw) (Belazzoug, 1986 et Kowalski et Rzebik-kowalska, 1991). Dans ces régions cohabitent le principal vecteur *Phlebotomus papatasi* (Dedet et al., 1984 et Izri et al., 1992).

Selon l'Institut National de la Santé Publique (INSP) le taux d'incidence de la (LC) a augmenté, il est passé de 11,62 en 2014 à 28,19 en 2017 cas pour 100.000 habitants. Cette recrudescence et la propagation de la maladie à de nouveaux foyers font de la leishmaniose cutanée un problème épineux. Malgré cette alerte, la lutte contre cette maladie n'a jamais réussi à établir une stratégie efficace et durable. Celle adoptée par le comité technique national mis en place en 2006 par le Ministère de la Santé Publique et la Réforme Hospitalière (MSPRH), repose essentiellement sur la lutte anti-vectorielle par des aspersions intra domiciliaires et extra domiciliaires d'insecticides rémanents avec pour objectifs de réduire de 50% l'incidence annuelle. Malheureusement, celle ci continue d'augmenter et s'explique par l'absence d'action ciblant efficacement le réservoir du parasite. Cependant, *Psammomys obesus* est une espèce protégée dans notre pays (Loi du 20 août 1983) et le deuxième réservoir est péri domestique représenté par *Meriones shawi* est l'une des espèces arvicoles les plus dévastatrices en Algérie, elle cause d'importants dégâts dans nos parcelles agricoles notamment sur céréales. Une campagne de lutte est décrétée tous les ans par l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) à partir du mois d'octobre à fin mars, correspondant à la période de disette du rongeur qui se pratique uniquement au niveau des zones agricoles, ce qui ne permettra guère l'éradication définitive de ce fléau, notamment avec le développement de l'agriculture steppique. L'absence d'une stratégie adéquate de lutte dans les zones non agricoles permet à ces mammifères d'envahir de nouveaux espaces et d'élargir leur zone de reproduction.

Le traitement des leishmanioses reste complexe, en raison de la multiplicité des formes cliniques, de la variabilité de leur évolution et des différentes espèces de *Leishmania* impliquées.

Il n'existe pour le moment aucun vaccin ni médicament prophylactique. L'OMS préconise une approche thérapeutique prenant en compte les différents aspects cliniques et parasitologiques de la maladie.

En général, le traitement des leishmanioses est dominé, par les dérivés antimoniés pentavalents qui demeurent encore de nos jours les médicaments de première intention dans plusieurs pays endémiques (Bachi, 2006). La toxicité et le coût élevé des médicaments antileishmaniens habituels ainsi que l'émergence grandissante des souches parasitaires résistantes ont fait que la recherche d'espèces végétales endémiques antileishmaniennes efficaces et peu toxiques continue de s'imposer.

L'Algérie, par sa position géographique présente une grande diversité végétale, les chances de trouver des plantes actives contre cette maladie sont importantes. Cette richesse végétale est due à une grande variété de biotopes liée à des différences d'altitudes ainsi qu'à des facteurs climatiques.

Notre étude s'est portée sur neuf (09) plantes spontanées. Elles ont été choisies en raison de leur vaste connaissance chez la population algérienne, notamment la population steppique et Saharienne. Elles ont une valeur thérapeutique dans la médecine traditionnelle. Sur le plan systématique, ces plantes appartiennent à des familles différentes ce qui leur confère des caractéristiques différentes.

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à évaluer *in vitro*, l'activité antileishmanienne de quelques plantes spontanées algériennes afin, d'identifier les plantes à effets leishmanicides et éviter celles qui sont toxiques pour l'homme.

Sur le plan structural, ce manuscrit est divisé en 3 parties :

Dans la première partie, on présentera une revue bibliographique relative aux généralités sur les leishmanioses, les caractéristiques des plantes spontanées retenues, des généralités sur les métabolites secondaires des plantes, des procédés d'extraction et les principales méthodes d'identification de ces derniers.

La seconde partie sera consacrée aux matériel et méthodes :

Présenter le matériel végétal suivi de l'extraction et l'identification des métabolites secondaires puis évaluer l'activité antileishmanienne *in vitro* sur des cultures de *Leishmania major* et le test de cytotoxicité sur les cellules macrophagiques Raw264.7.

La troisième partie est consacrée aux résultats et discussion des travaux réalisés.

On terminera par une conclusion générale et des perspectives.

Données bibliographiques

Chapitre I- Données bibliographiques

I - Généralités sur les leishmanioses

1 -1 – Définition des leishmanioses

Les leishmanioses sont un groupe de maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* (Dedet, 2009). Ces parasites affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'Homme (Dedet, 2009), auxquelles ils sont transmis par la piqûre infestante d'un vecteur femelle hématophage appartenant au genre *Phlebotomus*. (Fig.01). Deux formes sévissent à l'état endémique la leishmaniose viscérale (LV) et la leishmaniose cutanée (LC).



(Photo : Cabanillas, 2011)

Figure 1: Phlébotome

1-2- Répartition géographique

1-2-1- Dans le monde

Largement répandues à la surface du globe, les leishmanioses cutanées connaissent une aire géographique intertropicale (Dedet, 2009). On distingue deux grandes situations géographiques, l'Ancien monde (Sud de l'Europe, l'Afrique, le Proche-Orient, le Moyen-Orient et l'Asie) et le Nouveau monde (Amériques du Sud et Centrale) (Fig.02). Présentes sur quatre continents, les leishmanioses affectent 88 pays dont 72 parmi les plus faiblement développés (Dedet, 2009).

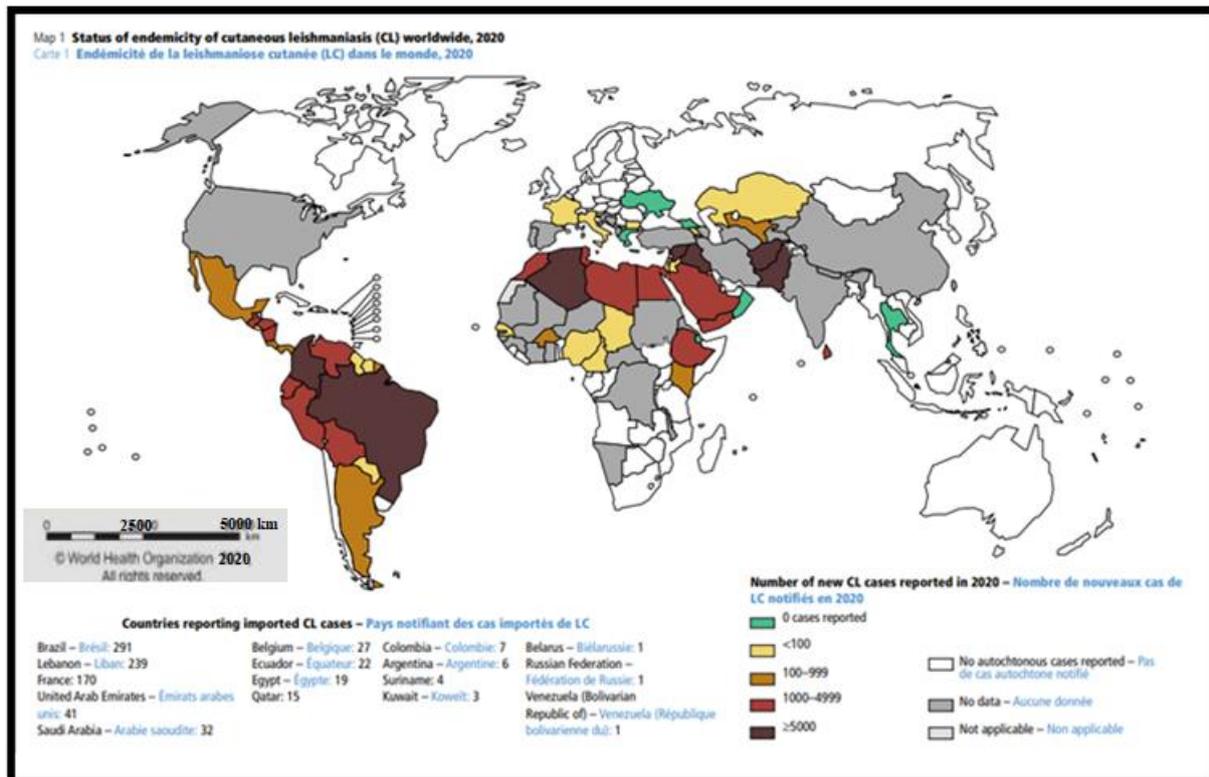


Figure 2 : Répartition géographique et nombre de cas des leishmanioses cutanées dans le monde (OMS, 2021)

1-3- Epidémiologie

1-3-1- Etude du parasite

1-3-1-1- Taxonomie

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés dont la classification selon Levine *et al.*, (1980) est la suivante :

Règne : Protista Haeckel, 1866

Sous-Règne : Protozoa Goldfuss, 1817 emend. Siebold, 1848.

Embranchement : Sarcomastigophora Honigberg et Balamuth, 1963

Sous- Embranchement : Mastigophora Diesing, 1866

Classe : Zoomastigophora Calkins, 1909

Ordre : Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976

Sous-Ordre : Trypanosomatina Kent, 1880

Famille : Trypanosomatidae Doflein, 1901 emend. Grobben, 1905

Genre: *Leishmania* Ross, 1903

Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie similaire, elles sont à l'origine de manifestations cliniques allant d'infections cutanées à viscérales.

1-3-1-2- Caractères morphologiques

Les leishmanies présentent au cours de leur cycle, deux stades évolutifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Ils se multiplient aux deux stades par division binaire simple (Dedet, 2009).

- a) **Le stade promastigote** : le parasite mesure environ 10 à 25 μm de longueur. Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure (Fig.03). C'est le stade du parasite dans le tube digestif du phlébotome et en culture (Dedet, 2009).



Figure 3: Formes promastigotes de *Leishmania* (Mihoubi, 2006)

- b) **Le stade amastigote** : le parasite est un petit corpuscule ovalaire ou arrondi de 2 à 6 μm de diamètre, présentant un noyau, un kinétoplaste et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur (Fig.04). c'est le stade du parasite chez les mammifères, où il est localisé à l'intérieur des cellules des phagocytes mononucléés (Dedet, 2009).

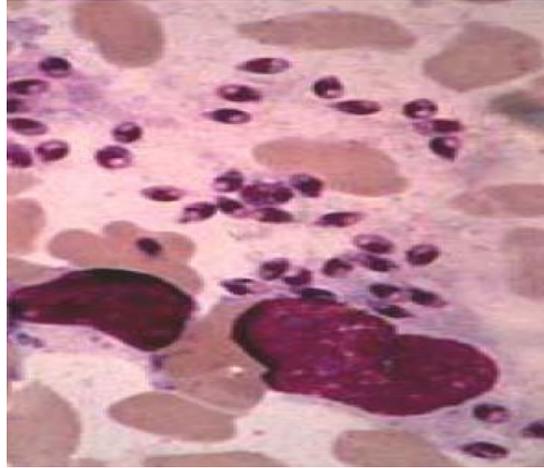


Figure 4: Formes amastigotes de *Leishmania* (Mihoubi, 2006)

1-3-1-3- Répartition géographique

a) - Au Maghreb

La leishmaniose cutanée au Maghreb est causée par quatre espèces différentes avec des répartitions géographiques et des manifestations cliniques propres (Chaara, 2014).

La Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) due à *L. major* est répandue et limitée aux régions arides sahariennes. Au Maroc, cette maladie est présente dans la région désertique au sud des montagnes de l'Atlas, dans une bande bordant le désert du Sahara (Rioux et *al.*, 1986a ; Rhajaoui et *al.*, 2007). En Algérie, LCZ est rencontrée principalement dans les régions steppiques des zones semi-arides et arides (Harrat et *al.*, 1996). En Tunisie Cette forme couvre l'ensemble du centre et le sud (Haouas et *al.*, 2012). Enfin en Libye, cette dernière couvre la partie nord-ouest du pays. (Amro et *al.*, 2012) (Figure 05).

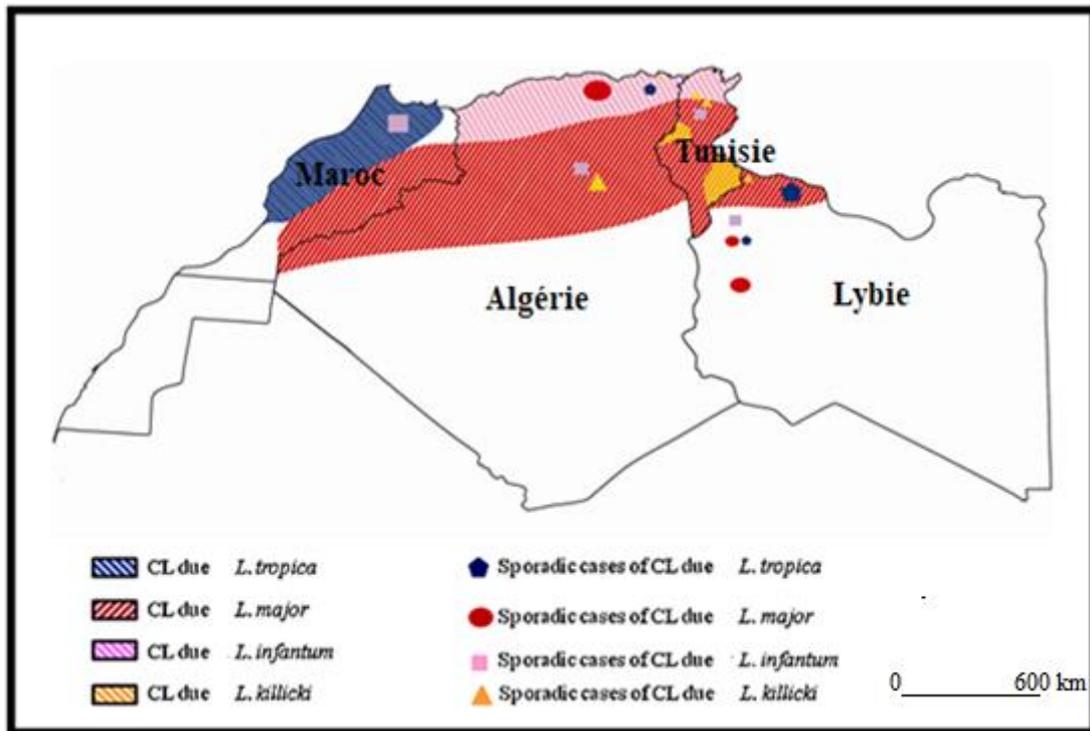


Figure 5. Répartition géographique des différentes espèces de leishmanies agents de la Leishmaniose Cutanée au Maghreb (Charaa, 2014)

b) - En Algérie

En Algérie, les leishmanioses cutanées sont représentées par trois entités cliniques différentes : la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) à *L. major*, (autrefois dénommée clou de Biskra), sévit à l'état endémo-épidémique sur toute la frange nord-saharienne correspondant aux étages bioclimatiques semi-aride et aride (Harrat et *al.*, 1996 ; Bachi, 2006).

Les foyers anciennement connus sont ceux de Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest. Cette forme cutanée connaît une véritable extension vers les Hauts Plateaux avec une survenue d'épidémie, en 1982 à M'sila (Belazzoug, 1982) suivie d'une autre en 1985 à Ksar Chellala (Tiaret) (Belazzoug, 1986). Cependant, d'autres foyers ont émergé dans la partie nord de la chaîne de l'Atlas Tellien (Boudrissa et *al.*, 2012).

Dans la wilaya de Ghardaïa, à côté de *L. major*, une nouvelle espèce a été isolée, *L. killicki* (Harrat et *al.*, 2009).

Au nord, la leishmaniose cutanée sporadique à *L. infantum*, touche tout le littoral et le Tell algérien et s'observe de façon permanente durant toute l'année (Bachi, 2006) (Fig.06).

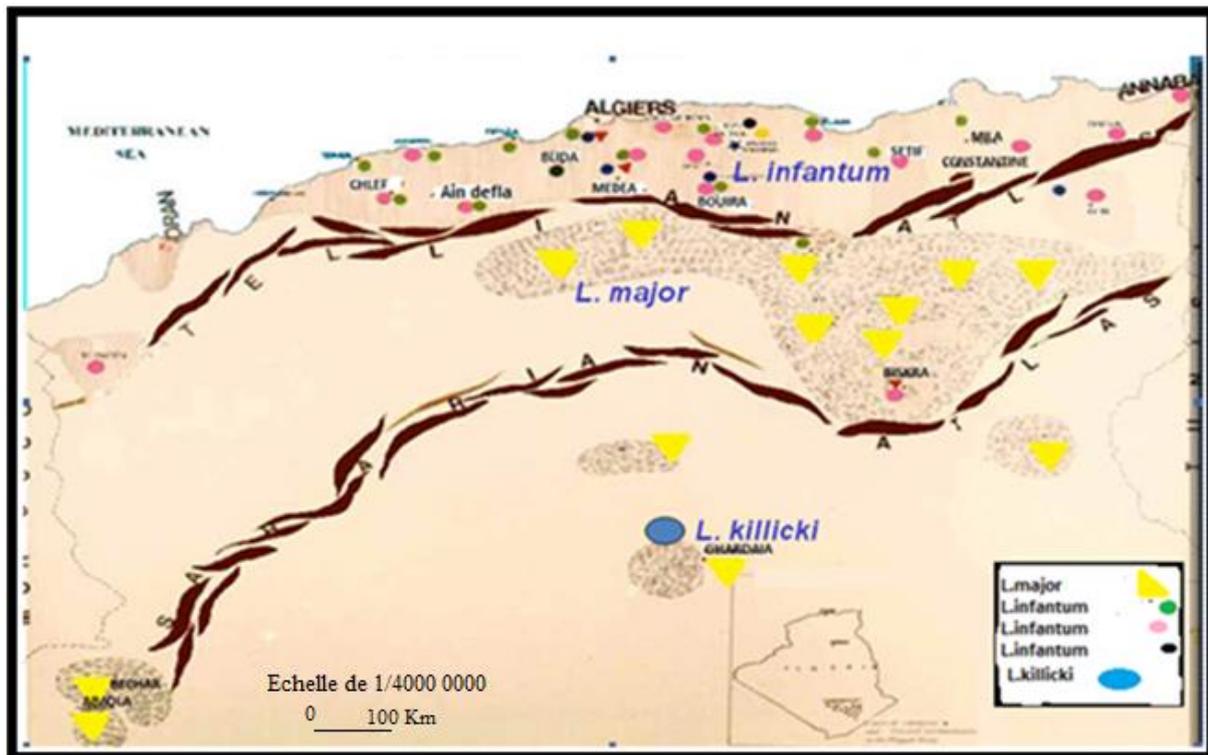


Figure 6: Répartition géographique des différentes espèces de leishmanioses en Algérie (Harrat, 2005)

1-3-2- Etude du vecteur

1-3-2-1-Taxonomie

Les phlébotomes appartiennent à l'Ordre des Diptera, au sous-ordre des Nematocera, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae (Killick Kendrick, 1990), qui regroupe environ 800 espèces largement réparties dans les régions tropicales et tempérées (Izri et al, 2006). Ils représentent un maillon important dans la chaîne de transmission.

1-3-2-2- Répartition géographique

a) Dans le monde

Dans le monde, l'aire de répartition des phlébotomes est très vaste et se rencontre sur tous les continents, mais ne dépasse pas certaines latitudes (Fig.07).

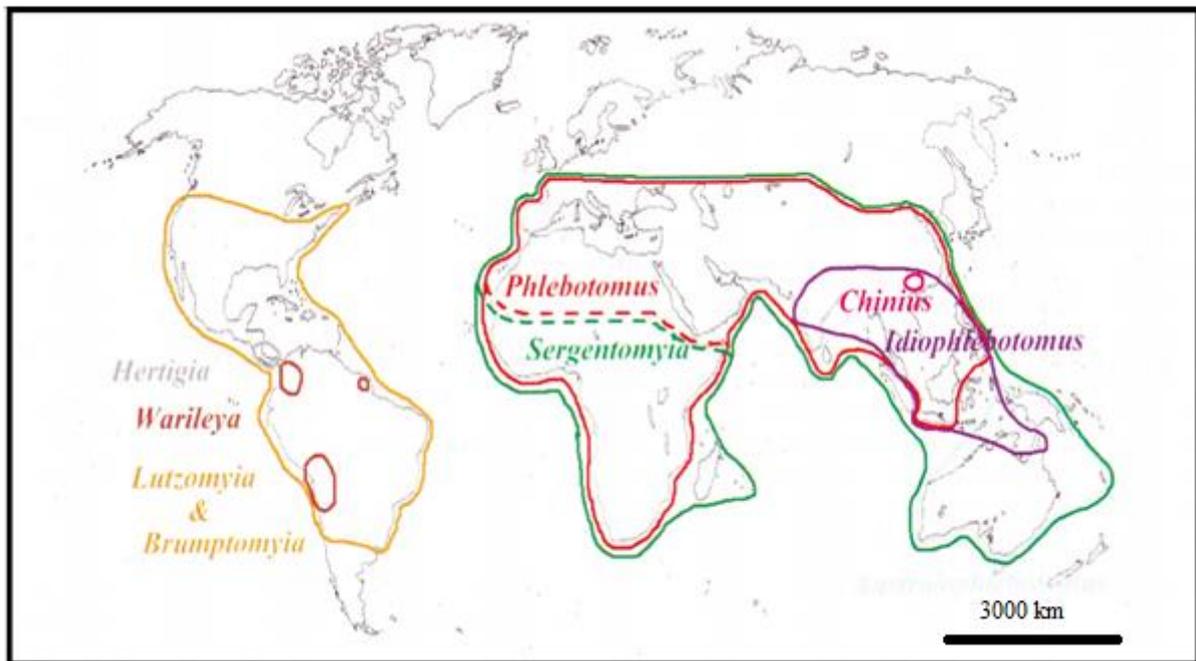


Figure 7 : Répartition des principaux genres de phlébotomes dans le monde
(Léger et Depaquit, 2002).

Les zones tropicales et subtropicales constituent, par leurs climats, les régions préférentielles des phlébotomes. Cette distribution résulte des exigences thermiques de ces insectes qui ont besoin d'une température assez élevée leur permettant d'entrer en activité durant au moins une période de l'année. A l'intérieur de cette aire, la répartition des différentes espèces varie avec la latitude. A côté de cette répartition géographique, on note une stratification écologique qui fait correspondre à chaque type de paysage sa faune phlébotomienne (désert, forêt...). Au sein de la strate écologique, la répartition des espèces varie en fonction des biotopes et des micro-climats (Abonnec, 1972).

Il existe un genre prédominant dans le Nouveau Monde, *Lutzomyia* rencontré principalement dans les forêts de l'Amérique du Sud. Dans l'ancien monde, 02 genres prédominent *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Leger et Depaquit, 2002).

b) En Algérie

Actuellement, 24 espèces de phlébotomes sont connues en Algérie 14 appartiennent au genre *Phlebotomus* et 10 au genre *Sergentomyia* (Allal-Ikhlef, 2018). Ils sont répartis sur tout le territoire national, de l'étage humide jusqu'à l'étage saharien (Dedet et al., 1984, Berchi., 1990, Belazzoug., 1991, Izri et Belazzoug, 1993).

► Etage humide : Il a été signalé une seule espèce du genre *Sergentomyia* (*S*): *S. minuta parroti* et sept espèces du genre *Phlebotomus* (*P*) à savoir *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. sergenti*, *P. chadlii*, *P. longicuspis* et *P. papatasi*. L'espèce prédominante reste *S. minuta parroti* (Dedet et al., 1984, Belazzoug., 1991, Berchi., 1993.).

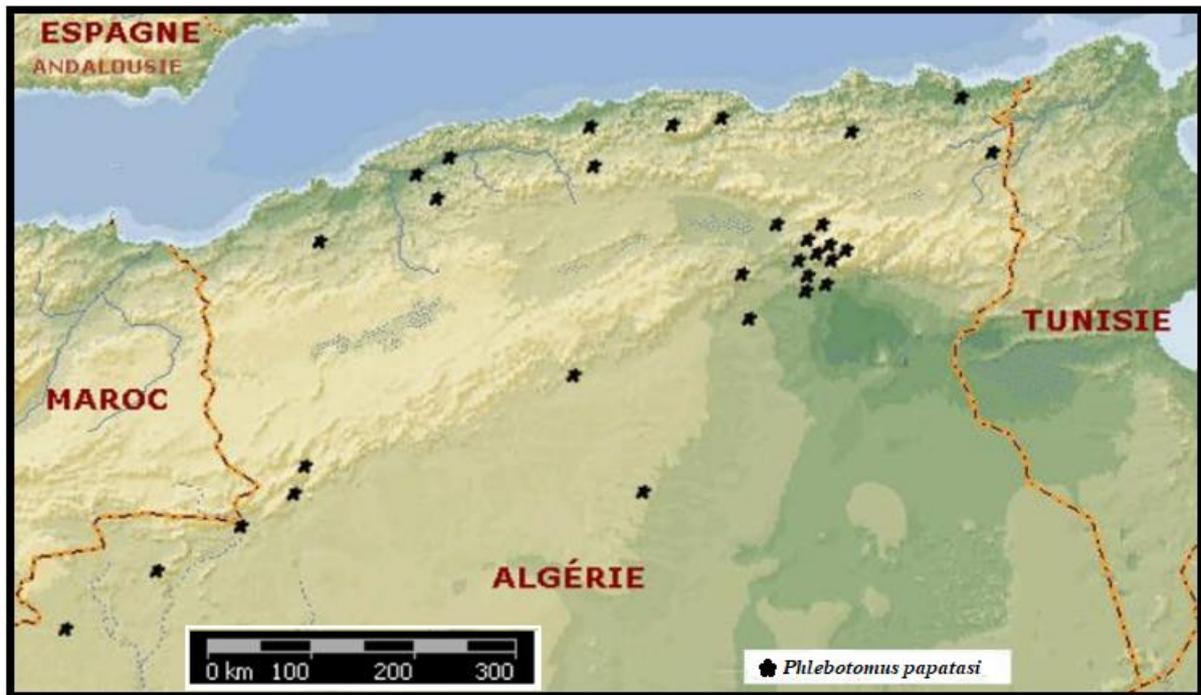
► Etage sub-humide : une espèce du genre *Sergentomyia*, *S. minuta parroti* prédomine et sept espèces du genre *Phlebotomus* qui sont les mêmes espèces que celles rencontrées à l'étage précédent à l'exception de *P. ariasi* qui est remplacée par *P. langeroni*. *P. perfiliewi* est à son maximum d'abondance (Dedet et al., 1984, Belazzoug., 1991).

► Etage semi-aride : on rencontre deux espèces du genre *Sergentomyia*: *S. minuta parroti* et *S. fallax* et huit espèces du genre *Phlebotomus* qui sont: *P. chabaudi* et les sept espèces du genre *Phlebotomus* rencontrées à l'étage sub-humide. *P. perniciosus* est l'espèce prédominante de cet étage où elle trouve son optimum écologique (Dedet et al., 1984, Belazzoug., 1991).

► Etage aride : seules quatre espèces du genre *Sergentomyia* sont trouvées soit, *S. fallax* (où elle trouve son optimum écologique), *S. minuta parroti*, *S. antennata* et *S. dreyfussi*. On rencontre également l'espèce du genre *Paraphlebotomus*: *P. alexandri* et les sept espèces du genre *Phlebotomus* rencontrées à l'étage précédent. L'espèce prédominante est *S. fallax* (Dedet et al., 1984, Belazzoug., 1991).

► Etage saharien : est peuplé de quatre espèces du genre *Sergentomyia* *S. minuta parroti*, *S. fallax*, *S. christophersi* et *S. dreyfussi* et cinq espèces du genre *Phlebotomus* de l'étage précédent à savoir : *P. perfiliewi*, *P. sergenti*, *P. chadlii*, *P. longicuspis* et *P. papatasi* se trouve son optimum écologique (Dedet et al., 1984, Belazzoug., 1991).

Phlebotomus papatasi vecteur de *Leishmania major* est largement répandu sur tout le territoire algérien. Il est particulièrement abondant dans toute la frange steppique nord saharienne, mais se rencontre également dans le Tell et sur les hauts plateaux (Fig.08) (Dedet et al, 1984)



(Dedet et al., 1984 et Collection Microsoft Encarta, 2004)

Figure 8 : Répartition géographique de *Phlebotomus papatasi* en Algérie

1-3-2-3-Description

A l'état adulte, ce sont des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps : 1,5 à 4mm). De couleur claire, en général jaune paille, leur corps est couvert de soie et ils présentent des ailes lancéolées dressées.

1-3-2-4-Biologie

Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement pré imaginal (œuf, quatre stades larvaires et nymphe) se déroule dans la terre humide.

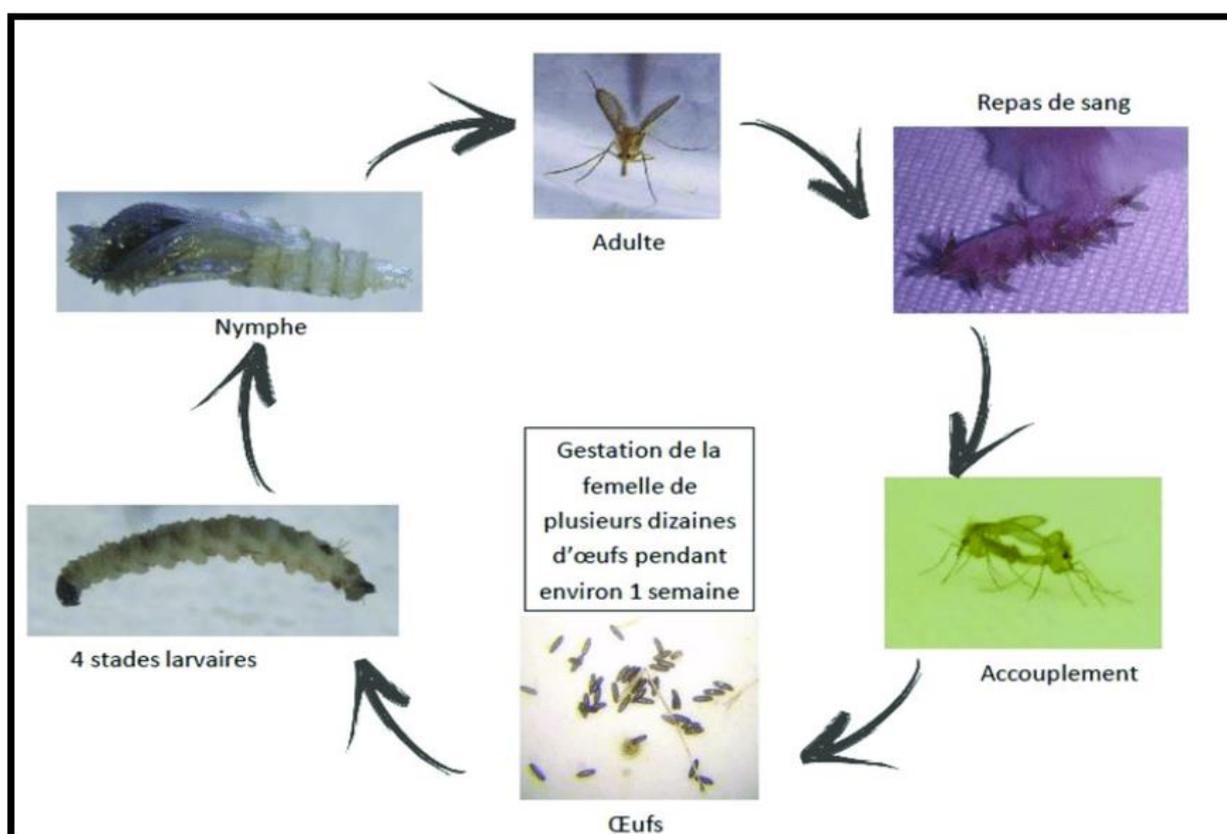
Seule la femelle, hémaphage, assure la transmission de la leishmaniose. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée, où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier (Dedet, 2009). Dans ces zones tempérées, les phlébotomes s'adaptent aux conditions hivernales en entrant en diapause. En effet, le développement des larves issues de la dernière génération d'automne, est arrêté au quatrième stade sous l'effet de la diminution de la température. Elles reprennent leur activité au printemps suivant avec la survenue des conditions favorables (Garnotel, 2011).

1-3-2-4-1- Les différents stades de développement

Les femelles pondent leurs œufs 5-10 jours après la copulation dans les terriers de certains rongeurs, dans l'écorce des vieux arbres, dans les ruines, les fissures des murs de maisons, dans les ordures ménagères, là où les larves pourront trouver la chaleur, l'humidité et les matières organiques nécessaires à leur développement.

La nymphose se déroule généralement dans un lieu moins humide et la nymphe donne l'adulte après 7-10 jours (Prudhomme, 2015) (Fig.09).

C'est autour de son gîte et au cours de vols vespéraux et nocturnes que la femelle part en quête de sang. La durée de vie des femelles varie de 2 semaines à 2 mois, en fonction de la température et de l'hygrométrie (plus celles-ci sont élevées, plus elles vivent longtemps) (Dedet, 2001) et (Houti et *al*, 2012).



(Prudhomme, 2015)

Figure 9 : Différents stades de développement des phlébotomes

Les biotopes de cette espèce sont variés, elle est rencontrée principalement au niveau des orifices de terriers de *Psammomys obesus* réservoir de la leishmaniose cutanée, dans les villes,

abondante à l'intérieur ou sur les murs extérieurs des habitations. En plein nature *Phlebotomus papatasi* se rencontre dans les terrains plats ou sur les bas de versant, à couverture végétale rase de type steppique et sur sol pierro-rocheux (Dedet et al, 1984).

1-3-3- Etude du réservoir

Les réservoirs naturels de *Leishmania major* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclées.

Deux (02) rongeurs parmi les 26 espèces recensées en Algérie sont considérés comme réservoirs de leishmaniose cutanée zoonotique. Le premier *Psammomys obesus* (Cretzschmer, 1828) et le second *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842), appartiennent à la famille des Muridés.

1-3-3-1-*Psammomys obesus* (Cretzschmer, 1828)

Le rat des sables, *Psammomys obesus*, est considéré comme le principal réservoir de *L. major* en Afrique du Nord (Belazzoug, 1983 ; Ashford, 2000).

1-3-3-1-1-Classification

Règne : Animalia

Embranchement : Chordata

Sous-embranchement : Vertebrata

Classe : Mammalia

Sous-classe : Theria

Infra-classe : Eutheria

Ordre : Rodentia

Sous-ordre : Myomorpha

Famille : Muridae

Sous-famille : Gerbillinae

Genre : *Psammomys*

Nom binominal : *Psammomys obesus* (Cretzschmer, 1828)

Appelé : Rat des sables diurne, Gros rat du sable ou *Psammomys* obèse.

1-3-3-1-2- Répartition géographique

En Algérie, le rat des sables (*Psammomys obesus*) se trouve à la partie sud des Hauts-plateaux en passant par l'Atlas Saharien et le Sahara (Kowalski et Rzebik-Kowalska, 1991 ; Ahmim, 2019).

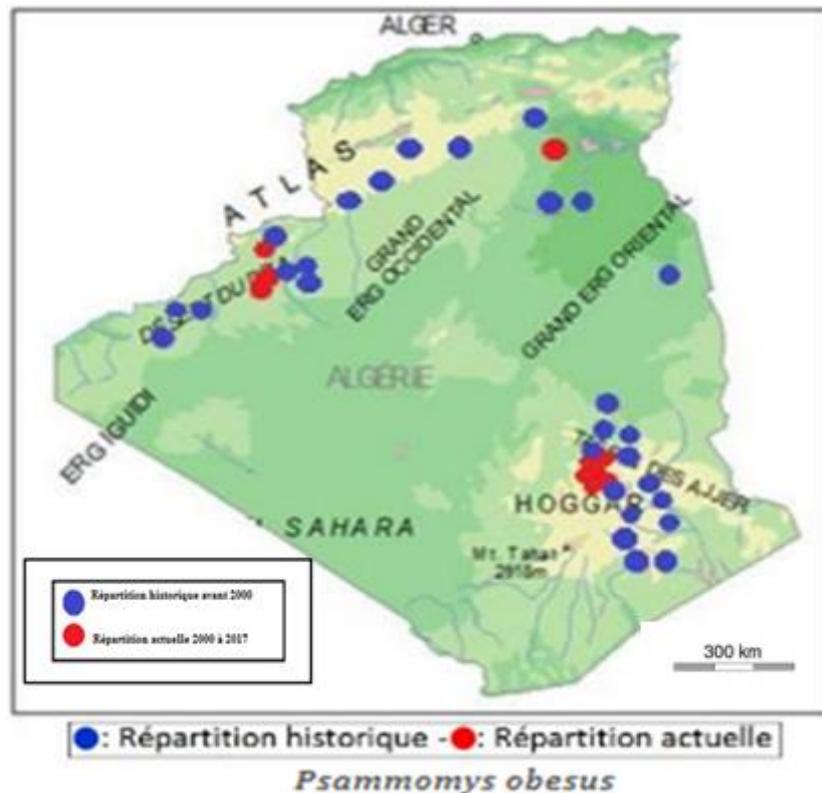


Figure10: Répartition géographique de *Psammomys obesus* en Algérie (Ahmim, 2019)

1-3-3-1-3- Description

Le rat des sables (Fig.11) est une grosse espèce de gerbille trapue ayant une longueur tête-corps de 13 à 19 cm et une queue de 11 à 15 cm. Il a de petites oreilles arrondies. Sa queue est entièrement poilue et se termine par une touffe noire. Le dessus du corps est brun-rougeâtre, rougeâtre, jaunâtre ou chamois. Le dessous du corps est jaunâtre ou blanchâtre. Contrairement aux Mériones, les incisives du rat des sables ne poussent pas.



(Ahmin, 2019)

Figure 11 : *Psammomys obesus*

1-3-3-1-4-Biologie

Psammomys obesus est un herbivore saharien qui se nourrit de plantes de la famille des *Chenopodiaceae* (Cherif, 2014). Ce rongeur ne se trouve que dans le biotope lui assurant une abondance de végétaux pendant toute l'année. Cette végétation ne prospère que dans les lits d'oueds, les dépressions sableuses ou argileuses, les ravins et les pieds des falaises où le sol conserve un certain taux d'humidité. *Psammomys obesus* a une activité diurne, il peuple les régions des chotts et sebkha (Cherif, 2014). *Psammomys obesus* vit à l'âge adulte dans un terrier individuel. En général, les orifices des terriers sont à la base de dômes de terre sablonneux, recouvert par des touffes de plantes halophiles où dominent les Chénopodiacées. La période de reproduction se situe d'avril à juin (Amirat et al., 1975). La durée de gestation est de 25 jours selon Petter (1961). Le nombre de petits varie de 3 à 7.

1-3-3-2- *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842)

1-3-3-2-1-Classification

Selon Petter et Saint Girons (1965) Classification de *Meriones shawi*

Règne : Animalia

Embranchement : Chordata

Sous-embranchement : Vertebrata

Classe : Mammalia

Sous-classe : Theria

Infra-classe : Eutheria

Ordre : Rodentia

Sous-ordre : Myomorpha

Famille : Muridae

Sous-famille : Gerbillinae

Genre : *Meriones*

Sous-genre : *Meriones (Pallasiomys)*

Nom binominal : *Meriones (Pallasiomys) shawi* (Duvernoy, 1842)

1-3-3-2-2-Répartition géographique

Répandue au nord du Sahara du Maroc à l’Egypte (Rioux et *al.*, 1986 ; Aulagnier et Thevenot, 1986)

En Algérie, elle est présente du littoral jusqu’aux hauts plateaux (Kowalski et Rzebik-Kowalska, 1991) (Fig. 12). C’est une espèce qui fréquente des biotopes relativement humides par rapport aux autres Gerbillidés (Aulagnier et Thevenot, 1986). Actuellement, d’après l’enquête réalisée par (Ahmim, 2019) a signalé la présence de la mérione au niveau de la wilaya d’Illizi et Tindouf probablement dûe au développement de l’agriculture saharienne et la présence de nappes phréatiques.

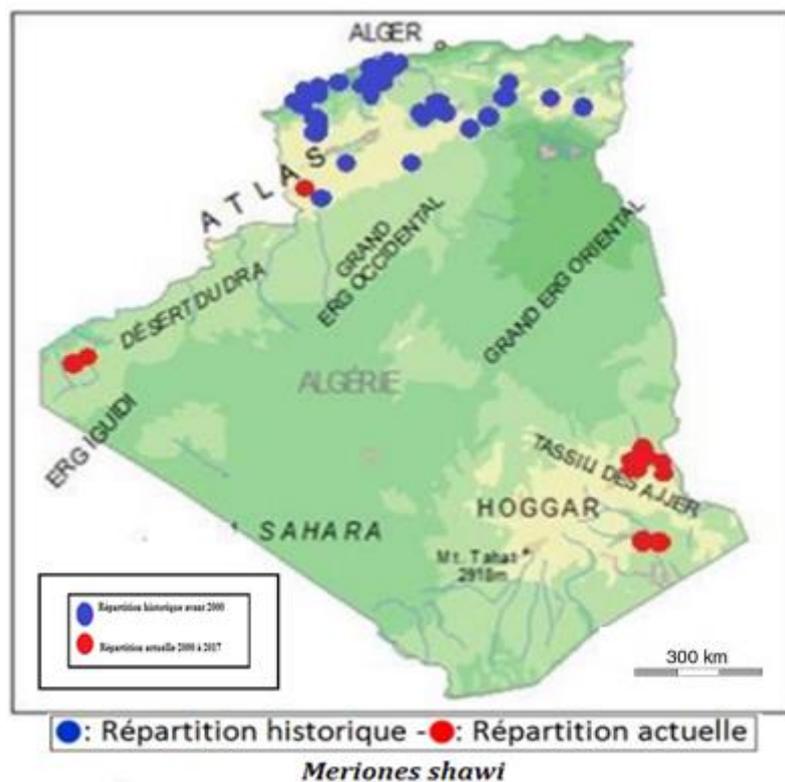


Figure12: Répartition géographique de *Meriones shawi* en Algérie (Ahmim, 2019)

1-3-3-2-3- Description

La mérione de Shaw (Fig. 13) est l'espèce la plus grande du genre (Aulagnier et Thevenot, 1986) se caractérise par un pelage de couleur roux au niveau dorsal et blanc au niveau ventral. Sa taille est de l'ordre de 40 cm (corps et queue comprise). Elle a une paire d'incisives saillantes et à croissance continue. La queue se termine par un pinceau. Les pattes postérieures sont plus longues que les pattes antérieures.



(Ahmim, 2019)

Figure 13: *Meriones shawi*

1-3-3-2-4- Biologie

L'activité de la mérione est diurne ou nocturne en période froide et crépusculaire ou nocturne en période chaude. Elle prolifère après une bonne année agricole, lorsque la pluviométrie est importante entre le mois de novembre et le mois d'avril. La période de reproduction commence en fin d'hiver et atteint le maximum au printemps. La durée de gestation est de l'ordre de 20 jours. Le nombre de petits est de 5 à 12 par portée.

Le régime alimentaire de la mérione est très varié ; elle consomme des fruits et légumes au printemps, des céréales en automne et lorsque la source de nourriture est tarie en hiver, elle peut consommer des insectes (INPV, 2012).

1-3-4- Cycle parasitaire de la leishmaniose

La leishmaniose est transmise par la piqûre des phlébotomes femelles. Les phlébotomes injectent la larve au stade infectieux, de promastigotes métacycliques, pendant le repas de sang (1). Les promastigotes métacycliques qui atteignent la plaie de piqûre sont phagocytés par les macrophages (2) et se transforment en amastigotes (3). Les amastigotes se multiplient

dans les cellules infectées et atteignent différents tissus, suivant (du moins en partie) l'espèce de *Leishmania* qui est impliquée (4). Ces spécificités d'atteinte tissulaires différentes sont la cause des manifestations cliniques qui diffèrent dans les diverses formes de leishmaniose.

Les phlébotomes s'infectent pendant les repas de sang sur un hôte infecté quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes (5.6). Dans l'intestin du phlébotome, les parasites se différencient en promastigotes (7), qui se multiplient et se différencient en promastigotes metacycliques et migrent dans la trompe du phlébotome (8) (CDC, 2017) (Fig.14).

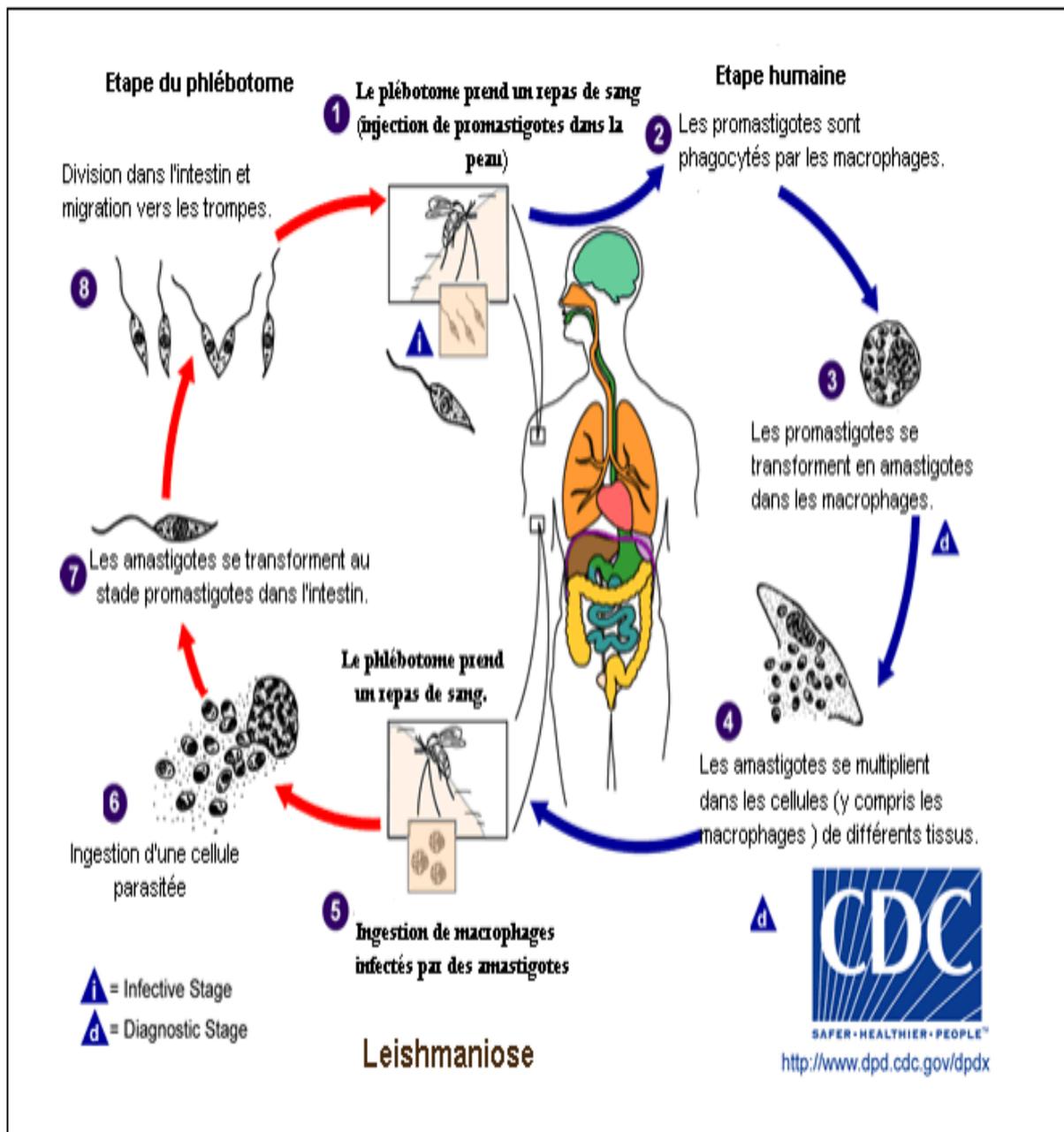


Figure 14 : Cycle parasitaire de la leishmaniose
(Centres pour le contrôle et la prévention des maladies, 2017)

1- 4 - Clinique (symptomatologie)

1-4-1- La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)

La LCZ à *Leishmania major* est dite également la leishmaniose cutanée humide des zones rurales. Après une incubation courte, apparaît la lésion caractéristique : ulcération cutanée, à bords surélevés, avec une croûte centrale adhérente, indolore, de taille variable (habituellement de 1 à 4 cm de diamètre), d'évolution chronique. A côté de cette forme, la plus fréquente, s'observent les formes ulcéro-végétantes, verruqueuses et plus rarement lupoides (Bachi, 2006).

Les lésions peuvent se rencontrer sur une quelconque partie de la surface du corps, mais siègent en général, sur les parties découvertes exposées au site de piqûre du phlébotome (Fig.15). Les formes cliniques multiples diffèrent d'un sujet à l'autre, d'une lésion à l'autre chez un même individu et selon la localisation sur le corps.

Les lésions évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois au prix d'importantes cicatrices disgracieuses ou invalidantes.

1-4-2- La leishmaniose cutanée chronique (LCC)

Les lésions de *L.killicki* sont souvent uniques, sèches et chroniques (Harrat et *al.*, 2005) (Fig.16).

1-4-3- La leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS)

Elle s'oppose à la leishmaniose cutanée zoonotique en tout point de vue. Sur le plan clinique, elle se présente sous forme d'une petite lésion unique, siégeant au niveau de la face, très inflammatoire, sans ulcération et sans croûte épaisse (Fig.17). Sa durée d'incubation est longue tout comme sa durée d'évolution (Bachi, 2006).

La leishmaniose cutanée du Nord à *Leishmania infantum* nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'un an.



Figure 15: Différents types de lésions cutanées de (LCZ) (Aïache, 2012)



Figure 16: Lésion cutanée de (LCC) (Harrat, 2005)



Figure 17: Lésion cutanée de (LCS) (Harrat, 2005)

1-5- Diagnostic

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite ou de son ADN, à partir du matériel récolté. (Dedet, 2009).

1-5-1- Examen Direct

Il permet la recherche des amastigotes intracellulaires (corps de Leishman-Donovan) dans les macrophages sur frottis. Les formes amastigotes sont, soit contenues dans les cellules histiocytaïres, soit extracellulaires. Pour les lésions cutanées, le prélèvement se fait par raclage au vaccinostyle à la périphérie de la lésion (Mihoubi *et al.*, 2006).

Les frottis fixés au méthanol, sont colorés au May Grünwald Giemsa ou le Giemsa. La recherche est effectuée au microscope optique à fort grossissement Gx 100, avec l'huile d'immersion.

1-5-2- Culture

Elle permet la croissance des formes promastigotes, dans des milieux d'isolement appropriés. Le milieu le plus utilisé est le milieu Novy-Mac Neal- Nicolle (N.N.N.). C'est un milieu diphasique composé d'une phase solide faite de gélose salée avec 10% de sang de lapin défibriné et une phase liquide constituée de l'exsudat produit à partir de la gélose au sang ; c'est dans cette phase liquide que se développent les promastigotes.

D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI 1640 supplémenté de sérum de vœu fœtal. L'incubation se fait entre 24°C et 27°C.

1-5-3- Identification du parasite

L'électrophorèse des iso enzymes constitue la méthode la plus courante pour l'identification de souches de leishmanies (Dedet, 2009).

La caractérisation isoenzymatique de *L. major* a montré la présence du zymodème MON-25 principal au Maroc, en Algérie et en Tunisie (Rioux *et al.*, 1986a, , Harrat *et al.*, 1996, Pratlong *et al.*, 2009 ; Rhajoui, 2011 ; Haouas *et al.*, 2012, Chaara *et al.*, 2014). Malheureusement, en Libye, aucune analyse isoenzymatique n'a été effectuée (Amro *et al.*, 2012).

1-6-Traitement

Le traitement des leishmanioses est dominé, depuis le début du siècle, par les dérivés antimoniés pentavalents qui demeurent encore de nos jours les médicaments de première

intention dans plusieurs pays endémiques. La toxicité et le coût élevé des médicaments antileishmaniens usuels ainsi que l'émergence grandissante des souches parasitaires résistantes font que la recherche de nouvelles molécules antileishmaniennes efficaces et peu toxiques s'impose.

Une recherche bibliographique nous a permis d'établir une liste d'espèces végétales ayant une activité antileishmanienne vis-à-vis de *Leishmania major* présentée dans le tableau I.

Tableau I : Quelques plantes ayant une activité antileishmanienne vis-à-vis de *L. major*

Familles	Espèces	Noms communs	Références
<i>Amaryllidaceae</i> / <i>Liliaceae</i>	<i>Allium sativum</i>	Ail	El Rhaffari et al., (2002) Wabwoba et al., (2010) et Khademvatan et al., (2011).
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Pistacia atlantica</i>	Pistachier de l'atlas	Maamri, 2008
<i>Apiaceae</i>	<i>Ferula communis</i>	Ferule commune	Essid et al., (2015)
<i>Apocynaceae</i>	<i>Nerium oleander L.</i>	Laurier-rose	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Asclepiadaceae</i>	<i>Periploca graeca L.</i>	Périploque grecque	Demirci et al., (1998)
<i>Asteraceae</i>	<i>Artemisia herba-alba Asso</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Artemisia dracunculus</i> <i>Anthemis stiparum Pomel</i> <i>Inula viscosa</i>	Armoise blanche L'Absinthe Estragon Camomille Inule visqueuse	Hatimi et al., (2000) Azizi et al., (2014) Rezaei et al., (2017) El Rhaffari et al., (2002) El Rhaffari et al., (2002)
<i>Brassicaceae</i>	<i>Lepidium sativum L.</i>	Cresson alénois	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Capparacea</i>	<i>Caparis spinosa</i>	Câprier commun	Shemshadi et al., (2015)
<i>Cupressaceae</i>	<i>Juniperus oxycedrus L.</i>	Cade ou Genévrier cade	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus rotundifolia Lamk</i> variante de <i>Q. ilex</i>	Chêne vert	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Gernaniaceae</i>	<i>Pelargonium odoratissimum L.</i> <i>Pelargonium graveolens</i>	Géranium puant Géranium rosat	El Rhaffari et al., (2002) Essid et al., (2015)

<i>Lamiaceae</i>	<i>Salvia clandestina</i> Batt <i>Stachys guyoniana</i> Noé <i>Teucrium polium</i>	Sauge clandestine Epiaire laineux Germandrée tomenteuse	El Rhaffari et al., (2002) Ramli, 2013 Essid et al., (2015)
<i>Lauraceae</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	Cannelier de Ceylan	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Lythraceae</i>	<i>Lawsonia inermis</i> L.	Henné	El Rhaffari et al., (2002) Nosratabadji et al., (2015)
<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalyptus</i> sp <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Gommier	El Rhaffari et al., (2002) Nosratabadji et al., (2015)
<i>Oleaceae</i>	<i>Olea europea</i> L.	Olivier	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago amplexicaulis</i> Cav.	Plantain	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Nigella sativa</i> L	Nigelle cultivée	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Rosaceae</i>	<i>Malus communis</i> (D.C)	Pommier	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Rutacées</i>	<i>Citrus aurantium</i> L.	Bigaradier (Orange amère)	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Verbenaceae</i>	<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.)Maas	Gingembre tropical	El Rhaffari et al., (2002)
<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Peganum harmala</i>	Rue sauvage	Mirzaie et al., (2007) et Rahimi-Moghaddam et al.,(2011).

1-7- Méthodes d'évaluation de l'activité antiparasitaire

Afin d'évaluer les effets des molécules à activité anti-*Leishmania*, plusieurs méthodes sont utilisées.

1-7-1- Comptage direct

Le comptage direct des parasites est la méthode la plus utilisée, vu sa simplicité, par contre, la présence de rosettes même après la resuspension et la mobilité des parasites peuvent biaiser les résultats. Cependant, cette technique n'est pas adaptée au screening à grande échelle des molécules à effet anti-*Leishmania* (Ginouves et al., 2014).

1-7-2- Méthodes alternatives

D'autres méthodes consistent à l'introduction d'un marqueur radioactif tel que [5-3H] uracile ou [3H] thymidine sont des techniques simples et rapides et permettent une analyse à large échelle. En effet, l'incorporation de ces isotopes au cours de la synthèse de l'ADN permet de suivre la prolifération cellulaire qui s'exprime par une linéarité entre l'émission radioactive et la multiplication cellulaire. Par contre, la manipulation des composants radioactifs, leur production et la gestion des déchets demeurent un vrai problème. Il a été également décrit que suite à l'introduction de ces marqueurs durant la division cellulaire, des dommages au niveau de l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, peuvent survenir et fausser ainsi les résultats (Ginouves et *al.*, 2014).

1-7-3- Méthodes colorimétrique à base de sels de tétrazolium

Les tests de tétrazolium sur microculture sont des tests colorimétriques basés sur la présence de sel de tétrazolium dont les principaux sont (Fig.18) (Ginouves et *al.*, 2014).

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tétrazolium.

XTT: 2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide.

WST-1: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tétrazolium

MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide .

WST-8: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tétrazolium.

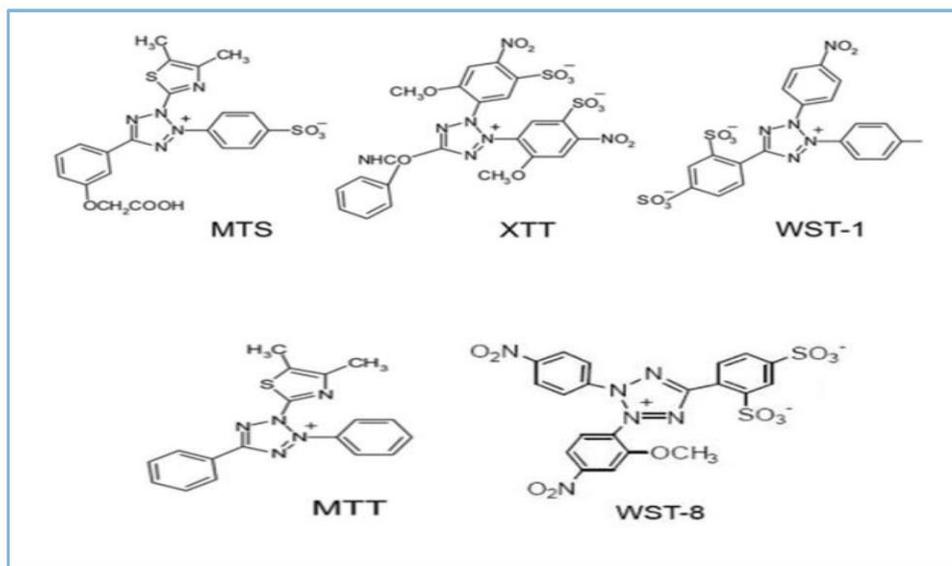


Figure 18: Structure des différents sels de tétrazolium (Ginouves, 2014)

Leur utilisation en histologie, biologie cellulaire, biochimie et la biotechnologie émane de leurs propriétés biologiques et chimiques qui résident dans la présence d'un noyau tétrazole chargé positivement contenant 4 atomes de nitrogène. Ce noyau est susceptible d'être réduit en présence de la succinate déshydrogénase mitochondrial des cellules vivantes générant ainsi un produit de couleur violette appelé formazan (Fig.19). Ce dernier peut être quantifié par spectrométrie à une longueur d'onde de 570 nm (Mosmann, 1983).

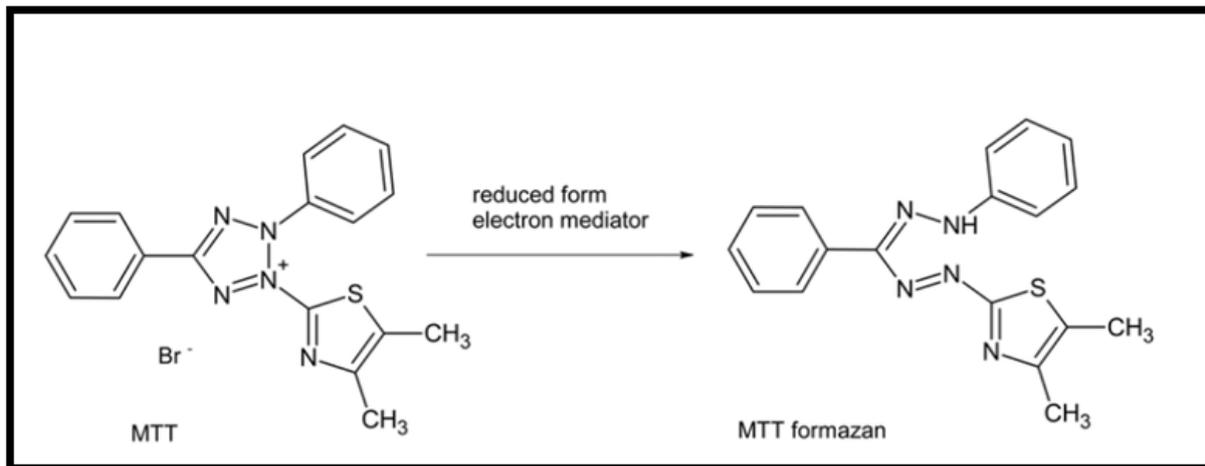


Figure 19 : Mécanisme de réduction du MTT en formazan (Stoklosowa, 2004)

Parmi les tests les plus utilisés dans la quantification des parasites vivants est le test MTT est la technique de choix vu sa rapidité, son efficacité et sa simplicité (Ginouves et *al.*, 2014). Cependant, comme toute technique, le test MTT est limité par quelques paramètres. Plusieurs composants réducteurs peuvent interférer avec la réduction du MTT en formazan. Des produits chimiques tels que l'acide ascorbique ou les composants possédant un groupement sulfhydryle qui ont la capacité de réduire les sels de tétrazolium d'une manière non enzymatique par conséquent, une augmentation de la densité optique (Bruggisser et *al.*, 2002 ; Han et *al.*, 2010). Une étude effectuée par (Bruggisser et *al.*, 2002) a montré que quelques extraits de plantes à partir de *Hypericum perforatum* et *Cimicifuga racemosa* étaient capables de réduire le MTT en absence de cellules. Les travaux réalisés par (Han et *al.*, 2010) ont montré l'interaction directe entre les composants phénoliques et la réduction du MTT même en absence de cellules, ce qui confirme que ces composants interfèrent avec ce test en augmentant les valeurs de DO, ce qui constitue un problème lors du criblage de nouvelles molécules à base de plantes.

II - Les métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires se définissent comme des molécules produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...) ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance et la reproduction par opposition aux métabolites primaires. Ils interviennent en particulier dans l'évolution, la survie des espèces, ainsi que dans les interactions entre individus de la même espèce ou d'espèces différentes, par leur implication dans les phénomènes de défense, de symbiose ou de pollinisation.

Ces métabolites peuvent être classés en plusieurs grandes familles dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, les composés terpéniques et les composés phénoliques (Bruneton, 1993).

- les terpènes et dérivés (les substances volatiles des plantes, les glycosides, les caroténoïdes, les stérols, les saponines...).
- les composés phénoliques (les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins, la lignine, ...)
- les composés contenant de l'azote (les alcaloïdes, les glucosinolates, ...)

2- 1- Les composés terpéniques

2-1-1- Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique (monocyclique, bicyclique ou tricyclique) ou acyclique. Ils apparaissent chez de nombreux types de plantes et ont une activité biologique importante. Les terpènes (mono. et sesquiterpènes) représentent l'un des groupes les plus importants des huiles essentielles.

2-1-1-1- Données sur les huiles essentielles

2-1-1-1-1- Définition

Selon la pharmacopée Européenne 7ème édition (2010) une huile essentielle (HE) est un « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

2-1-1-1-2- Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Telphon, 2005).

Les huiles essentielles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés allopathiques (Guignard, 2000 ; Telphon, 2005). Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing gum, chocolats, bonbons...) pour aromatiser la nourriture. Elles sont également, utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'huiles essentielles en médecine douce et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années (Bakkali et *al.*, 2008).

2-1-1-1-3- Caractères physico-chimiques

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaient à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau (AFSSAPS, 2008).

2-1-1-1-4- Composition Chimique des Huiles Essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré (Bruneton, 1999), elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, direction du vent, heures de soleil, etc.) et selon la phase de développement de la plante (Jerkovic et *al.*, 2003).

Dans les plantes, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines (Bruneton, 1987).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Kurvin, 2003).

2-1-1-1-4-1- Les mono terpènes

Les mono terpènes C₁₀ sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bi cycliques. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Bruneton, 1999 ; Guignard, 2000).

2-1-1-1-4-2- Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C₁₅ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bi cycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature (Guignard, 2000 ; El Haib, 2011).

2-1-1-1-4-3- Les composés aromatiques

Ce sont des composés volatils dérivés du phénylpropane (Kurvin, 2003). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon etc(Bruneton, 1999).

2-1-2- Les hétérosides

2-1-2-1- Les saponines

Ce sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes. Les saponosides sont des substances dont la particularité est de mousser avec l'eau. Ces substances, légèrement caustiques et irritantes, probablement toxiques, rendent les plantes qui en contiennent tout à fait immangeables.

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins où ils auraient un rôle de défense contre des agents pathogènes extérieurs comme les champignons, bactéries et autres insectes.

2-2- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des dérivés non azotés. Ils sont l'un des plus importants groupes rencontrés chez les végétaux. Ces composés forment le principe actif de nombreuses plantes médicinales. Ils sont abondants chez les plantes vasculaires et localisés dans les racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit.

Ils possèdent un large éventail d'activités biologiques. Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été publiés sur leurs propriétés thérapeutiques telles que les effets anti-inflammatoires (Santangelo *et al.*, 2007) , anti-microbiens (Li *et al.*, 2009) et anti-parasitaires (Calixto Junior *et al.*, 2016).

Des essais *in vitro* sur l'activité anti-leishmanienne des composés phénoliques se sont révélés très efficaces (Mahmoudvand *et al.*, 2014 ; Calixto Junior *et al.*, 2016).

Les principales classes des composants phénoliques sont : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, les coumarines et les acides phénoliques (Tapiero *et al.*, 2002). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot et Charpentier., 2006).

2-2-1- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus* : jaune) sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton, 1999).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoire, anti-allergique, antihépatotoxiques et antiulcéreuses (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes sont présents dans presque tous les organes de la plante et jouent un rôle important dans le système de défense comme anti-oxydants (Ghedira, 2005).

2-2-2- Les tanins

Les tanins sont des polyphénols principalement localisés dans les tissus des végétaux (écorce, bois, feuilles, racines) et dans les parties tégumentaires des fruits. Ils jouent un rôle important sur le plan pharmacologique (antibactérien, antifongique, anti inflammatoire, antioxydants).

On distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanin en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (Khababae et Van Ree, 2001) :

✓ Les tanins hydrolysables issus de la combinaison d'un sucre estérifié par un nombre variable de molécules d'acides phénoliques (acide gallique, acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés). Ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique ; ils s'hydrolysent aussi sous l'action enzymatique, solubles dans l'intestin (Khababae et Van Ree, 2001). Ils sont potentiellement responsables d'intoxications sévères lors d'ingestion en quantité massives.

✓ Les tanins condensés non hydrolysables beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables. Ils résultent de la polymérisation oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3-ol et/ou de flavan-3,4-diol (Bruneton, 1999 ; Khababae et Van Ree, 2001).

2-2-3- Les coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. Ils manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrane, telles que : l'activité antifongique, anti-tumorale, inhibitrice de plusieurs enzymes, antivirale, anti-inflammatoire, anticoagulante, diurétique et analgésique (Fylaktakidou et *al.*, 2004).

2-2-4- Les quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques. Ils sont présents aussi chez les champignons. Ces molécules se trouvent, également dans le règne animal, en particulier chez les arthropodes et les échinodermes.

Ils sont omniprésents dans la nature et sont hautement réactifs (Cowan, 1999). Ces composés, étant colorés, sont responsables de la réaction de brunissement des fruits (coupés ou blessés) et des légumes.

2-2-5- Les anthocyanes

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993). Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Bahorun, 1997).

2-2-6- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, ils sont présents dans un certain nombre de plantes (Psotová et *al.*, 2003). Ils sont considérés comme des substances phytochimiques et de chélation ayant des effets prébiotiques, antioxydants et anti inflammatoire. Leur toxicité est faible et sont considérés comme étant des composés non toxiques (Psotová et *al.*, 2003). On distingue les acides

hydroxybenzoïque : l'acide vanillique, l'acide gallique etc... et les acides hydroxycinnamique : l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide sinapique etc... (Thériault, 2004).

2-3- Les composés azotés : les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés en médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine), anesthésiques (atropine), ou comme agents anticancéreux (taxol, vinblastine). Ils peuvent également agir comme des neurotransmetteurs dans le système nerveux central (SNC) ou périphérique (SNP) comme la sérotonine et la dopamine (Muniz, 2006).

Cependant, le rôle des alcaloïdes dans les plantes est souvent inconnu et leur importance dans le métabolisme de la plante n'est pas très bien définie. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes (Muniz, 2006).

III - Procédés d'extraction des métabolites secondaires

Selon l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS, 2008) le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état originel, ses caractéristiques et sa nature proprement dite.

3-1- Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (El Haib, 2011).

3-2- Entraînement à la vapeur d'eau

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle (El Haib, 2011).

3-3- Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Cette technique relativement récente. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau (El Haib, 2011).

3-4-Extraction par du CO₂ supercritique

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se

convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

L'avantage de cette méthode est que les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables (El Haib, 2011).

3-5- Extraction assistée par micro-onde

Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement.

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement d'extrait (El Haib, 2011).

3-6- Expression à froid

Le procédé d'extraction par expression à froid est assurément le plus simple mais aussi le plus limité. Il est réservé à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridées ou d'agrumes qui ont une très grande importance pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle (El Haib, 2011).

3-7- Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (El Haib, 2011).

Matériel et méthodes

Chapitre II- Matériel et Méthodes

Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- L'USTHB : Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene Bab-Ezzouar Alger –Algérie.
 - ✓ Laboratoire de Génie des Procédés et de Génie Mécanique pour l'extraction des métabolites secondaires.
 - ✓ Laboratoire de Physique des Matériaux pour les propriétés physico-chimique des huiles essentielles.
 - ✓ Laboratoire de Chimie pour la CG/MS.
- Université de Djilali Bounaama, Khemis Miliana Ain defla Algérie.
 - ✓ Laboratoire de Chimie pour les tests phytochimiques.
- IPT : Institut Pasteur de Tunis- Tunisie.
 - ✓ Département de Parasitologie Médicale, Biotechnologie et Biomolécules pour l'activité antileishmanienne et cytotoxique.

2-1- Matériel végétal

Nous avons utilisé pour nos tests, des plantes spontanées au nombre de neuf (09). Elles ont été retenues en raison de leurs informations ethnobotaniques d'une part et de leurs milieux peuplés par les deux (02) réservoirs de la leishmaniose cutanée d'autre part.

Leur identification a été réalisée à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) El-Harrach-Alger. Toutes ces plantes récoltées à la floraison, fraîchement récoltées sont exemptes d'impuretés. Elles ne présentent pas de signe de pourriture ou d'endommagement, ont été séchées pendant 20 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière avant utilisation (Extraction).

2-1-1- Extraction des métabolites secondaires

Pour nos travaux deux types d'extractions ont été réalisés à savoir : l'hydro distillation et la macération par un solvant : l'éthanol.

Le choix de la méthode d'extraction est basé sur des données bibliographiques et les composés phytochimiques des métabolites à extraire.

2-1-1-1- Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation dans un appareil de type (Clevenger). Elle a concerné (05) plantes répertoriées dans le (Tableau II).

Tableau II: Les différentes plantes étudiées par hydrodistillation

Noms scientifiques/ (Famille)	Régions de récolte/ wilaya	Coordonnées géographiques	Dates de récolte	Parties de plante utilisées
<i>Artemisia campestris</i> (<i>Asteraceae</i>)	Ben Srou /M'Sila	N : 35° 02' 25'' E : 04° 33' 50''	Mars 2015	Feuilles et Tiges.
<i>Anethum graveolens</i> (<i>Apiaceae</i>)	Tablat/ Médeéa	N : 36° 24' 46'' E : 03° 18' 36''	Juin 2015	Feuilles et Tiges
<i>Ruta montana</i> (<i>Rutaceae</i>)	Tablat/ Médéa	N : 36° 24' 46'' E : 03° 18' 36''	Nov. 2015	Feuilles et Tiges
<i>Thymus pallescens</i> (<i>Lamiaceae</i>)	Sour el Ghozlane/ Bouira	N : 36° 08' 50'' E : 03° 41' 26''	Juin 2015	Feuilles et Tiges
<i>Thymus vulgaris</i> (<i>Lamiaceae</i>)	Sour el Ghozlane/ Bouira	N : 36° 08' 50'' E : 03° 41' 26''	Juin 2015	Feuilles et Tiges

a/ Procédé d'extraction (Hydro distillation)

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation selon (la Pharmacopée Européenne, 2010).

100gr de matière végétale sèche immergée dans un ballon en verre rempli d'eau (1L) est portée à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs d'eau formées au sein de l'eau bouillante entraînent l'huile essentielle qui est recueillie après condensation et décantation. Cette huile à été séchée au sulfate de sodium anhydre puis conservée au frais à +4°C dans un flacon ombré et hermétiquement fermé jusqu'à l'analyse.

b/ Méthodes d'analyse et contrôle de la qualité des huiles essentielles

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- Vérifier ses propriétés organoleptiques (aspect, couleur et odeur)
- Déterminer ses propriétés physico-chimiques (densité et indice de réfraction)

Ces caractérisations ont été réalisées selon les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000).

➤ **Analyses des caractéristiques physico-chimiques**

• Détermination de la densité (Norme NF T75-111)

La mesure de la densité a été réalisée à l'aide d'un pycnomètre et d'une balance de précision.

La densité d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un volume de l'huile à 20 °C à celle du même volume d'eau distillée à 20°C.

Procédé :

A l'aide d'un pycnomètre, peser successivement un même volume d'eau distillée et d'huile essentielle (HE). Peser le pycnomètre vide. Entre chaque pesée, le pycnomètre doit être soigneusement nettoyé avec de l'eau et de l'acétone et séché. Mesurer la température de l'huile essentielle.

La Densité relative est donnée par la formule suivante :

m₀ : est la masse en gramme du pycnomètre vide.

m₁ : est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau.

m₂ : est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

$$D = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

• Détermination de l'indice de réfraction (Norme NF T75- 112)

L'indice de réfraction a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre appareil permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700, à température de 20 °C et une valeur de 1.333 pour l'eau distillée.

Procédé :

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

Quelques gouttes d'huile essentielle sont déposées dans l'appareil et la lecture de l'indice se fait comme suit :

- On règle le réfractomètre d'une manière à obtenir une moitié supérieure claire et une autre moitié inférieure sombre et ce au niveau du cadran.

- L'appareil utilisé est de type paralux optique de précision 68600 (lustiner France).

L'indice de réfraction n_d^t à la température de référence t , est donné par la formule :

$$N_d^t = n + 0,0004 (t' - t)$$

n : est la valeur de la lecture, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination.

➤ Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) (système informatisé Hewlett-Packard, comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A), équipé d'une colonne capillaire en silice fondue HP5MSTM (30 m × 0,25 mm de diamètre interne ; épaisseur de film de 0,25 µm) (Figueredo, 2012).

Les spectres CG-MS ont été obtenus dans les conditions suivantes : gaz porteur, hélium ; débit, 0,5 ml/min ; mode, fractionné (50:1) ; volume d'injection, 1 µL ; température d'injection, 250°C ; programme de température du four, 60°C pendant 8 min, puis augmentation à 2°C/min jusqu'à 250°C et maintien à 250°C pendant 15 min ; mode d'ionisation, impact électronique à 70 eV.

Les pourcentages des composants ont été calculés électroniquement à partir des surfaces des pics CG-FID. L'indice de rétention (IR) de tous les composants a été déterminé par la méthode de Kovats par co-injection des échantillons avec une solution contenant la série homologue de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM (Figueredo, 2012).

L'identification des composants a été réalisée par interprétation visuelle, en comparant leurs indices de rétention et leurs spectres de masse avec les données publiées dans la littérature (Adams, 2007) et en faisant correspondre leurs spectres de masse enregistrés avec les spectres de référence de la bibliothèque informatique (National Institute of Standards and Technology

[NIST] et de Wiley). La quantification a consisté à calculer le pourcentage de chaque composé à la quantité totale présente.

Ces IR sont définis par la relation :

$$IR = 100n + 100x \frac{Tr [A] - Tr [Cn]}{Tr [C (n+1)] - Tr [Cn]}$$

n : est le nombre de carbones de la paraffine précédant immédiatement le composé étudié

Tr [A] : est le temps de rétention du composé étudié

Tr [Cn] : est le temps de rétention de la paraffine précédant immédiatement le composé étudié

Tr [C (n+1)] : est le temps de rétention de la paraffine à n+1 atomes de carbone suivant
Immédiatement le composé.

La figure 20 résume le procédé d'identification et de quantification des composés d'une huile essentielle.

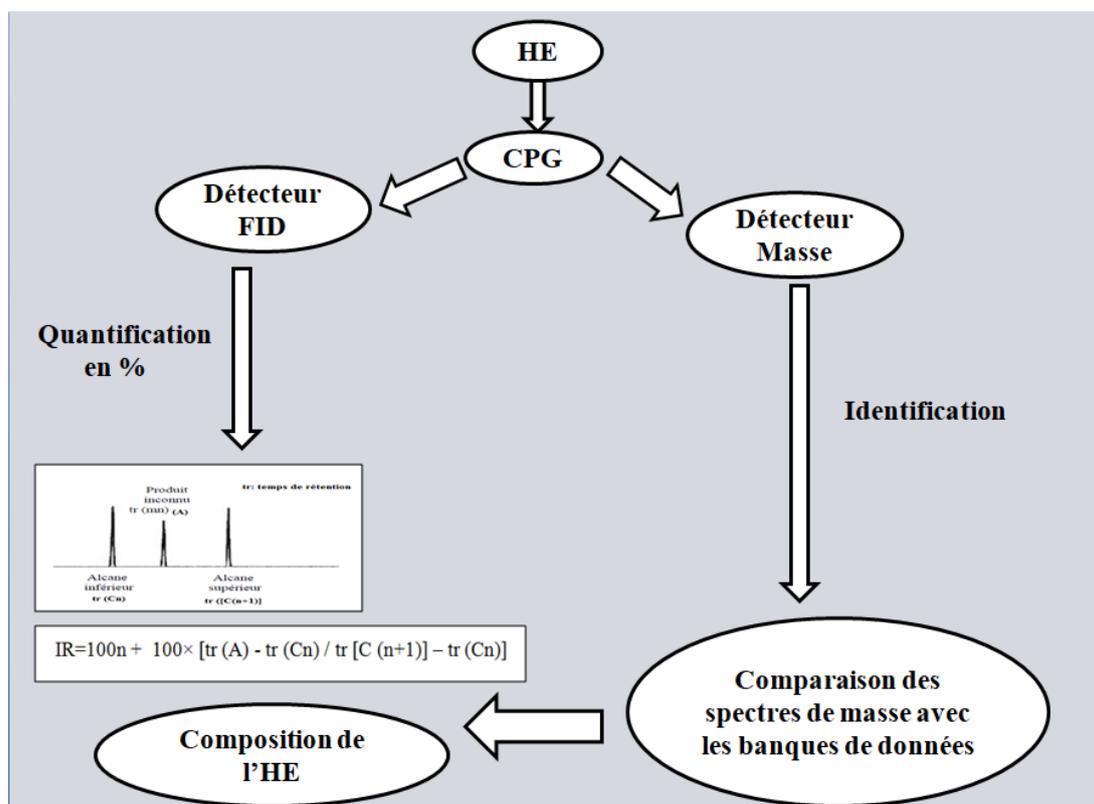


Figure 20 : Procédé d'analyse de la composition chimique d'une huile essentielle (Figueredo, 2012)

2-1-2-1-Extraction par un solvant : Ethanol

L'extraction a été effectuée dans un appareil de type (Rotavapor) pour les plantes répertoriées dans le tableau III.

a/ Procédé d'extraction (solvant)

Pour extraire les métabolites secondaires des différentes parties d'espèces végétales par macération, nous avons opté pour le protocole décrit par (Bouharb et *al.*, 2014).

Cent (100) gr de poudre végétale est macérée 24h dans 500ml d'éthanol à l'ombre à l'aide d'un agitateur magnétique. Après filtration, le solvant est évaporé à sec et sous vide au Rotavapor à 60°C. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à la réalisation des tests.

Tableau III: les différentes plantes étudiées par macération (Ethanol)

Espèces végétales / (Famille)	Région de récolte/ Wilaya	Coordonnées géographiques	Date de récolte	Parties de plantes utilisées	Photos
<i>Inula viscosa</i> (<i>Asteraceae</i>)	Chebacheb/ Boumerdes	N : 36° 42' 21'' E : 03° 18' 14''	Juin 2015	Feuilles et Tiges	
<i>Calotropis procera</i> (<i>Asclepiadaceae</i>)	Touat /Adrar	N : 29° 10' 60'' W : 0° 16' 0''	Juil. 2016	les Feuilles	
<i>Colocynthis vulgaris</i> (<i>Cucurbitaceae</i>)	Medjedl/M'Sila	N : 35° 3' 1.48'' E : 3°38' 31.37''	Déc. 2015	les fruits	
<i>Peganum harmala</i> (<i>Zygophyllaceae</i>)	Ain Skhouna/ Saida.	N : 34° 30' 20'' E : 00° 50' 59''	Juil. 2015	jeunes plantules (Feuilles et Tiges).	

b/ Tests phytochimiques.

Les tests phytochimiques sont des analyses qualitatives basées sur des réactions de colorations et/ ou de précipitations par des réactifs spécifiques. Ils sont effectués afin de mettre en évidence les métabolites secondaires des espèces végétales. Ainsi, un screening phytochimique a été réalisé aux plantes investiguées citées dans le tableau ci dessus (Tableau III) en se référant aux notations proposées par Dohou *et al.* (2003) et Daira *et al.* (2016).

Nulle (-) ; Faible (+) ; Moyennement riche (+ +) et Riche (+ + +).

Ces tests sont effectués sur :

- La poudre (broyat) : la plante est finement moulue.
- L'infusé : 50 ml d'eau distillée sont portés à ébullition, dans cette eau bouillante 05g de poudre (broyat) sont mises à infuser pendant 15 mn, puis filtrer le mélange. A la fin le filtrat a été ajusté à 50 ml d'eau distillée.

- **les alcaloïdes**

2 g de poudre végétale sont humectés avec 10 ml d'ammoniaque $\frac{1}{2}$ et mis en macération dans 50 ml d'éther / chloroforme (3/1) ; Après 24 h de macération ce mélange est filtré puis épuisé par 2.5 ml d' (Hcl) 2N.

Des réactions de précipitations apparaissent sur la solution chlorhydrique, la présence des alcaloïdes est révélée par le réactif de Dragendroff qui indique un précipité rouge.

- Réactif de Dragendroff :

Solution A : 0 ,85g de nitrate de bismuth+40ml d'eau distillée + 100ml acide acétique.

Solution B : 8g d'iodure de potassium + 20ml l'eau distillée.

Prendre 15ml du mélange (A+B) et rajouter 20ml d'acide acétique puis compléter a 100ml de l'eau distillée.

- **les anthocyanes**

5 ml d'infusé, rajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique (Hcl). Une coloration rouge se développe en présence des anthocyanes.

- **les coumarines**

Faire bouillir à reflux 2 g de poudre végétale dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min, puis filtrer après refroidissement.

A 5 ml de ce filtrat, nous avons ajouté 10 gouttes de la solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10% et quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 10 % (pour obtenir un milieu faiblement acide). La formation d'un trouble indique la présence de coumarines.

- **les flavonoïdes**

A 5 ml d'infusé, nous avons additionné 5 ml d'acide chlorhydrique (HCl), un copeau de magnésium (Mg) et 1 ml d'alcool iso amylique. La mise en évidence des flavonoïdes est révélée par une coloration rouge orangé.

- **les glucosides**

Quelques gouttes d'acide sulfurique (H₂SO₄) sont ajoutées à 2 g de poudre végétale. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette montre la présence des glucosides.

- **les quinones**

- Quinones libres : 2 g de poudre humectés avec 2 ml d'(HCl) 1N pendant 3 heures dans 20 ml de chloroforme, puis filtré. Ce filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque ½. L'apparition d'une coloration orangée nous indique la présence de quinones libres.
- Quinones combinés : 2 g de poudre végétale additionnée à 5 ml d'acide sulfurique 2N sont portés à reflux pendant 2 h. la solution extractive est filtrée puis épuisée par 20 ml de chloroforme. Ce mélange chloroformique est évaporé à sec puis épuisé par l'ammoniaque ½. La réaction donne une coloration rouge en présence de quinones combinées.

- **les saponosides**

A 2 ml d'infusé, rajouté quelques gouttes d'acétate de plomb. La formation d'un précipité blanc indique la présence des saponines.

- **les tanins totaux**

La présence des tanins est mise en évidence par l'addition au 5ml d'infusé quelques gouttes d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃) à 5%. En présence des tanins une coloration bleu noire se développe.

2-2- Matériel biologique

- Promastigotes de *Leishmania major* : PGLC 94 pour l'activité antileishmanienne.
- Lignée macrophagique murine : Raw 264,7 pour le test de cytotoxicité.

2-3- Milieux de culture et Réactifs

- **Milieu NNN** : La culture sur milieu NNN biphasique (Nicolle Mac Neal Novy 1904), a pour but d'entretenir les souches étudiées. Elle assure la multiplication du parasite sous sa forme extracellulaire (forme promastigote).
- **Milieu RPMI** : Pour augmenter la densité de l'inoculum, les promastigotes sont repiqués sur Milieu RPMI+ PS GLU (Roswell Park Memorial Institut), additionné de sérum veau contrôle (SVF) 20%

PS GLU (Penicilline- Streptomycine – Glutamine)

- **MTT** : Réactif commercialisé, il a été dissout dans du PBS afin d'obtenir une solution stock 10 mg/ml puis filtré avec un filtre stérile 0.2 μ M à l'abri de la lumière et conservé à +4°C.
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde est un solvant organique sert à solubiliser les composés organiques.
- **PBS** : Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin) solution tampon contenant du chlorure de sodium.
- **Amphotéricine B** : est un polyène anti-fongique isolé à partir de *Streptomyces nodonus*, capable de modifier la perméabilité de la membrane parasitaire en agissant sur l'ergostérol (Estevez, 2009).
- **Azide de sodium** : la viabilité parasitaire (promastigotes)
- **Bleu trypan** : la viabilité cellulaire (macrophages)

2-4- Activité biologique

2-4-1- Action des huiles essentielles sur les promastigotes de *Leishmania major* (Activité antileishmanienne)

La viabilité de *Leishmania major* a été évaluée à l'aide du test colorimétrique au bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényl-tétrazolium (MTT) basé sur la réduction du sel de tétrazolium en cristaux de formazan par les déshydrogénases mitochondriales (Meerlo, et *al.*, 2011).

Les promastigotes de *Leishmania major* ont été cultivés dans les conditions suivantes (26°C et 5% de CO₂) en milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA), supplémenté avec 100 U/ ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine et 2 mM de L- glutamine (Sigma-Aldrich, USA) et enrichis avec 10% de sérum de veau fœtal (FCS) (Gibco).

Les promastigotes ont été répartis à raison de 50µl dans des plaques de 96 puits à une concentration cellulaire de 2.10⁶ par puits et incubés à 26°C pendant 72h en présence d'HE solubilisées dans du RPMI + DMSO (Sigma- Aldrich, USA) 0,05 % (Aloui, et *al.*, 2016) à des concentrations de ½ allant de (100µg/ml à 0,78µg/ml) (Fig. 21) .

L'amphotéricine B (Sigma- Aldrich, USA) a été utilisée comme témoin positif à des concentrations allant de (07,8 µg/ml à 0,06 µg/ml) et les parasites non traités (RPMI + DMSO 0,05%) ont été considérés comme témoin négatif (Fig.21).

Après 72 heures d'incubation à 26 °C des plaques de culture cellulaire, 10 µl de MTT (Sigma Aldrich, USA) à une concentration finale de 0,5 mg/ml ont été ajoutés par puits et l'incubation a été poursuivie dans l'obscurité pendant 4 heures supplémentaires. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 µl d'une solution d'isopropanol acidifiée (Meerlo, et *al.*, 2011).

La lecture a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Synergy HT, Bio-Tek) où les densités optiques (DO) sont lues à 540 nm, ce qui permet de calculer le pourcentage (%) d'inhibition avec l'aquation suivante :

(SVF). La viabilité des cellules a été évaluée après incubation avec 0,1% de bleu de trypan en comptant les cellules non colorées au microscope optique.

Les macrophages ont été répartis dans des plaques de 96 puits à une densité cellulaire de 2.10^4 cellules /puits, on les a laissé adhérer pendant une nuit à 37°C et 5% de CO₂ ; après avoir remplacé le milieu par un frais contenant 100 µl de dilution en série d'HE de (100µg/ml à 0.78µg/ml).

L'amphotéricine B a été utilisée comme contrôle positif et les cellules non traitées ont été considérées comme contrôle négatif. Les cellules ont été incubées pendant 72h à 37°C et leur viabilité a été estimée par le test MTT dont l'expression des résultats a été décrite précédemment (Meerlo, et *al.*, 2011), ainsi la concentration cytotoxique de 50% (CC50) a été déterminée.

➤ **Indice de sélectivité des huiles essentielles**

L'indice de sélectivité (IS) est un paramètre définissant l'équilibre entre la cytotoxicité et l'activité biologique de l'huile correspondant à la concentration active la plus élevée sans toxicité et exprimé par le rapport CC50 macrophages / CI50 parasites (Weninger, et *al.*, 2001).

Pour une valeur IS supérieure à 10, l'huile est considérée comme efficace contre les parasites et sans danger pour les macrophages (Acerby, et *al.*, 2008 et Monzote, et *al.*, 2014).

2-4-3- Action des extraits totaux sur les promastigotes de *Leishmania major*

L'activité antileishmanienne sur la forme promastigote de *Leishmania major* a été évaluée par la méthode colorimétrique MTT dont l'expression des résultats a été décrite précédemment. Les extraits totaux ont été solubilisés dans du RPMI + DMSO 0,05 % à des concentrations de ½ allant de (1000 µg/ml à 7.81µg/ml).

L'amphotéricine B a été utilisée comme témoin positif à des concentrations allant de (07,8 µg/ml à 0,06 µg/ml) et les parasites non traités (RPMI + DMSO 0,05%) ont été considérés comme témoin négatif.

2-4-4- Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm Erreur standard de la moyenne (SEM).

Les valeurs des concentrations d'inhibition à 50% (CI50) parasitaires et des concentrations cytotoxiques à 50 % (CC50) pour chaque HE ont été déterminées par une analyse de régression non linéaire dose-réponse en utilisant le logiciel (Graph Pad Prism 5 San Diego USA).

Le test de Tukey (Graph Pad Prism5) pour de multiples comparaisons et permet de distinguer les groupes avec un niveau de confiance de 95%. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p \leq 0,05$.

Résultats et discussion

Chapitre III - Résultats et discussion

3-1/ Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Les résultats des analyses organo-leptiques sont regroupés dans le tableau IV.

Tableau IV: Résultats des analyses organo-leptiques des plantes étudiées par hydrodistillation

Huiles essentielles	Caractéristiques organoleptiques	AFNOR 2000	Photos
<i>Artemisia campestris</i>	Aspect : Liquide mobile Couleur : jaune clair Odeur : camphrée	Liquide mobile	
<i>Anethum graveolens</i>	Aspect : Liquide mobile Couleur : jaune clair Odeur : caractéristique d'anis	Liquide mobile	
<i>Ruta montana</i>	Aspect : Liquide mobile Couleur : Jaune pâle Odeur : fétide	Liquide mobile Jaune à jaune clair Caractéristique, grasse	
<i>Thymus pallelescens</i>	Aspect : Liquide mobile Couleur : jaune foncé (orangée) Odeur : épicée	Liquide mobile	
<i>Thymus vulgaris</i>	Aspect : Liquide mobile Couleur : Brun clair Odeur : camphrée, épicée	Liquide mobile Brun au brun-rouge Aromatique, phénolique légèrement épicé	

3-2/ Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Les résultats des analyses physico- chimiques sont reportés dans le tableau V.

Tableau V : Résultats des analyses physico-chimiques des plantes étudiées par hydrodistillation

Huiles essentielles	Densité relative à 20°C	AFNOR 2000	Indice de réfraction à 20°C	AFNOR 2000
<i>Artemisia campestris</i>	0.881	-	1.391	-
<i>Anethum graveolens</i>	0.895	-	1.488	-
<i>Ruta montana</i>	0.821	0.826 à 0.834	1.456	1.429 à 1.436
<i>Thymus pallescens</i>	0.960	-	1.502	-
<i>Thymus vulgaris</i>	0.922	0.915 à 0.935	1.499	1.496 à 1.505

Il est à noter que les paramètres (organoleptiques et physico-chimiques) de certaines huiles essentielles ont été comparés aux normes AFNOR (2000). Quant aux autres (HE), elles ont été confrontées à d'autres travaux (Tableau VI).

Tableau VI : Données bibliographiques des caractéristiques organo-leptiques et physico-chimiques des huiles essentielles.

Espèces	Caractéristiques organo-leptiques Couleur/Odeur	Caractéristiques Physico-chimique Densité/Indice de réfraction	Auteurs
<i>Artemisia campestris</i>	Jaune pâle/camphre	0.891 / 1.3860	(Saihi, 2011 ; Djelfa-Algérie)
<i>Anethum graveolens</i>	Jaune clair/ caractéristique d’anis	0.802 / 1.477	(Alloun, 2013 ; Birkhadem-Algérie)
<i>Ruta montana L</i>	Jaune à brun intense	0.863 à 0.972 / 1.481 à 1.511	(Garnero, 1996 ; France)
	Jaune pâle/ désagréable et prononcée	0.804 / 1.430	(Alloun, 2013 ; Tablat-Algérie)
<i>Thymus pallescens</i>	Orangée /fond épicé	0.920 / 1.493	(Chikhoune, 2007 ; Bou Saâda-Algérie) (Douar-Latreche, 2012 ; Bouira -Algérie)
	Orangée /fond épicé	0.964 / 1.501	
<i>Thymus vulgaris</i>	Brun au brun rouge/aromatique avec fond légèrement épicé	0.915 à 0.935/ 1.496 à 1.505	(Garnero, 1996 ; France)

Les résultats indiquent que les constantes physiques et les caractéristiques organoleptiques des espèces étudiées se retrouvent dans les fourchettes de références soit par les normes (AFNOR) ou bibliographiques.

3-3/ Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des (HEs) est représentée dans les (Tableaux VII, VIII, IX, X, XI et XII) dont les composants ont été classés selon leurs indices de rétention (IR) et les molécules ayant des fragments de masse inférieure à 0.1% n'ont pas été rapportées.

3-3-1/ Composition chimique de l'HE d'*Artemisia campestris*

La composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* est représentée dans le (tableau VII). Un total de vingt (20) composés qui représentent (91.35%) de l'huile, ont été identifiés. Les composés dominants de l'huile étaient le β - Pinène avec (23.54%), suivi de α -Pinène (16.35%) puis le Limonène (11.23%). L'huile essentielle d'*Artemisia campestris* renferme principalement des monoterpènes hydrogénés avec (70,99%) (fig. 22).

Tableau VII : Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE d'*Artemisia campestris*

composants	IR ^a	IR ^b	A.c
α -Thujene	930	931	3,17
α -Pinene	939	939	16,35
β -Pinene	979	975	<u>23,54</u>
Myrcene	990	982	8,7
o-Cymene	1026	1025	3,65
Limonene	1029	1031	11,23
γ -Terpinene	1059	1050	4,35
Linalool	1096	1090	0,23
Trans- Pinocarveol	1139	1137	1,3
Terpinen-4-ol	1177	1175	2,78
α - Terpineol	1188	1183	2,04
Myrtenal	1195	1192	2,26
Thymol	1290	1286	0,17
Carvacrol	1299	1295	3,2
α -Gurjunene	1409	1402	1,29
α -Patchoulene	1456	1454	0,13
Farnesene (E)- β	1456	1461	0,79
Curcumene	1472	1476	0,28
β -Selinene	1490	1488	3,02
Spathulenol	1578	1572	2,87
Monoterpènes hydrogénés			70,99
Monoterpénol			6,35
Aldéhydes			2,26
Phénols			3,37
Sesquiterpènes			8,38
Total (%)			91,35

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams

IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM

A.c : *Artemisia campestris*

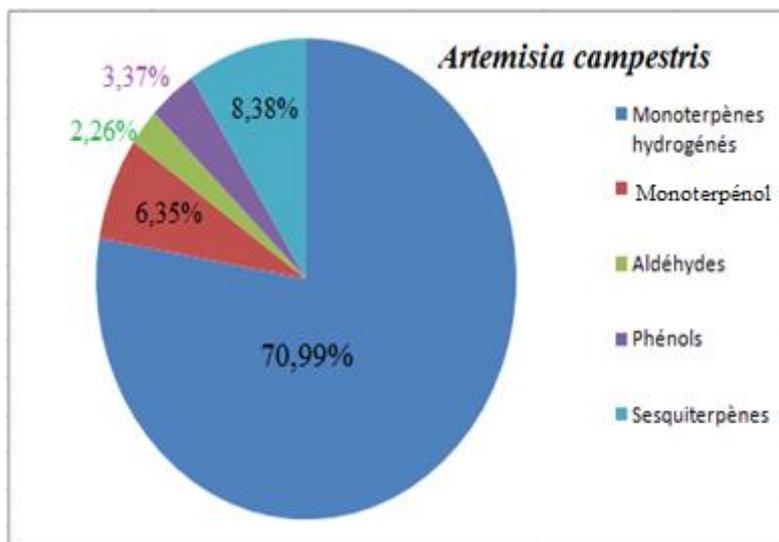


Figure 22: Répartition en % des principales familles de composés de l'HE d'*Artemisia campestris*

Plusieurs chercheurs ont analysé la composition chimique de l'armoise rouge issu des régions géographiques différentes.

Les travaux réalisés par (Touil et Benrebiha, 2014) sur l'huile d'*Artemisia campestris* était dominée par trois constituants : le β -Pinène (20,75%), le Limonène (10,46%) et γ -Tepinène (10,18%). D'autres composés étaient également présents mais à des teneurs moins importantes à savoir : Germacrène D (9,53%), Myrcène (7,90%), α -Pinène (6,02%), (E)- β -Ocimène (4,34%), (Z)- β -Ocimène (4,12%), Carvacrol (4,00%), β -Eudesmol (3,3%) et le β -Selinene (3,29%).

D'après (Belhattab et al., 2011) l'huile d'*Artemisia campestris* contient comme principaux constituants : α -Terpinène (18,8%), α -Pinène (18,4%), Camphrier (9,2%), Camphène (7,7%) et Bornéol (5,2%) .

Saihi, (2011) a révélé la présence d'un composé majoritaire le Spathulenol (58,2%) suivi de Caryophyllene (10%), β -Caryophyllene (9,5%), p-Menth-1-en-8-ol-(9,3%) et α -Copaene (8%). Quant aux travaux de (Derradj-Heffaf, 2013) a montré que la composition chimique de l'armoise rouge était dominée par les monoterpènes (62,11%) par rapport aux autres familles chimiques dont les composés majoritaires sont : α -Phellandrene (15,88%), β -Pinène (8,36%), α -Pinène (8,36%), Limonène (4,01%) et (Z)- β -Ocimène (6,49%).

Les travaux réalisés par (Kabouche, et al., 2013) que l'huile d'*Artemisia campestris* de kenchela était composée de β -Myrcene (16,47%), α -Pinene (14,18%), Trans- β -Ocimene (12,61%), β -Cymene (8,15%), Camphor (5,85%).

La même espèce récoltée dans le sud-est tunisien, analysée par (Akrouf, et *al.*, 2010) ont révélé que les monoterpènes hydrocarbonés constituaient 84% de la composition chimique avec β -Pinène (45,8%), α -Pinène (12,5%), Limonène (7,7%), ρ -Cymène (4,6%), γ - Terpinene (3,6%) et Myrcene (3,3%).

Au Maroc, les travaux réalisés par (Al-jahid et *al.*, 2017) les graines d'*Artemisia campestris* contenaient les principaux constituants : β -Pinene (12,0%), Spathulenol (10,8%), α -Pinene (7,5%), Limonene (7,0%) et Cymene (5,4%).

Ali Esmail Al-Snafi, (2015), *Artemisia campestris* d'Iraq contenait β - Myrcene (16,47%), α -Pinene (14,18%), trans- β -Ocimene (12, 61%), β -Cymene (8,15%) et Camphor (5,85%).

Quant à (Chalchat et Cabassu, 2003) ont remarqué que l'huile de l'armoise rouge de Serbie avait une quantité égale de monoterpènes (22,5%) et sesquiterpènes (20,8%) dont les principaux composants des monoterpéniques : β -Pinene (9,1%), α -Pinene (3,4%), Limonene (2,5%) et les sesquiterpenes : Spathulenol (9,2%), 4-Hydroxy-9-epi- β -Caryophyllene (3,0%).

3-3-2/ Composition chimique de l'HE d'*Anethum graveolens*

La composition chimique de l'huile d'*Anethum graveolens* est représentée dans le (tableau VIII). Un total de (18) composés qui représentent (95,91%) de l'huile, ont été identifiés. Les composés dominants de l'huile était la Myristicine avec (23,86%), suivi de α -Phellandrene avec (14,8%) et de Limonène (13,3%). L'huile essentielle d'*Anethum graveolens* renferme (64,75%) de monoterpènes hydrogénés et (25,26%) de sesquiterpènes (fig. 23).

Tableau VIII : Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE d'*Anethum graveolens*

composants	IR ^a	IR ^b	A.g
α -Pinene	939	941	8,7
Camphene	954	947	2,28
Sabinene	975	969	1,2
β -Pinene	979	974	11,2
α -Phellandrene	1002	997	14,8
ρ -Cymene	1024	1025	4,25
Limonene	1029	1032	13,3
γ -Terpinene	1059	1054	9,02
Fenchone	1086	1089	0,1
Linalool	1096	1098	3,2
Trans- Sabinol	1142	1139	0,6
Camphor	1146	1141	1,4
Thymol	1290	1290	0,2
Carvacrol	1299	1299	0,4
(E)-Caryophyllene	1419	1411	0,1
Myristicine	1518	1514	23,86
δ -Cardinene	1523	1530	0,1
Elemicine	1557	1551	1,2
Monoterpènes hydrogénés			64,75
Alcool			3,8
Cétones			1,5
Phénols			0,6
Sesquiterpènes			25,26
Total (%)			95,91

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams

IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM

A.g : *Anethum graveolens*

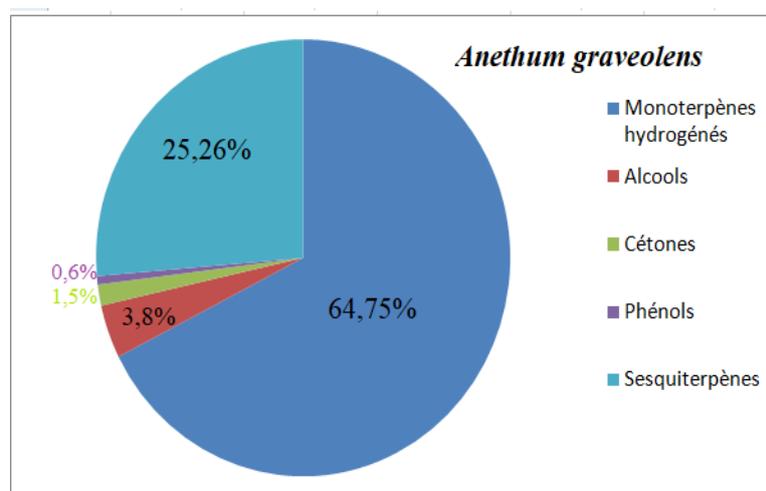


Figure 23: Répartition en % des principales familles de composés de l'HE d'*Anethum graveolens*

Dans la région de Béchar Khaldi, (2017) a révélé que l'huile essentielle d'*Anethum graveolens* était dominée par l'Apiol (32,78%) et la Carvone (31,04%).

En Iran, un total de 20 composés a été identifié et révélé par (Hojjati, 2017), dont les principaux sont α -Phellandrene (38.85%), ρ -Cymene (14.72%), γ -Terpinene (13.96%), α -Pinene (9.61%), Limonene (6.45%), Germacrene D (6.01%), Dill ether (3.38%), β -Myrcene (2.51%) et α -Thujene (2.06%).

Des travaux en Inde réalisés par (Rana and Blazquez, 2014) ont montré que la composition de l'huile d'*Anethum graveolens* était composée de α -Phellandrene (31.8%), Apiol (15.3%), Dill ether (13.2%), Limonene (11.8%), Geraniol (10.6%) et de p -Cymene (5.3%).

En Tunisie, Assadi et Rodhane (2014) ont réalisé des extractions d'huiles essentielles à partir de trois organes (feuilles, fleurs et graines) d'*Anethum graveolens*. Les résultats ont révélé les composants majeurs dans les feuilles sont le β -Phellandrène (31,25%) et le γ -Terpinène (29,62%). Ceux des fleurs sont l'Apiol (25,14%) et le Limonène (22,49%). Les composants majoritaires dans les graines sont la Carvone (30,47%), l'Apiol (24,04%) et le Limonène (21,14%).

Roomiani et al., (2013) ont révélé que l'huile essentielle d'*Anethum graveolens* L. d'Iran était dominée par le D-carvone avec (36.09%) suivi du Limonene (19.89%), Dill Apiol (16.83%), E-Dihydrocarvone (7.36%) et Z-Dihydrocarvone (6.59%).

L'étude réalisée par (Alloun, 2013) que la composition chimique d'*Anethum graveolens* est caractérisée par une dominance de composés monoterpéniques oxygénés avec un taux de (48,33%) dont le principal composé est la myristicine avec une teneur de (39,1%) suivi de α -Phallendrene (15,7%), Limonene (14,6%), γ -Terpinene (8,6%) et le Fenchone (7.2%).

Jianu et al., (2012) ont révélé que le composant principale de l'huile provenant des graines matures est la Carvone (52,37%) suivi du Limonène (39,20%). La teneur en Phellandrène est variable dans les échantillons d'huile analysés (12,61 %) dans les inflorescences (3,67%) dans les graines immatures (30,45%) dans les tiges et (2,29%) dans les graines matures.

3-3-3/ Composition chimique de l'HE de *Ruta montana*

La composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta montana* est représentée dans le (tableau IX). Un total de douze (12) composés qui représentent (95.28%) de l'huile, ont été identifiés. Le composé majoritaire de l'huile était le 2- Undecanone avec (77.60%) suivi du 2-Decanone (12.89%). L'huile essentielle de *Ruta montana* est caractérisée par une dominance de cétones avec (91,29%) (fig. 24).

Tableau IX : Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE de *Ruta montana*

composants	IR ^a	IR ^b	R.m
α -Pinene	939	938	0,1
α -Phellandrene	1002	1005	0,23
Limonene	1029	1021	0,57
γ -Terpinene	1059	1060	0,23
2-Nonanol	1098	1096	1,2
2-Decanone	1192	1189	12,89
2-Decanol	1199	1201	0,83
2-Undecanone	1294	1291	77,60
2-Undecanol	1301	1305	0,41
2-Tridecanone	1496	1491	0,80
Myristicine	1518	1533	0,32
Elemicine	1557	1560	0,10
Monoterpènes hydrogénés			1,13
Alcool			2,44
Cétones			91,29
Sesquiterpènes			0,42
Total (%)			95,28

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams ,

IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MS™

R.m : *Ruta montana*

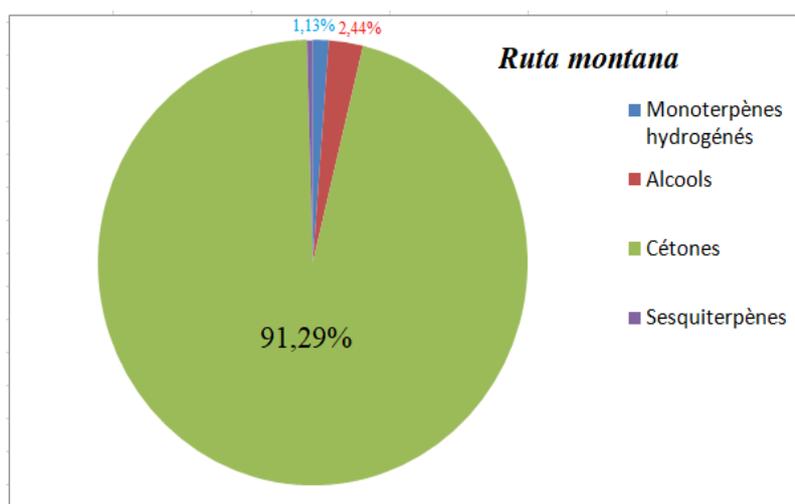


Figure 24 : Répartition en % des principales familles de composés de l'HE de *Ruta montana*

En Tunisie (Bejaoui et *al.*, 2019) ont révélé la composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta montana* était dominée par le 2-Undécanone (86.77%), suivi du 2-Decanone (4.91%) puis le 2-Nonanone (23.62%).

L'étude réalisée par (Alloun, 2013) , la composition chimique de *Ruta montana* présente une dominance de cétones qui constituent 98,8% des composés de l'huile où le 2-Undécanone représente la quasi-totalité de l'huile avec une teneur de 94%, suivi de 2- Decanone (3,3%).

Les travaux réalisés par (Belhadi, 2013) ont révélé que l'huile essentielle extraite à partir des parties aériennes de *Ruta montana* de la région de Blida, Batna et Béjaia présente une dominance du 2-Undécanone avec des teneurs de 78,07%, 77,6% et 51,35% respectivement, suivi du 2-Decanone puis le 2-Dodécanone.

Les travaux de (Kambouche et *al.*, 2008 et Zellagui et *al.*, 2012) sur *Ruta montana* ont révélé une teneur en 2-Undécanone de (32,8%), (60,19%) et (90,4%) provenant respectivement des régions d'Oran, de Mila, et d'Oum El Bouaghi.

Des travaux antérieurs ont montré la richesse des rutacées en métabolites secondaires tels que les coumarines, furanocoumarines et les alcaloïdes (Benkiki, 2006).

3-3-4/ Composition chimique de l'HE de *Thymus pallescens*

La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus pallescens* est représentée dans le (tableau X). Un total de (18) composés qui représentent (97.67%) de l'huile, ont été identifiés. Les composés dominants de l'huile essentielle était le Carvacrol avec (59,15%), suivi de Thymol (12,43%) puis p-Cymène (10,6%). L'huile essentielle de *Thymus pallescens* est caractérisée par une dominance de composés phénoliques avec (72,55%) (fig. 25).

Tableau X : Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE de *Thymus pallescens*

composants	IR ^a	IR ^b	T.p
α -Thujene	930	924	0,9
α -Pinene	939	943	1,98
Camphene	954	955	0,83
β -Pinene	979	977	0,78
Myrcene	990	982	3,2
ρ -Cymene	1024	1019	10,6
Limonene	1029	1028	0,2
γ -Terpinene	1059	1057	4,3
Terpinolene	1088	1083	0,54
Linalool	1096	1092	0,87
Camphor	1146	1153	0,1
Thymol	1290	1309	12,43
Carvacrol	1299	1315	<u>59,15</u>
Carvacryl Acetate	1367	1368	0,97
α -Gurjunene	1409	1406	0,3
(E)-Caryophyllene	1419	1424	0,25
Aromadendrene	1441	1445	0,14
δ -Cardinene	1523	1531	0,13
Monoterpènes hydrogénés			23,33
Alcool			0,87
Cétones			0,1
Phénols			72,55
Sesquiterpènes			0,82
Total (%)			97,67

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams ,

IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM

T.p : *Thymus pallescens*

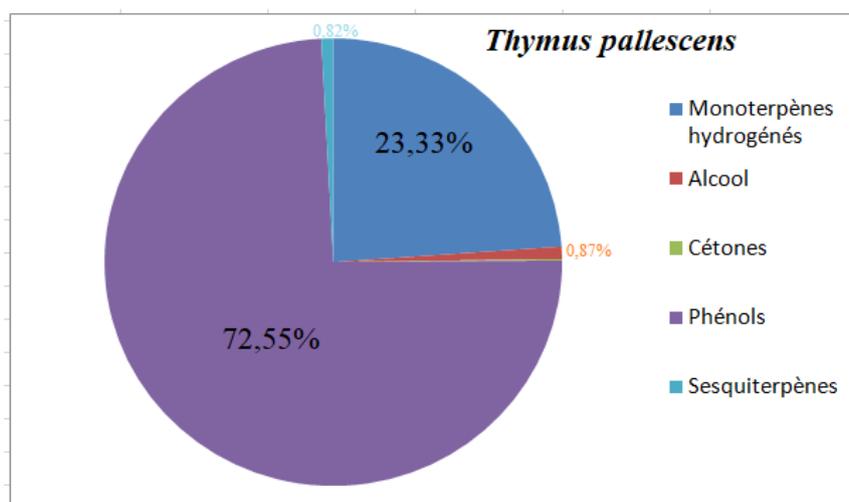


Figure 25 : Répartition en % des principales familles de composés de l'HE de *Thymus pallescens*

L'étude réalisée par (Chaa, 2018) a révélé que le Carvacrol avec (54.09%) et le Thymol avec (16.24%) étaient les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus pallescens*.

Les travaux de (Douar-Latreche, 2012) ont révélé que la composition chimique de l'huile de *Thymus pallescens* était dominée par les composés monoterpéniques oxygénés (51,6%), suivi par les hydrocarbures monoterpéniques avec (37,3%) puis les hydrocarbures sesquiterpéniques avec (4,6%). Le composé majoritaire était le carvacrol avec des teneurs allant de (41,1% à 43,0%) suivi de ρ -Cymène (10% à 11%) et le γ -Terpinène (7,9% à 10,5%). Il est à noter, que dans cette étude le Thymol varie faiblement entre (0,7 % et 0,9%).

Benchabane, (2014) a révélé que les principaux composants de *Thymus pallescens* étaient : Carvacrol (40,2%), Thymol (13,5%), α -Terpineol (7,0%) et γ -Terpinène (6,5%).

Les travaux de (Sahraoui et al., 2016) ont mis en évidence la présence de (11,5%) d'hydrocarbures monoterpéniques, (74,3%) de monoterpènes oxygénés, (2,6%) de sesquiterpènes et (2,1%) de sesquiterpènes oxygénés. Le constituant majoritaire est le Carvacrol avec (68,5%).

L'étude de (Chikhoun, 2007) a montré la dominance du composé phénolique le Carvacrol suivie des deux hydrocarbures monoterpéniques.

Les travaux réalisés par (Hazzit et Baaliouamer, 2009) sur l'influence de l'organe producteur ainsi que le stade végétatif sur la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus pallescens* ont révélé que les feuilles présentaient (39%) de Carvacrol suivi de (17.4%) de ρ -Cymène. Les fleurs de celle-ci présentaient (48.3%) de Carvacrol suivi de (14.1%) de Terpinène. Au stade de développement (HE) présentait (56.2%) de carvacrol suivi de (7.5%) de ρ -Cymène. Au stade végétatif (HE) présentait (65%) de Carvacrol suivi de (10.2%) et au stade floraison l'HE présentait (52.5%) suivi de (13.5%) de ρ -Cymène.

3-3-5/ Composition chimique de l'HE de *Thymus vulgaris*

La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est représentée dans le (tableau XI). Un total de (16) composés qui représentent (97.32%) de l'huile, ont été identifiés. Le principal composé dominant de l'huile était le Thymol avec (56.80 %), suivi de ρ -Cymène avec (15.50%) et γ -Terpinène (08.76%). L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* renferme (59,87%) de composés phénoliques (figure 26).

Tableau XI : Composition chimique en pourcentage (%) de l'HE de *Thymus vulgaris*

composants	IR ^a	IR ^b	T.v
α -Pinene	939	940	2,16
β -Pinene	979	980	0,19
ρ -Cymene	1024	1022	15,50
Limonene	1029	1036	1,25
γ -Terpinene	1059	1054	8,76
Linalool	1096	1096	4,15
Citronellal	1153	1151	1,25
Terpinen-4-ol	1177	1174	1,17
Thymol	1290	1288	56,80
Carvacrol	1299	1301	3,07
Citraldimethoxy (E)	1341	1339	0,82
(E)-Caryophyllene	1419	1416	1,5
Aromadendrene	1441	1439	0,29
α -Humelene	1454	1452	0,14
γ -Cardinene	1513	1509	0,11
δ -Cardinene	1523	1528	0,16
Monoterpènes hydrogénés			27,86
Alcool			5,32
Aldéhydes			2,07
Phénols			59,87
Sesquiterpènes			2,2
Total (%)			97,32

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams ,

IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM

T.v : *Thymus vulgaris*

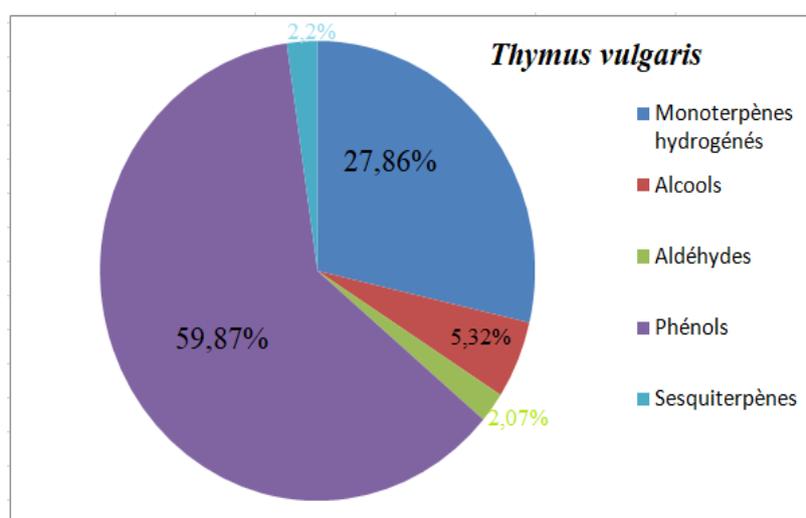


Figure 26: Répartition en % des principales familles de composés de l'HE de *Thymus vulgaris*

Les travaux réalisés par (Bouguerra et *al.*2017) ont révélé que l'huile essentielle extraite de *Thymus vulgaris* dans la région de Blida était une huile à dominance Linalool avec (82,88%). L'étude réalisée par (Bahlouli, 2015) a révélée que l'essence du thym commun est composée majoritairement de Carvacrol avec un taux de (83.8%) suivi du ρ -Cymène (8.15%), γ -Terpinène (4.96%) et Linalool (1.44%).

Les travaux réalisés par (Boruga et *al.*, 2014) les composants majoritaires sont ρ -Cymene (8.41%), γ -Terpinene (30.90%) et Thymol (47.59%).

Au Maroc, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est riche en Thymol avec (41,39%) suivi de γ -Terpinène (22,25 %) (El Ouali Lalami, 2013).

Des travaux réalisés par (Haddaf et *al.*2004) ont révélé que la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* été composé de (25.40%) de Thymol, (11.30%) de Carvacrol, (26.20%) de ρ -Cymène et de (10.42 %) de Thymol-quinone.

Il est à noter, des individus de la même espèce botanique, ayant le même génome et le même phénotype, peuvent présenter des différences significatives au niveau de leur composition chimique.

Le thym compte parmi les espèces qui illustrent le mieux la notion de chémotype ; au moins sept races chimiques ont été formellement identifiées : thymol, carvacrol, géraniol, linalol, α -terpinéol, thuyanol et 1,8-cinéole. Un autre chémotype, à ρ -cymène est parfois décrit (Descepper, 2017). Ces différences sont dues à la période de récolte des plantes, au mode d'extraction utilisé et aux facteurs environnementaux (altitude, ensoleillement, nature du sol, pluviométrie..... etc) (Fellah et *al.*, 2006 ; Bakkali et *al.*, 2008 ; Descepper, 2017).

Tableau XII : Composition chimique en pourcentage (%) des HEs par hydrodistillation

composants	IR ^a	IR ^b	A.c	IR ^b	A.g	IR ^b	R.m	IR ^b	T.p	IR ^b	T.v
α -Thujene	930	931	3,17	-	-	-	-	924	0,9	-	-
α -Pinene	939	939	16,35	941	8,7	938	0,1	943	1,98	940	2,16
Camphene	954	-	-	947	2,28	-	-	955	0,83	-	-
Sabinene	975	-	-	969	1,2	-	-	-	-	-	-
β -Pinene	979	975	23,54	974	11,2	-	-	977	0,78	980	0,19
Myrcene	990	982	8,7	-	-	-	-	982	3,2	-	-
α -Phellandrene	1002	-	-	997	14,8	1005	0,23	-	-	-	-
p-Cymene	1024	-	-	1025	4,25	-	-	1019	10,6	1022	15,50
o-Cymene	1026	1025	3,65	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1029	1031	11,23	1032	13,3	1021	0,57	1028	0,2	1036	1,25
γ -Terpinene	1059	1050	4,35	1054	9,02	1060	0,23	1057	4,3	1054	8,76
Terpinolene	1088	-	-	-	-	-	-	1083	0,54	-	-
Fenchone	1086	-	-	1089	0,1	-	-	-	-	-	-
Linalool	1096	1090	0,23	1098	3,2	-	-	1092	0,87	1096	4,15
2-Nonanol	1098	-	-	-	-	1096	1,2	-	-	-	-
Trans- Pinocarveol	1139	1137	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans- Sabinol	1142	-	-	1139	0,6	-	-	-	-	-	-
Camphor	1146	-	-	1141	1,4	-	-	1153	0,1	-	-
Citronellal	1153	-	-	-	-	-	-	-	-	1151	1,25
Terpinen-4-ol	1177	1175	2,78	-	-	-	-	-	-	1174	1,17
α - Terpineol	1188	1183	2,04	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanone	1192	-	-	-	-	1189	12,89	-	-	-	-
Myrtenal	1195	1192	2,26	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanol	1199	-	-	-	-	1201	0,83	-	-	-	-
Thymol	1290	1286	0,17	1290	0,2	-	-	1309	12,43	1288	56,80
2-Undecanone	1294	-	-	-	-	1291	77,60	-	-	-	-
Carvacrol	1299	1295	3,2	1299	0,4	-	-	1315	59,15	1301	3,07
2-Undecanol	1301	-	-	-	-	1305	0,41	-	-	-	-
Citraldimethoxy (E)	1341	-	-	-	-	-	-	-	-	1339	0,82
Carvacryl Acetate	1367	-	-	-	-	-	-	1368	0,97	-	-
α -Gurjunene	1409	1402	1,29	-	-	-	-	1406	0,3	-	-
(E)-Caryophyllene	1419	-	-	1411	0,1	-	-	1424	0,25	1416	1,5
Aromadendrene	1441	-	-	-	-	-	-	1445	0,14	1439	0,29
α -Humelene	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	1452	0,14
α -Patchoulene	1456	1454	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-
Farnesene (E)- β	1456	1461	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-
Curcumene	1472	1476	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Selinene	1490	1488	3,02	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Tridecanone	1496	-	-	-	-	1491	0,80	-	-	-	-
γ -Cardinene	1513	-	-	-	-	-	-	-	-	1509	0,11
Myristicine	1518	-	-	1514	23,86	1533	0,32	-	-	-	-
δ -Cardinene	1523	-	-	1530	0,1	-	-	1531	0,13	1528	0,16
Elemicine	1557	-	-	1551	1,2	1560	0,10	-	-	-	-
Spathulenol	1578	1572	2,87	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpènes			82,97		70,65		94,06		96,85		95,12
Sesquiterpènes			8,38		25,26		1,22		0,82		2,2
Total (%)			91,35		95,91		95,28		97,67		97,32

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams , IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM , A.c : *Artemisia campestris*, A.g : *Anethum graveolens*, R.m : *Ruta montana*, T.p : *Thymus palleescens*, T.v : *Thymus vulgaris*

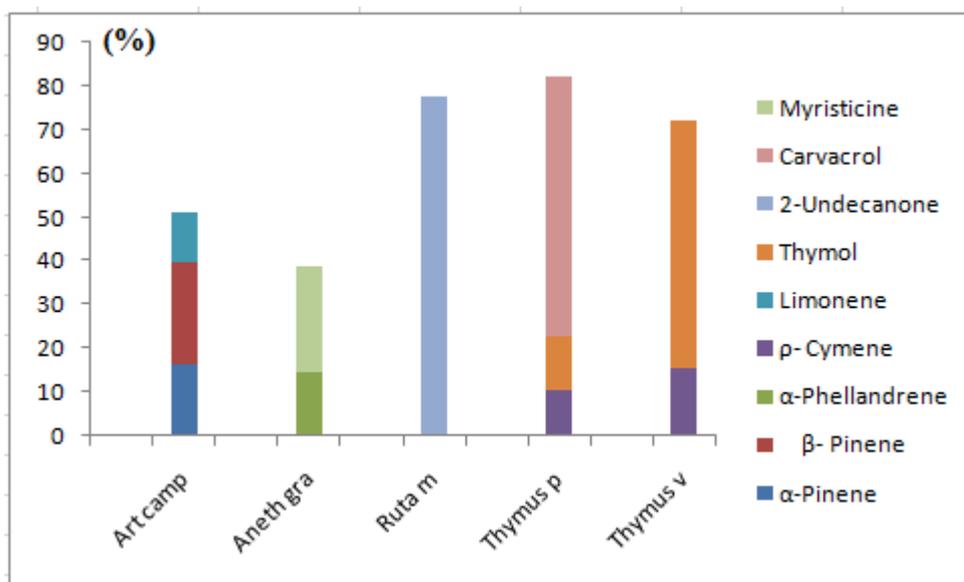


Figure 27 : Les principaux composants de nos huiles essentielles

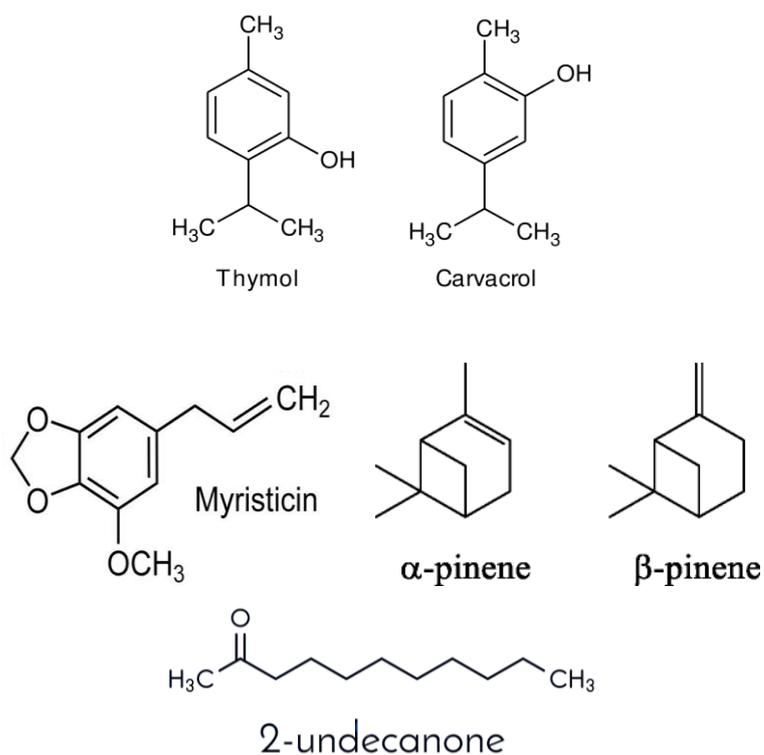


Figure 28 : Structure chimique des principaux composés détectés dans nos huiles essentielles

La composition chimique de nos huiles essentielles a été caractérisée par la présence de deux à trois composants majoritaires à des concentrations assez élevées par rapport aux autres composants présents en faibles quantités (Fig.27). En effet, cette composition est dominée par des monoterpènes hydrocarbonés (β -pinène, α -pinène et limonène) pour *Artemisia campestris*, d'un composé aromatique dérivé du phénylpropane (la myristicine) pour *Anethum graveolens*, de cétones (2-undécanone) pour *Ruta montana* et de composés phénoliques (carvacrol et thymol) pour les *Thymus* (Fig. 28).

Les compositions chimiques de ses huiles avaient été étudiées par de nombreux chercheurs algériens (Ghorab et al., 2013 ; Touil et Benrebaha, 2014 ; Alloun, 2013 ; Zellagui et al., 2012 ; Kambouche et al., 2008 ; Benchabane, 2014 ; Sahraoui et al., 2016 et Benameur et al., 2018) où nos résultats sont assez proches avec quelques variations des composants et de leurs teneurs dans l'huile essentielle. Ces différences confirment l'influence des caractéristiques climatiques et édaphiques des régions géographiques sur la composition chimique des huiles essentielles. D'ailleurs, il est connu que la composition chimique d'une huile essentielle dépend des facteurs environnementaux, du patrimoine génétique et du stade de développement de la plante (Descepper, 2017).

3-4/ Les tests phytochimiques des extraits totaux

Les résultats du screening phytochimique sont reportés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats du screening phytochimique

Métabolites secondaires	Réactions positives	<i>Calotropis procera</i>	<i>Colocynthis vulgaris</i>	<i>Inula viscosa</i>	<i>Peganum harmala</i>
Alcaloïdes	Précipité rouge	++	+	+	+++
Anthocyanes	Coloration rouge	+	-	+	++
Coumarines	Apparition d'un trouble	+++	+++	+	++
Flavonoïdes	Coloration rouge-orangée	+++	+	+++	-
Glucosides	Coloration rouge puis violette	+++	+++	+++	-
Quinones libres	Coloration orangée	-	+	-	-
Quinones combinés	Coloration rouge	-	+	-	-
Saponosides	Précipité blanc	+++	+++	+	+++
Tanins totaux	Coloration bleue	+++	+	++	+++

Nulle (-) ; Faible (+) ; Moyennement riche (++) et riche (+++).

Les tests phytochimiques des quatre espèces étudiées sont représentés dans le tableau XIII dont les résultats sont caractérisés par la présence de composés azotés où *Peganum harmala* réputé pour sa richesse en alcaloïdes par rapport aux autres espèces étudiées, de composés phénoliques et de composés terpeniques (hétérosides).

Les feuilles de *Calotropis procera* sont riches en coumarines, flavonoïdes, glucosides, saponosides et de tanins totaux. En revanche, on note une absence totale de quinones.

L'étude réalisée par (Chaïbou et *al.*, 2020) ont révélé que les feuilles de *Calotropis procera* étaient dépourvus d'alcaloïdes, de saponosides et de quinones par contre elles sont très riches en flavonoïdes et faiblement en tanins.

Les travaux réalisés par (Mohammedi, 2013) ont révélé la présence de flavonoïdes, de tanins, d'alcaloïdes et de glycosides dans les feuilles de *Calotropis procera*. Les travaux de (Traore, 2009), ont révélé la présence très riche de coumarines.

Les travaux réalisés par (Traore, 2009) ont révélé deux groupes de substances isolés des feuilles de *Calotropis procera* : les cardenolides (calotropine, calotropagénine, uscharine) et les polysaccharides.

L'étude phytochimique des écorces de racines de *Calotropis procera* Ait. réalisée par (Nikiema-Wendpagnagde, 2005) a révélée la présence de caroténoïdes, de stéroïdes, d'hétérosides cardiotoniques, d'hétérosides triterpéniques et de saponosides.

L'extrait des fruits de *Colocynthis vulgaris* sont riches en coumarines, glucosides et saponosides. Les flavonoïdes et les quinones libres sont moyennement riches. Les alcaloïdes sont faiblement présents contrairement aux travaux réalisés par (Afifi et al, 1973, Maatooq et *al.*, 1997) où la coloquinte est riche en alcaloïdes présents au niveau des graines, pulpes, feuilles et racines.

Les travaux réalisés par (Chaouch et Dada Moussa, 2019) ont révélé la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de saponosides dans l'épicarpe et la pulpe de *Colocynthis vulgaris*.

En revanche, nous avons noté une absence d'anthocyanes dans nos extraits.

Quant aux parties aériennes d'*Inula viscosa*, l'extrait est très riche en flavonoïdes, et glucosides. En revanche, on remarque une absence totale de quinones et moyennement riche en tanins.

A titre comparatif avec les résultats de certaines études antérieures, menées sur cette plante, les résultats obtenus sont en accord avec ceux de (Djedioui, 2010) à l'Est Algérien a noté une présence des flavonoïdes, saponosides et les tanins et absence d'alcaloïdes dans les feuilles d'*Inula viscosa*.

Les études effectuées sur cette plante ont montré qu'elle était riche en métabolites secondaires tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les composés terpénoïdes (Bouyahya et al, 2018).

L'étude de (Boumaza, 2011) à Oran a révélé une présence importante de flavonoïdes et de saponosides et absence de quinones.

Quant aux travaux de (Ramli, 2013) à Oran a révélé une existence importante en flavonoïdes et une présence faible des certains métabolites tels que les coumarines, les tanins dans la partie aérienne d'*Inula viscosa*.

Cafarchia et al., (2002) ont révélé une richesse des feuilles d'*Inula* en flavonoïdes ,tanins et glucosides.

Benayache et al., (1991) rapportent que les parties aériennes d' *Inula viscosa* contiennent des flavonoïdes.

Les travaux réalisés par (Benyahia, 2014) à montré que les alcaloïdes sont très faiblement présents dans la partie de plante, Les flavonoïdes et les tanins sont caractérisés avec une dominance importante. Les saponosides sont fortement présents ainsi en composés polyphénols.

L'extrait des jeunes plantules de *Peganum harmala* sont riches en alcaloïdes, saponosides et de tanins totaux. En revanche on note une absence totale de flavonoïdes, de glucosides et de quinones.

Cette plante est réputée pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes particulièrement dans les graines et racines (2–7%) par rapport aux tiges (0,36 %) et feuilles (0,52 %) (Idrissi-Hassani et El Hadek, 1999 ; Frison et al., 2008).

Peganum harmala contient des acides aminés, des carbohydrates, des flavonoïdes, des coumarines, des bases volatiles, des tanins, des stérols, et des triterpènes (Tahrouch et al., 2002).

L'étude réalisée par (Dahmane, 2010) a révélée que les principaux composés sont les alcaloïdes suivis des coumarines et des saponosides dans les feuilles et les fruits. Les autres composants : les flavonoïdes sont en faible quantité.

Il est à noter, la présence ou l'absence de ces éléments varie d'une espèce à une autre selon la localisation et les différentes parties de la plante.

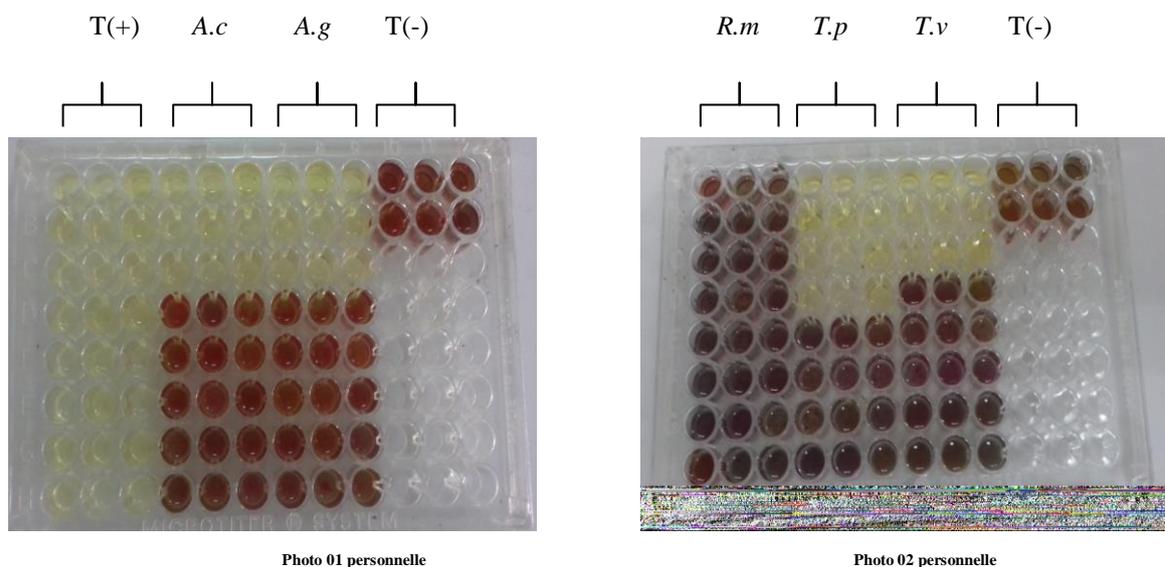
3-5 / Activité biologique

3-5-1- Action des huiles essentielles (HEs) sur les promastigotes de *Leishmania major* (Activité antileishmanienne)

L'activité antileishmanienne des huiles essentielles a été évaluée sur les promastigotes de *Leishmania major* et comparée à celle de l'amphotéricine B médicament de référence en utilisant le dosage colorimétrique du méthylthiazole tétrazolium (MTT) est un composé organique coloré en jaune, il est réduit uniquement dans les cellules métaboliquement actives (vivantes) par des déshydrogénases mitochondriales, en un composé violet, insoluble : le formazan. Cette modification chimique s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption. Ceci permet une mesure spectrophotométrique du formazan et de sa quantification.

Après 72h d'incubation, une observation des plaques de culture cellulaire au microscopique optique inversé afin d'évaluer l'état des parasites dans chaque condition. Puis les traiter au MTT.

Après solubilisation (dissoudre les cristaux de formazan) (Fig.29), une lecture par spectrophotométrie à une longueur d'onde égale à 540 nm nous a permis de calculer le pourcentage d'inhibition à 72 h et de tracer les graphes (Fig.30).



T(+):Témoin positif (Amphotéricine B), A.c :*Artemisia campestris*, A.g :*Anethum graveolens*,
R.m : *Ruta montana*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*, T(-) : Témoin négatif

Figure 29 : Résultats du test MTT sur plaque après solubilisation

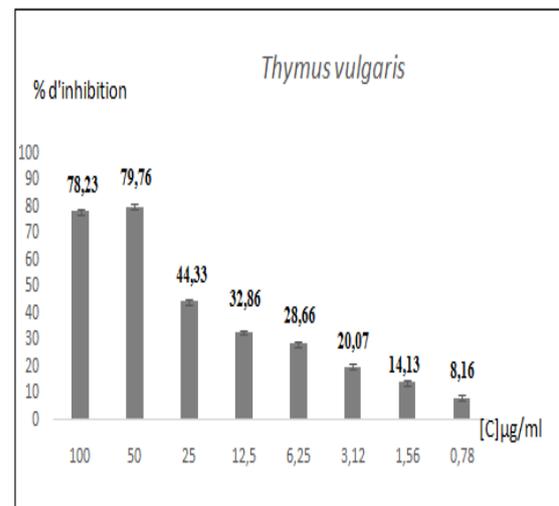
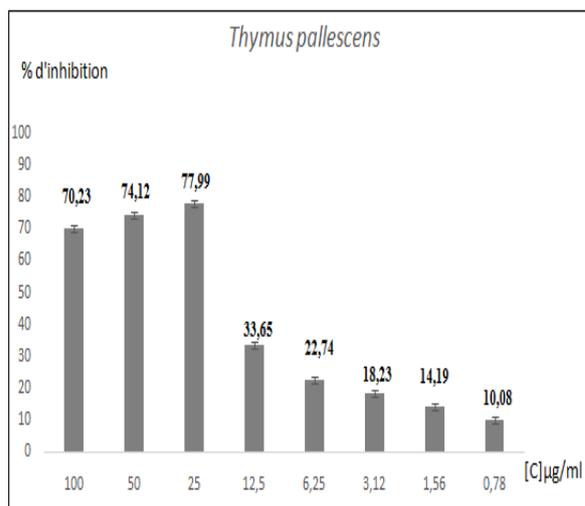
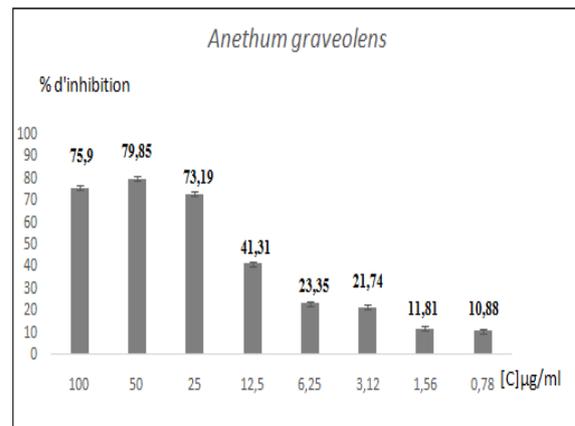
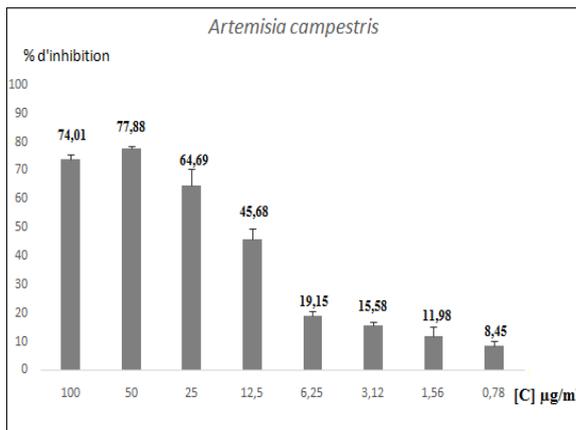
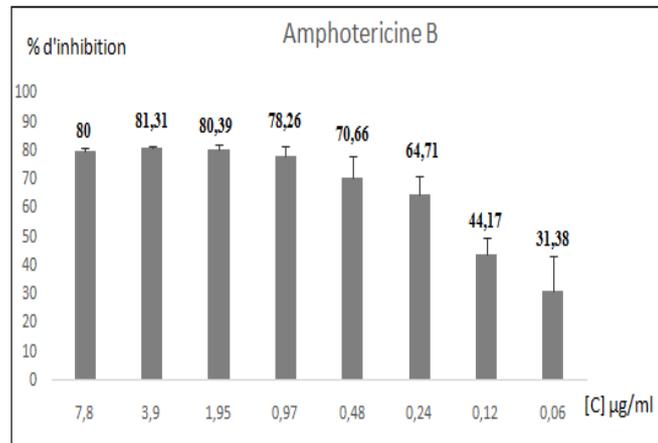


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition des promastigotes vis-vis des différentes concentrations

Un premier criblage sur des cultures de *Leishmania major* nous a permis d'identifier quatre plantes à activité antileishmanienne à l'exception de *Ruta montana*. La concentration de (50µg/ ml) a enregistré les taux les plus élevés d'inhibition de promastigotes avec (77,88 %) pour *Artemisia campestris*, (79,85 %) pour *Anethum graveolens* et (79,76 %) pour *Thymus vulgaris*. Par contre, *Thymus pallescens* a enregistré un taux de (77,99%) pour une concentration de (25µg/ml).

Les résultats obtenus ont été analysés par le test de régression non linéaire dose-réponse à l'aide du programme GraphPad Prism 5. La CI₅₀ est déterminée (Fig. 31 et Tableau XIV).

Nos HEs ont présenté une activité leishmanicide inférieure à celle de l'amphotéricine B (produit pur). Les HEs de *Thymus pallescens*, *Anethum graveolens* et *Artemisia campestris* ont exprimé un meilleur pouvoir antiparasitaire contre *Leishmania major* par rapport à *Thymus vulgaris*. Le test de Tukey a révélé que les CI₅₀ de ces trois HEs n'étaient pas significativement différentes entre elles $p > 0,05$ (Tableau XV).

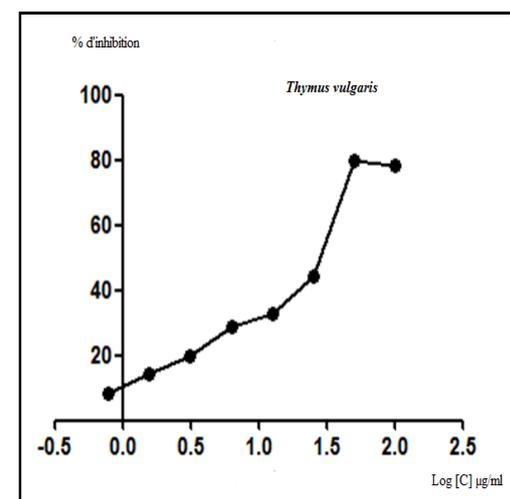
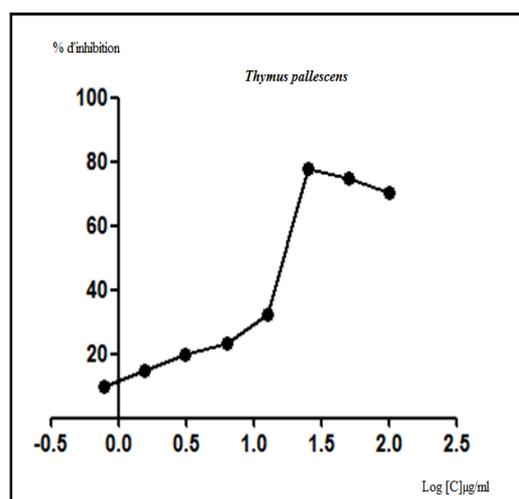
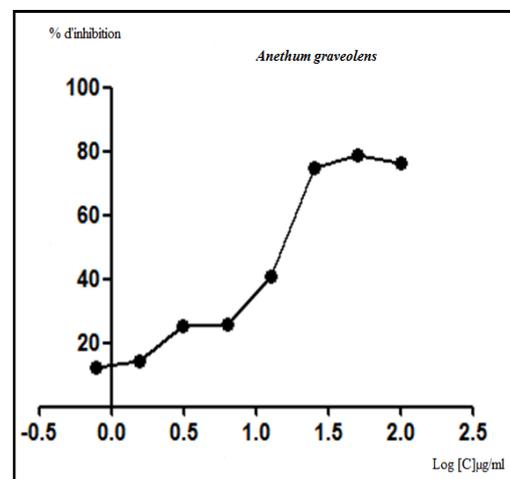
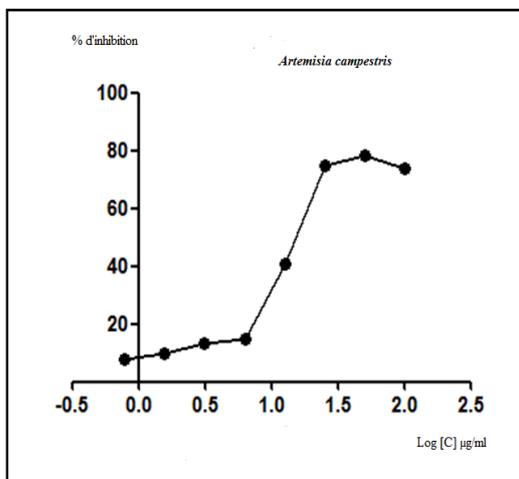
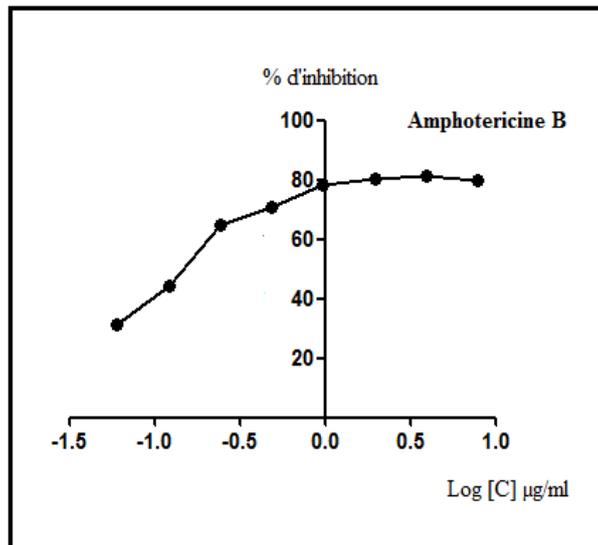


Figure 31 : Pourcentage d'inhibition des promastigotes en fonction du Log des différentes concentrations

Tableau XIV : Activité antileishmanienne *in vitro* sur les promastigotes de *Leishmania major*

Plantes étudiées	CI50±SEM Promastigotes	CI50	Classement
<i>Artemisia campestris</i>	14,02 ^a ±0,18	10 <CI> 50	Active
<i>Anethum graveolens</i>	13,83 ^a ±0,30	10 <CI> 50	Active
<i>Ruta montana</i>	-	>100	Non active
<i>Thymus pallescens</i>	13,72 ^a ±0,20	10 <CI> 50	Active
<i>Thymus vulgaris</i>	31,60 ^b ±0,50	10 <CI> 50	Active
Amphotéricine B	0,061 ^b ±0,01	< 10	Très actif

CI50: Concentration d'inhibition à 50%, Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif), Les lettres (a et b) indiquent les différences significatives selon le test de Tukey , a : p>0,05 et b : p<0,05

Tableau XV:Analyse de la variance et le test de Tukey des HE par Graph Pad 5

Analyse des tableaux	Données		
Analyse de la variance à sens unique			
Valeur p	<0,0001		
Les moyennes sont significativement différentes p<0.05	oui		
Nombre de groupes	5		
F	5451		
R ²	0,9995		
Tableau d'Anova	Sommes des carrés	DDL	Carrés moyens
Traitement (entre les colonnes)	1506	4	376,5
Residu (à l'intérieur des colonnes)	0,6908	10	0,06908
Total	1507	14	
Test de comparaison multiple de Tukey	MoyenneDiff	q	Significatif p<0, 05
AmphoB vs <i>Artemisia</i>	-13,97	92,05	oui
AmphoB vs <i>Anethum</i>	-13,75	90,67	oui
AmphoB vs <i>Thymus p</i>	-13,66	90,01	oui
AmphoB vs <i>Thymus v</i>	-31,54	207,8	oui
<i>Artemisia</i> vs <i>Anethum</i>	0,2100	1,384	non
<i>Artemisia</i> vs <i>Thymus p</i>	0,3100	2,043	non
<i>Artemisia</i> vs <i>Thymus v</i>	-17,57	115,8	oui
<i>Anethum</i> vs <i>Thymus p</i>	0,1000	0,6590	non
<i>Anethum</i> vs <i>Thymus v</i>	-17,78	117,2	oui
<i>Thymus p</i> vs <i>Thymus v</i>	-17,88	117,8	oui

3-5-2- Action des huiles essentielles sur les cellules Raw.264.7 : Test de cytotoxicité et indice de sélectivité

Le test de cytotoxicité des huiles essentielles a été évalué sur les cellules macrophagiques (Raw 264.7) et comparé à l'amphotéricine B pour évaluer leur utilité comme produits bioactifs à effet leishmanicide.

Il ressort de cette activité, après 72h d'incubation et traitement des plaques au MTT (Fig.32) puis une lecture par spectrophotométrie (Fig. 33 et 34) que les *Thymus* sont toxiques sur les macrophages Raw 264.7 dont les IS sont inférieurs à 10 et que les huiles d'*Artemisia campestris* et d'*Anethum graveolens* ont montré une faible cytotoxicité sans danger pour les macrophages. Le test de Tukey a révélé une différence significative entre les moyennes des CC50 $p < 0,05$ (Tableau XVI).

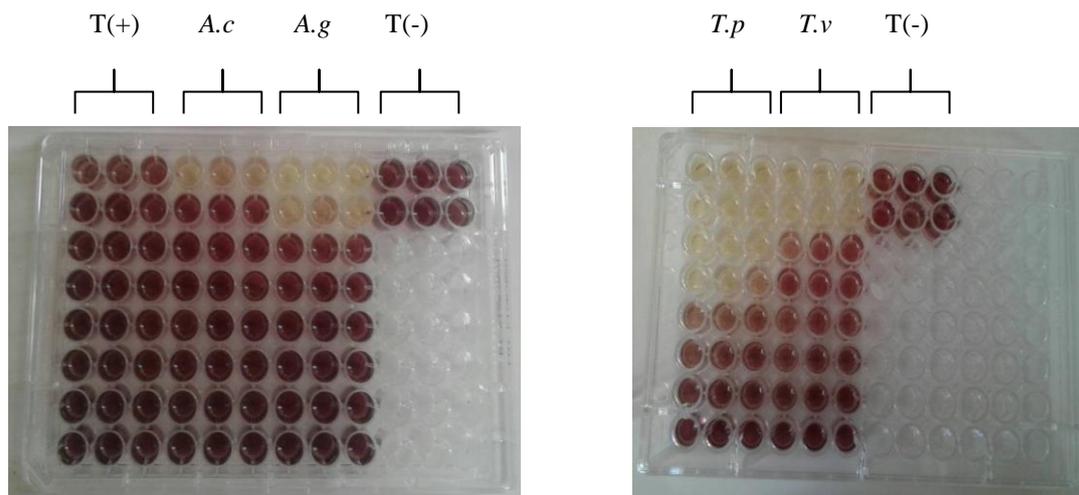


Photo.03 Personnelle

Photo.04 Personnelle

T(+):Témoïn positif (Amphotéricine B), A.c :*Artemisia campestris*, A.g :*Anethum graveolens*,
T.p : *Thymus palleescens*, T.v : *Thymus vulgaris*, T(-) : Témoïn négatif

Figure 32 : Résultats du test MTT sur plaque après solubilisation

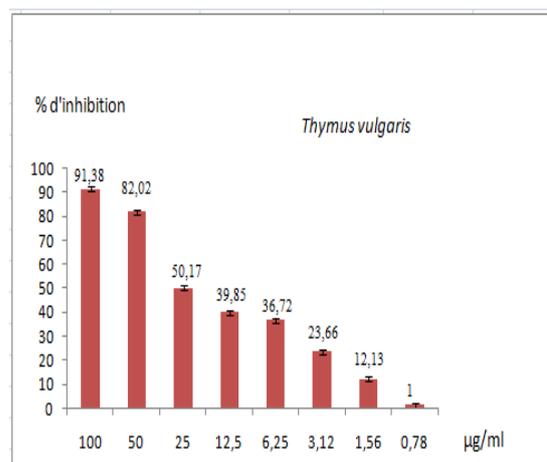
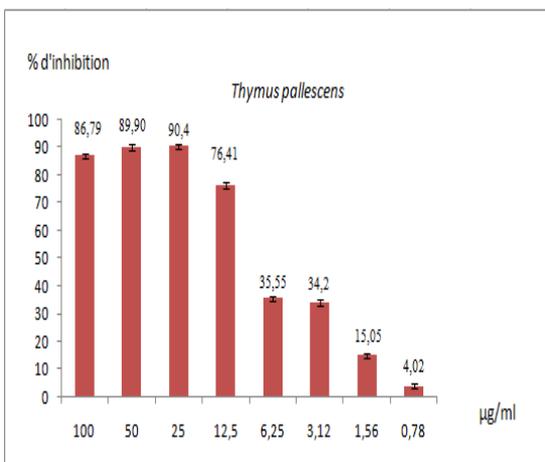
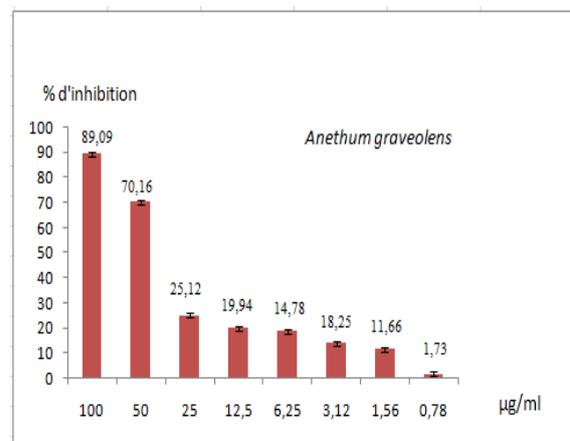
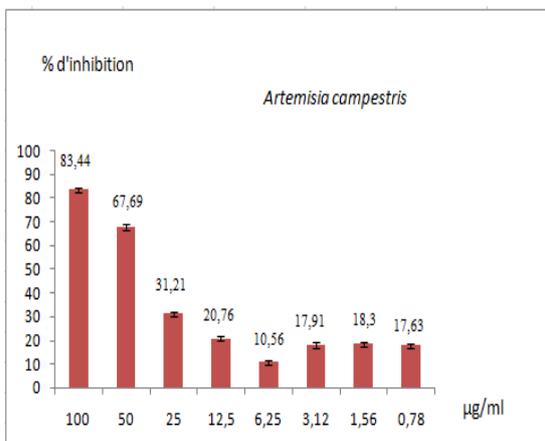
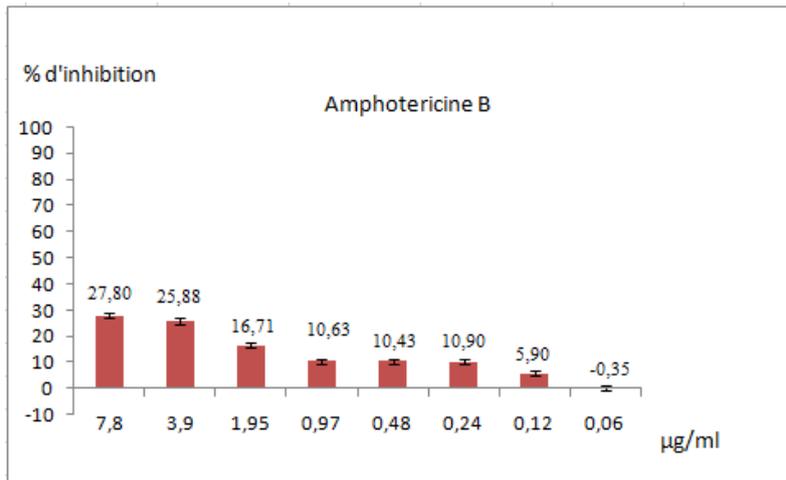


Figure 33 : Pourcentage d'inhibition des macrophages vis-à-vis des différentes concentrations

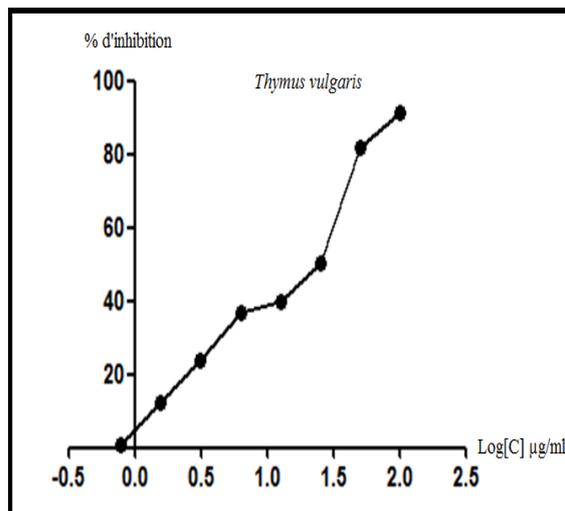
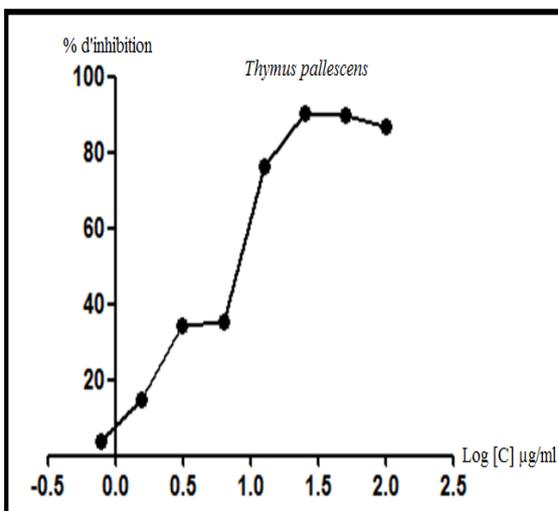
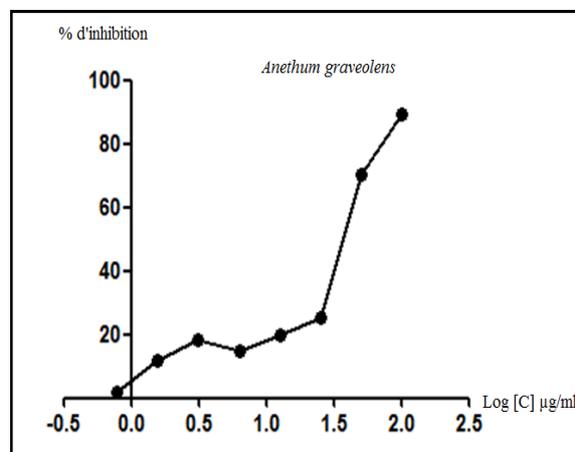
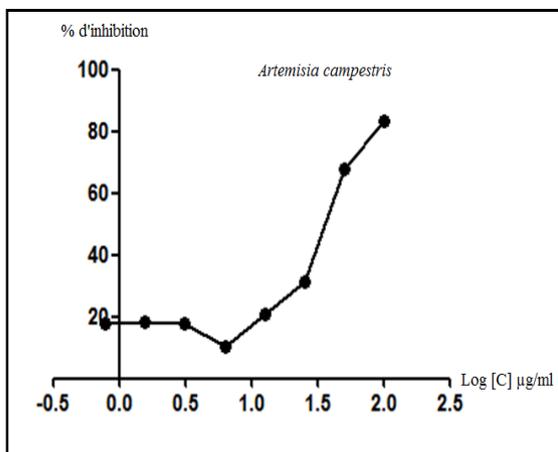
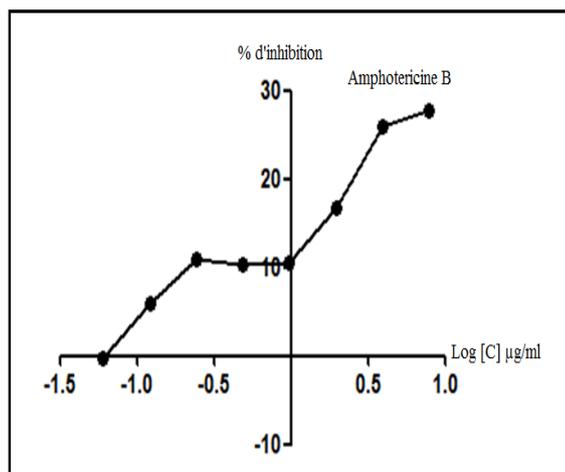


Figure 34 : Pourcentage d'inhibition des macrophages en fonction du Log des différentes concentrations

Tableau XVI: Activité cytotoxique sur les cellules Raw264.7 et indice de sélectivité.

Plantes étudiées	CC50±SEM Macrophages	CC50/CI50 Indice de sélectivité
<i>Artemisia campestris</i>	183 ^a ±0,18	13,05
<i>Anethum graveolens</i>	158,1 ^a ±0,22	11,43
<i>Thymus palleescens</i>	5,024 ^a ±0,49	0,36
<i>Thymus vulgaris</i>	23,79 ^a ±0,26	0,75
Amphotéricine B	2,2 ^a ±0.26	36,06

CC50: Concentration cytotoxique à 50%, Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif).

la lettre (a) indique la différence significative avec le test de Tukey $p < 0,05$.

Discussion

L'activité antileishmanienne de nos huiles essentielles a révélé que *Ruta montana* riche en cétones dont le composé majoritaire est le 2- undecanone avec (77.60%) représentant la quasi-totalité de l'huile, n'a montré aucune activité.

Les huiles de *Thymus palleescens* renfermant (59,15%) de carvacrol et de *Thymus vulgaris* avec (56,80%) de thymol ont montré une activité significative contre les promastigotes de *Leishmania major*. Il semblerait que cette activité antileishmanienne est liée à la présence des composés phénoliques. En effet, les diverses propriétés biologiques rapportées pour les *Thymus*, telles que les activités antioxydantes, insecticides, antibactériennes, antifongiques et antivirales (Figueiredo et al., 2008 ; Pina-Vaz et al., 2004 ; Vale-Silva et al., 2010), sont généralement liées aux composés phénoliques, particulièrement le thymol et le carvacrol (Karaman et al., 2001 ; Rasooli et Mirmostafa, 2003 ; Rota et al., 2008).

Les travaux réalisés par (Essid et al., 2015) ont révélé que l'huile essentielle de *Thymus hirtus* a réduit de manière significative la croissance des promastigotes de *Leishmania major*.

Nous avons noté que l'huile essentielle de *Thymus palleescens* riche en carvacrol était plus efficace, que celle de *Thymus vulgaris* riche en thymol. Des travaux réalisés par (Farias-Junior et al., 2012) pour lequel l'huile essentielle de *Lippia sidoides* riche en carvacrol était plus efficace que l'huile riche en thymol vis-à-vis de *Leishmania chagasi*.

Cependant, nos huiles essentielles de *Thymus* ont montré une toxicité contre les macrophages Raw 264.7. D'après (Lawrence, 2000) l'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. A cet effet, il semblerait que le thymol et le carvacrol seraient responsables de la toxicité. En effet, les travaux réalisés par (Rodrigues et al., 2015) ont démontré que les deux composés phénoliques thymol et carvacrol possédaient une cytotoxicité élevée à tous les types de cellules testées.

Quant aux huiles d'*Artemisia campestris* riche en monoterpènes hydrocarbonés et d'*Anethum graveolens* contenant 23,86% de myristicine ont montré une bonne activité antileishmanienne avec une faible cytotoxicité.

Des travaux réalisés par (Mathlouthi et al., 2018) sur l'effet des huiles essentielles des espèces d'*Artemisia herba-alba* ; *Artemisia absinthium* et *Artemisia campestris*, sur la forme promastigote de *L. major*. Tous les extraits utilisés dans cette étude, ont été capables de réduire de façon drastique la croissance du parasite et ont montré une réduction statistiquement significative de la survie des cellules après 72 heures d'exposition aux différentes huiles essentielles avec des valeurs de CI 50 de $1,20 \pm 0,043 \mu\text{g/mL}$, $1,49 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ et $2,20 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$, respectivement, contre les promastigotes de *L. major*.

En effet, l'artémisinine, une lactone sesquiterpénique produite par *Artemisia annua*, a été parmi les premiers composés qui a montré une activité antiprotozoaire significative (Phillipson et Wright, 1991).

Les travaux réalisés par (Azizi et al., 2014) ont révélé l'efficacité de *L. major* sur les extraits de plantes d'*Artemisia absinthium*.

Les résultats d'une étude ont montré que α -pinène et p-cymène avaient une activité antileishmanienne (Rodrigues et al., 2015].

Dans notre étude *Artemisia campestris* contient (16,35%) de α -pinène et *Anethum graveolens* (8,7%) α -pinène et (4,25%) p-cymène.

De même, les résultats d'une autre étude ont montré que la plante *Myrtus communis* avait des propriétés anti leishmaniennes *in vitro* probablement en raison de sa teneur en α -pinène (Mahmoudvand et al., 2015).

(Rodrigues et al., 2015) ont montré que α -pinène était efficace contre les formes de *Leishmania amazonensis* et présentaient une faible cytotoxicité contre les macrophages murins et les érythrocytes humains.

Les travaux réalisés par (Arruda et al., 2009) ont montré que le Limonène était efficace contre les promastigotes de *Leishmania major*. En effet, nos huiles essentielles d'*Artemisia campestris* et *Anethum graveolens* contenaient respectivement (11,23%) et (13,3%) de Limonene.

Des travaux réalisés par (Essid et al., 2015) sur des normes commerciales correspondant aux principaux composants des HEs étudiées ont été testés pour leur activité leishmanicide. L'activité antileishmanienne la plus élevée a été obtenue pour le β -caryophyllène qui a présenté une valeur IC50 de $1,06 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$ pour *L. infantum* et $1,33 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ pour *L. major* ; pour le géraniol avec une valeur IC50 de $3,78 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$ pour *L. infantum* et de $5,57 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ pour *L. major* ; pour le camphre avec une valeur de CI50 de $5,5 \pm 1,27 \mu\text{g/mL}$ pour *L. infantum* et de $7,9 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$ pour *L. major* ; pour le carvacrol avec une valeur de CI50 de $7,35 \pm 1,78 \mu\text{g/mL}$ pour *L. infantum* et de $9,15 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ pour *L. major*.

D'autres standards comme le α -pinène ont montré une activité antileishmanienne modérée avec une valeur IC50 de $17,6 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$ pour *L. infantum* et $19,8 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$ pour *L. major* et une très faible activité a été enregistrée pour les composés 1,8-cinéole, citronnelle et γ -eudesmol avec une CI50 $> 50 \mu\text{g/mL}$ (Essid et al., 2015).

L'activité de la Myristicine n'a pas encore été documentée, donc il semblerait que l'activité antileishmanienne de nos huiles d'*Artemisia campestris* et *Anethum graveolens* n'est pas seulement due aux composés majoritaires de (HE) mais également à la synergie entre les différents constituants terpéniques (mono. et sesquiterpènes).

Cependant, *Artemisia campestris* a déjà été étudiée par (Essid et al., 2015 ; Mathlouthi et al., 2018), tandis qu'*Anethum graveolens* mérite plus d'attention car à notre connaissance il s'agit du premier rapport concernant l'activité antileishmanienne.

3-5-3- Action des extraits totaux (Ex.T) sur les promastigotes de *Leishmania major* (Activité antileishmanienne)

Après 72 h d'incubation, une lecture au microscope optique inversé a révélé que les quatre extraits des plantes étudiées à savoir : *Inula viscosa*, *Peganum harmala*, *Colocynthis vulgaris* et *Calotropis procera* avaient une activité antileishmanienne. Cependant, après traitement au MTT et avant la solubilisation 02 extraits parmi les 04 à savoir : *Peganum harmala* et *Calotropis procera*, ont interfère avec le test MTT, c'est-à-dire ils ont présentait des densités optiques supérieures au témoin négatif. (fig.35).

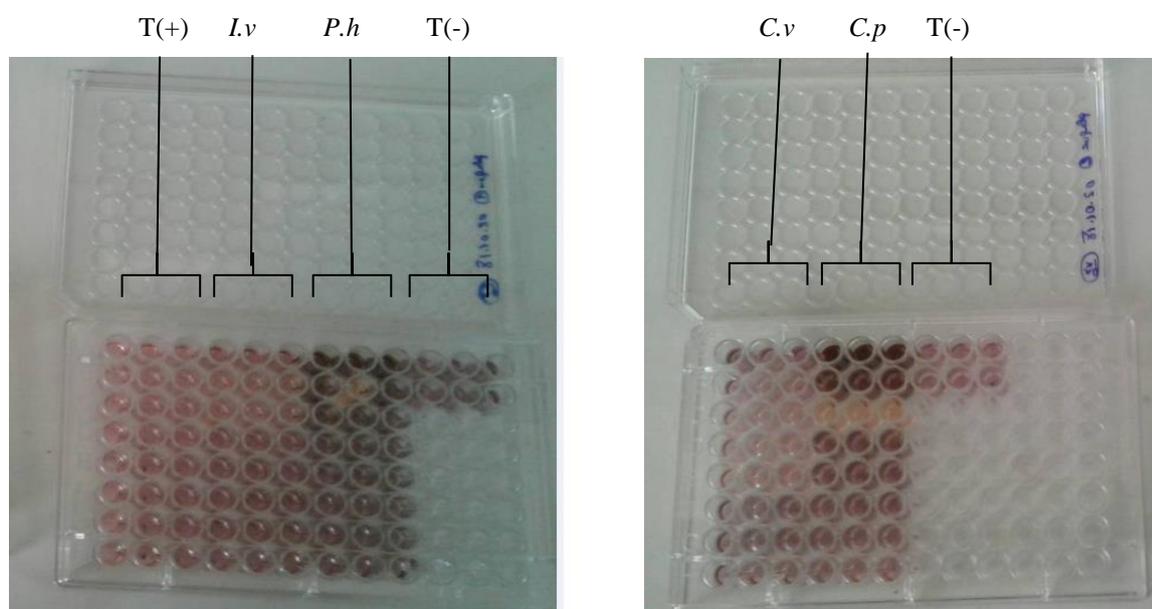


Figure 35 : Résultats du test MTT sur plaque avant solubilisation

Après solubilisation, puis une lecture par spectrophotométrie à une longueur d'onde égale à 540 nm nous a permis de calculer le pourcentage d'inhibition des 02 espèces n'ayant pas interféré avec le test MTT à savoir *Inula viscosa* et *Colocynthis vulgaris* (Fig. 36) et de tracer les graphes (Fig. 37).

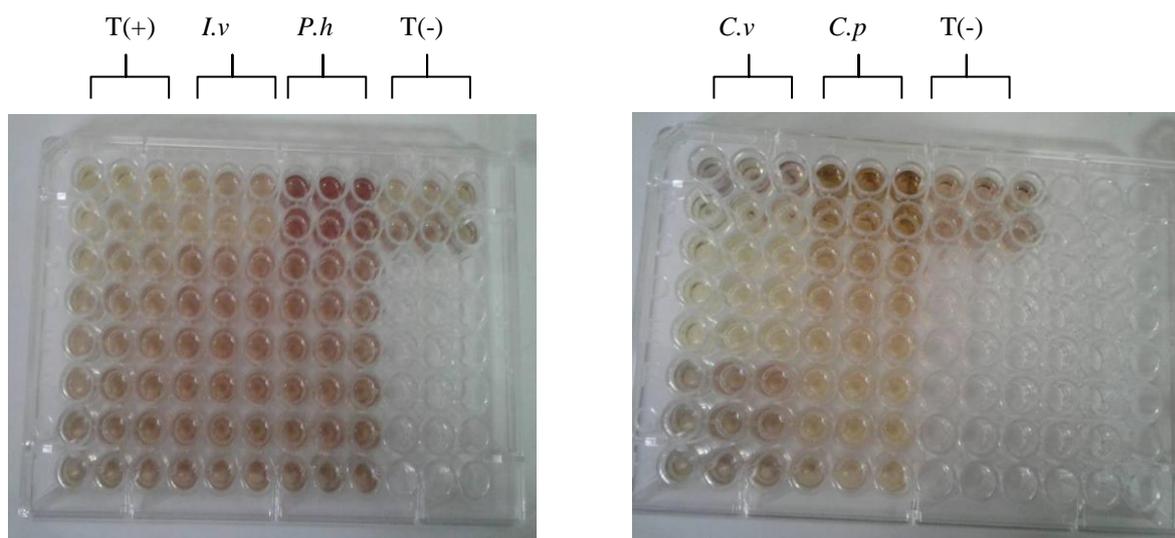


Figure 36 : Résultats du test MTT sur plaque après solubilisation

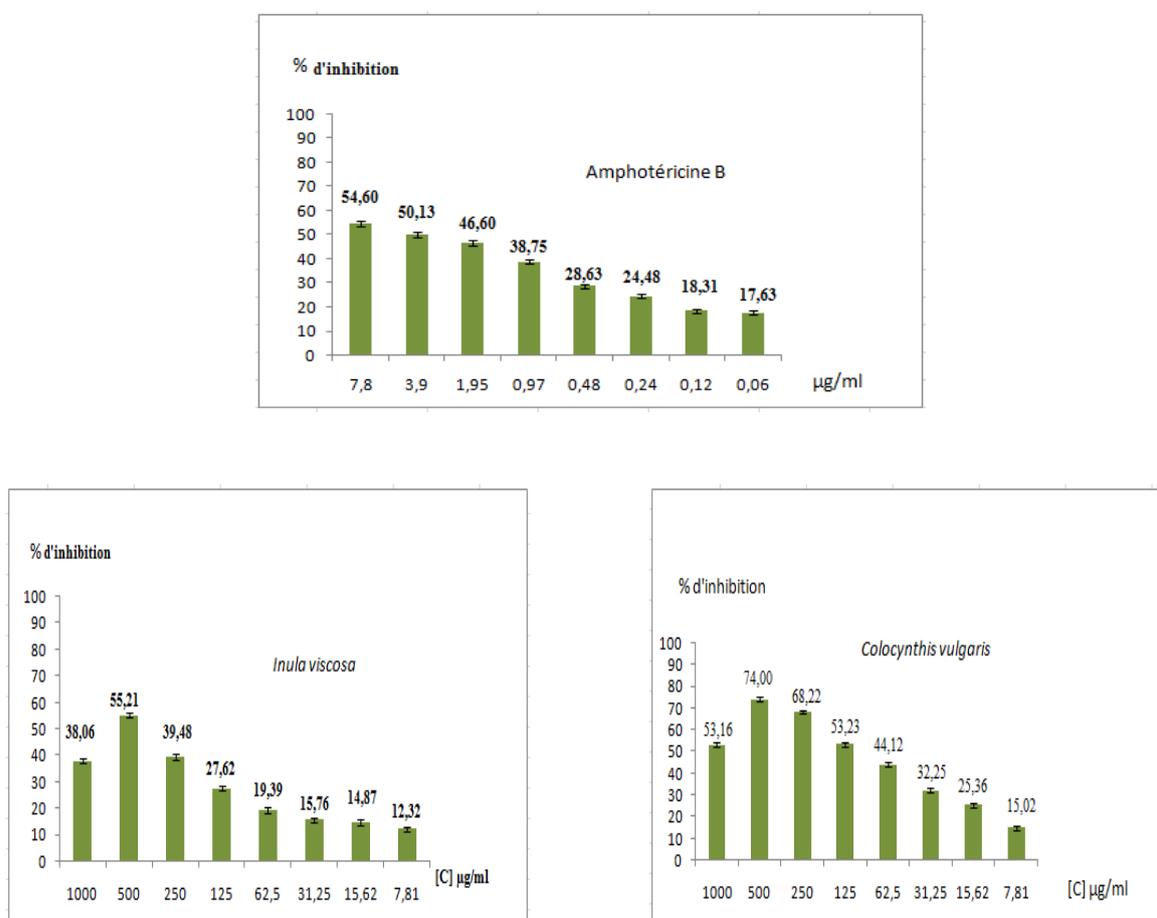


Figure 37: Pourcentage d'inhibition des promastigotes vis-vis des différentes concentrations.

La concentration de (500 µg/ ml) *Inula viscosa* à enregistré un taux d'inhibition de (55.21%)
 Par rapport à *Colocynthis vulgaris* à enregistré un taux de (74%).

Les résultats obtenus ont été analysés par le test de régression non linéaire dose-réponse à l'aide du programme GraphPad Prism 5. La CI₅₀ est déterminée (Fig. 38 et Tableau XVII).

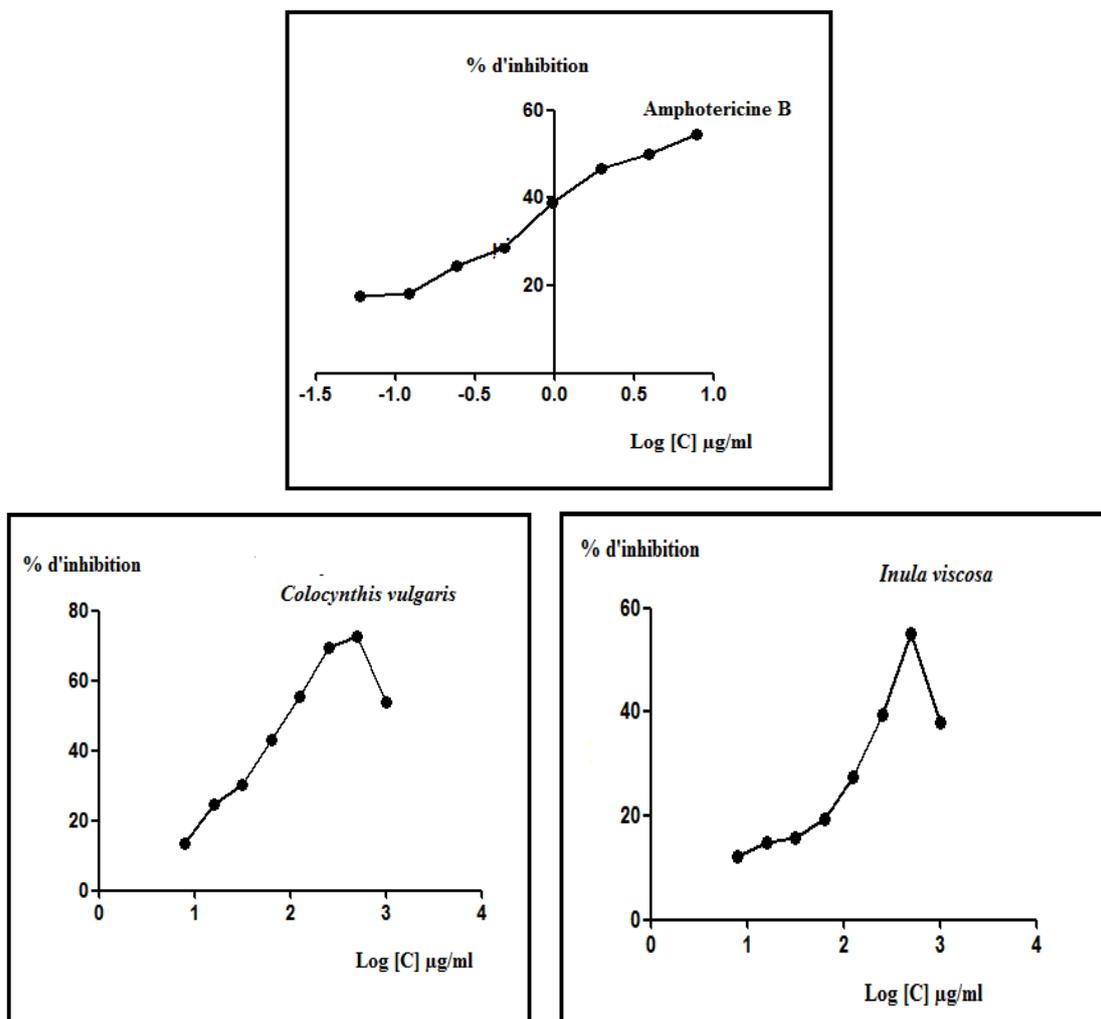


Figure 38: Pourcentage d'inhibition des promastigotes en fonction du Log des différentes concentrations

Tableau XVII : Activité antileishmanienne des (Ex.T) in vitro sur les promastigotes de *Leishmania major*

Plantes étudiées	CI50±SEM Promastigotes	Activité
<i>Calotropis procera</i>	-	Interférée
<i>Colocynthis vulgaris</i>	31,74±0.9	Active
<i>Inula viscosa</i>	126,3±1.6	Active
<i>Peganum harmala</i>	-	Interférée
Amphotéricine B	0,84±0.1	Très active

Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif).

Ce qui ressort du tableau XVII, *Colocynthis vulgaris* a exprimé un meilleur pouvoir antiparasitaire avec CI50% de 31,74% contre la souche virulente PGLC 94.

L'analyse de la variance et le test de tukey ont révélé une différence hautement significative entre les moyennes et les groupes avec $P < 0.05$ (tableau XVIII).

Tableau XVIII: Analyse de la variance et le test de Tukey des (Ex.T) par Graph Pad 5

Analyse des tableaux	Données		
Analyse de la variance à sens unique			
Valeur p	<0,0001		
Les moyennes sont significativement différentes $p < 0.05$	oui		
Nombre de groupes	3		
F	2169		
R ²	0,9986		
Tableau d'Anova	Sommes des carrés	DDL	Carrés moyens
Traitement (entre les colonnes)	25660	2	12830
Residu (à l'intérieur des colonnes)	3548	6	5913
Total	25690	8	
Test de comparaison multiple de Tukey	MoyenneDiff	q	Significatif $p < 0, 05$
<i>AmphoB vs Colocynthis</i>	-30,75	21,90	oui
<i>AmphoB Inula</i>	-125,5	89,36	oui
<i>Colocynthis Inula</i>	-94,71	67,46	oui

Discussion

Les résultats de nos extraits, après 72 h d'incubation, une lecture au microscope optique inversé a révélé que les quatre plantes avaient une activité antileishmanienne. Cependant, après traitement au MTT et avant la solubilisation 02 extraits de plantes parmi les 04 à savoir : *Peganum harmala* et *Calotropis procera*, ont interféré avec le test MTT.

En effet, des études ont mis en évidence que des extraits de végétaux avaient la capacité d'interférer avec les tests employant des sels de tétrazolium tels que le MTT et XTT (Bruggisser et al. 2002 ; Wang et al. 2010).

Le test (MTT) est basé sur la réduction du MTT en cristaux de formazan par les cellules vivantes. Le pouvoir réducteur intracellulaire est principalement fourni par NADPH qui provient de l'activité de la déshydrogénase dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Bernas et Dobrucki. 2000) et (Stockert et al. 2012). L'une des causes possibles de l'interférence pourrait être dûe à des interactions chimiques entre les extraits et l'indicateur MTT (Chan et al., 2015).

Le test MTT a également été signalé comme étant significativement influencé par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire des mitochondries (Loveland et al., 1992) et (Ulukaya et al. 2008).

Les travaux réalisés par (Han et al., 2010) ont montré l'interaction directe entre les composants phénoliques et la réduction du MTT.

De nombreux composés polyphénoliques, dont la proanthocyanidine, la catéchine, la quercétine et le tanin peuvent réagir avec le MTT (Wisman et al., 2008).

Il semblerait que les tanins en grande quantité chez nos deux espèces étudiées seraient la raison de cette interférence. Cependant, d'autres travaux devraient être menés pour déterminer les composants phytochimiques responsables de l'interaction chimique.

En ce qui concerne l'activité antileishmanienne de ces extraits, des études antérieures sont en accord avec nos résultats et confirme nos observations au microscope inversé, où (Khoshzaban et al. 2014; Hooshyar et al., 2014) ont montré que les extraits de *Hedera helix* et *Peganum harmala* ont un effet antileishmanial puissant.

D'après (Mirzaie, et al ; 2007) *Peganum harmala* a des composés pharmacologiques actifs comprenant plusieurs alcaloïdes aux propriétés antiprotozoaires qui se trouvent surtout dans les graines et les racines et que l'extrait de *Peganum harmala* inhibe la croissance des formes promastigotes de *Leishmania major*.

(Mirzaei et al. 2007) ont montré que l'extrait de *Peganum harmala* contenait une grande quantité d'harmaline (alcaloïde) et donc très efficace contre les promastigotes de *Leishmania major*.

Une étude réalisée par (Barati et al., 2010) ont montré l'activité antileishmanienne de *Thymus vulgaris* et de *Peganum harmala* vis-à-vis de *Leishmania major*.

Rahimi-Moghaddam, et al., (2011) ont montré que l'extrait de *Peganum harmala* avait une activité antileishmanienne vis-à-vis de *Leishmania major*, cette activité est liée à la présence d'une concentration élevée d'Harmaline suivi d'Harmine en utilisant la méthode HPLC.

En plus de ces alcaloïdes, le fractionnement de l'extrait de graines de *P. harmala* a conduit à l'isolement et l'identification d'un alcaloïde nommé peganine. L'activité antileishmanienne in vitro de ce composé a été évaluée contre *L. donovani*. Les résultats indiquent que ce composé a pu induire l'apoptose du parasite par la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial des promastigotes extracellulaires et les amastigotes intracellulaires résidant dans les macrophages murins.

L'étude réalisée par (Rahimi-Moghaddam, et al.,2011) était de développer un traitement topique pour la leishmaniose cutanée. Cette étude a révélée une activité antileishmanienne efficace de l'extrait de graines de *Peganum harmala* in vitro et in vivo.

L'extrait a montré une activité cytotoxique in vitro modérée, comparée à l'amphotéricine B (1 µg/ml), avec IC50 = 59.4 µg/ml contre les promastigotes flagellés extracellulaires. De plus, les résultats de l'étude in vivo ont montré que la taille des lésions et le nombre de parasites ont diminué de façon spectaculaire, par rapport au placebo, après un traitement topique de 20 jours avec des pommades à 5% et 20% d'extrait de graines de *Peganum harmala*. L'arrêt du traitement n'a pas entraîné d'augmentation significative de la taille de la lésion ou du nombre de parasites pendant une période de 6 semaines.

Quant aux feuilles de *Calotropis procera*, connues pour leur activité insecticide sur *Anopheles gambiae* (Saotoing et al., 2014) et anti-appétant toxique pour *Schistocera gregaria* (Abbassi et al., 2004). *Calotropis procera* a des propriétés parasitaires. En effet, l'étude réalisée par (Al Nasr, 2020) a révélé que les extraits méthanoliques des feuilles de *Calotropis procera* avaient une activité antiparasitaire contre les deux stades promastigote et amastigote de *Leishmania major* in vitro.

Les travaux réalisés par (Oskuee et al. 2012) que *Calotropis gigantea* était actif contre les amastigotes de *Leishmania major*.

Une enquête ethnobotanique réalisée par (El Rhaffari et *al.*, 2002) au Maroc dans la région de Meknès-Tafilalt a révélé de nombreuses espèces de plantes appartenant à différentes familles botaniques, qui sont fréquemment utilisées par la population de cette région pour lutter contre la leishmaniose cutanée à savoir : *Pistacia atlantica*, *apium graveolens*, *Nerium oleander*, *Calotropis procera*, *Artemisia herba-alba*, *Launea arborescens*, *Anthemis stiparum*, *Inula viscosa*, *Lactuca virosa*, *Lipidium sativum* et *Colocynthis vulgaris*.

Dans notre étude *Colocynthis vulgaris* a exprimé un meilleur pouvoir leishmanicide vis-à-vis de *Leishmania major* par rapport à *Inula viscosa*. A notre connaissance, aucune étude n'a décrit jusqu'à présent l'activité antileishmanienne de ces deux extraits.

En effet, de nombreuses études ont montré que les composés phénoliques avaient une activité anti-leishmanienne puissante (Arias et *al.* 2012; Mohammadpour et *al.* 2012).

Les coumarines ont démontré leur capacité à inhiber les parasites par induction de l'apoptose d'une manière lisible dépendante de la dose. Tandis que certains flavonoïdes tels que les flavones, la flavonone, l'isoflavone et glucorhamnosyl-flavone ont pu arrêter la croissance de *Leishmania* en affectant les mécanismes de transport de cette souche (Inuo et *al.*, 1994).

Un mélange de saponosides isolés de *Maesa balansea*, une plante médicinale asiatique, a montré une activité significative sur des modèles de leishmanioses viscérales et cutanées accompagnée d'une certaine toxicité (Acebey, 2008).

A cet effet, l'activité antileishmanienne de nos extraits des plantes investiguées vis-à-vis de *Leishmania major* serait liée à la présence de composés phénoliques (coumarines, flavonoïdes et les tanins), de composés azotés (alcaloïdes) et de saponosides.

Pour des raisons sanitaires (mesures de confinement liées à la situation pandémique du pays (COVID 19) et les restrictions de déplacement imposées par les autorités nationales et internationales), nous n'avons pas été en mesure de mener, à bien et à terme, le travail de recherche concernant l'action de *Colocynthis vulgaris* et *Inula vulgaris* sur les cellules Raw 264.7 (test de cytotoxicité).

Conclusion générale et perspectives

Notre étude avait pour but d'identifier les plantes à effet leishmanicide et éviter celles qui sont toxiques pour l'homme.

La première étape de notre travail était l'extraction des métabolites secondaires par hydrodistillation des huiles essentielles suivi de l'identification de ces derniers à partir des plantes suivantes : *Artemisia campestris*, *Anethum graveolens*, *Ruta montana*, *Thymus pallescens* et *Thymus vulgaris* et un screening phytochimique par des tests colorimétriques des plantes suivantes : *Inula viscosa*, *Colocynthis vulgaris*, *Calatropis procera* et *Peganum harmala* suivi d'une extraction par macération à l'aide d'un solvant. Ces plantes ont été récoltées dans différentes wilaya d'Algérie où le choix s'est basé sur leur milieu peuplé par les deux rongeurs de la Leishmaniose cutanée d'une part et leurs informations ethnobotaniques d'autre part.

Ces analyses ont révélé une dominance de mono terpènes hydrocarbonés à savoir : α -Pinène, β -pinène et Limonène pour *Artemisia campestris*, d'un composé aromatique : la myristicine pour *Anethum graveolens*, de composés phénoliques : le Carvacrol pour *Thymus pallescens* et le thymol pour *Thymus vulgaris*. *Ruta montana* riche en cétones dont le composé majoritaire était le 2-Undécanone.

Quant à aux screening phytochimique, nous avons noté la présence de composés phénoliques à savoir les coumarines, les flavonoïdes et les tanins et de composés terpéniques : les glucosides et les saponosides dans nos extraits des plantes suivantes *Inula viscosa*, *Calatropis procera* et *Colocynthis vulgaris*. *Peganum harmala* réputée pour sa richesse en alcaloïdes.

La deuxième étape de cette étude à concerné l'activité antileishmanienne de ces plantes vis-à-vis de *Leishmania major*. Les résultats de cette activité des huiles essentielles, évaluée sur les formes promastigotes de *Leishmania major*, ont révélé que *Ruta montana* riche en cétones n'a présenté aucune activité et que les 02 *Thymus* ont présenté une activité antileishmanienne vis-à-vis de *Leishmania major* mais une toxicité en vers les cellules macrophagiques. Quant aux deux (HE) *Artemisia campestris* et *Anethum graveolens* ont présenté une activité leishmanicide vis-à-vis de *Leishmania major* avec une faible cytotoxicité envers les cellules macrophagiques Raw.264.7. Ces dernières pouvant être considérées comme une initiation à la

recherche de nouveaux traitements naturels afin de substituer les médicaments chimiques considérés comme onéreux et toxiques.

D'autres études sont nécessaires afin de :

- Révéler les composés bioactifs qui montrent plus d'activité antileishmanienne et moins de toxicité.
- D'approfondir les connaissances sur les interactions et la pharmacologie de ces composés.
- Etudier les mécanismes d'action des huiles essentielles.
- Envisager des hypothèses de protocoles thérapeutiques à partir des plantes étudiées à effet leishmanicide.

Quant aux résultats des extraits sur l'activité leishmanicide deux extraits parmi les 04 ont interféré avec le test MTT à savoir : *Peagnaum hamala* et *Calotropis procera*.

Un travail devrait être effectué pour déterminer les types de composés phytochimiques responsables de l'interaction avec le sel de tétrazolium.

Les deux extraits qui n'ont pas interféré à savoir : *Colocynthis vulgaris* et *Inula viscosa* ont présenté une activité leishmanicide, des perspectives peuvent être envisagées telles que :

- Des tests supplémentaires doivent être réalisés afin de déterminer le groupe de métabolites ayant une activité antileishmanienne.
- Des études chimiques plus approfondies en utilisant des techniques performantes telles que la HPLC pour élucider leur composition quantitativement et qualitativement et l'aspect moléculaire devra compléter cette étude.
- Réaliser les tests de cytotoxicité.

Bien que l'activité antileishmanienne soit conduite in vitro contre les formes promastigotes, une activité anti amastigotique est nécessaire car ce sont sous ces formes que les parasites résident dans les macrophages et propagent l'infection chez l'hôte. Puis une évaluation in vivo sur des animaux de laboratoire viendra confirmer ces premiers résultats biologiques.

Il serait souhaitable d'élargir les tests biologiques par des tests anti inflammatoires, des inhibiteurs d'enzyme, des anticoagulants ou autres pour compléter l'étude.

L'ensemble de ces résultats montrent que les plantes étudiées possèdent une vraie potentialité et une source riche de molécules bioactives. Elles peuvent non seulement constituer les prémices d'une nouvelle ère d'industrialisation pour un intérêt thérapeutique futur mais également un gain économique en valorisant le patrimoine végétal de notre pays.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbassi, K. Mergaoui, L. Atay-Kadiri, Z. Stambouli, A. Ghaout, S. 2003– Effets des extraits de *Peganum harmala* (*Zygophyllaceae*) sur le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*, Forsk.1775). *Zool. Baetica*. 13/14 : 203-2017p.

Abonnet, E. 1972- Les phlébotomes de la région éthiopienne (*Diptera : Phlebotomidae*). Mémoire de l'ORSTOM. 55. 289p.

Acebey, L., Jullian, V., Sauvain, M. 2008- Ethnopharmacologie et leishmanioses en Amérique latine. *Ethnopharmacologia*. 41 : 19.

Achour-Barchiche, N. et Madiou, M. 2009 - Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathol. Biol.* 57 : 65-70 p.

Adams, R.P. 2007 – Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4 th Ed. USA.

Affi, M. et Darwish, S. 1973 – Nitrogenous bases of different organ of *Citrullus colocynthis*. *Planta media*. 24(3) : 260-265p.

AFNOR. 2000 - Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1)
Monographies relatives aux huiles essentielles. (Tome 2.Volumes 1et 2).

AFSSAPS. 2008 - Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. 18p.

Ahmim, M. 2019 - Les mammifères sauvages d'Algérie. Répartition et biologie de la conservation. 289p.

Akrout, A. El-Jani, H. Amouri, S. Nefati, M. 2010- Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba-alba* Asso

et *Thymus capitatus* Hoff. El Link. Growing wild in the Southern of Tunisia. Recent. Research in Science and Technology. 2(1): 29-39p.

Ali Esmail Al-Snafi. 2015- The pharmacological importance of *Artemisia campestris*- A review. Asian J. Pharm. Res. Vol. 5. Issue 2: 88-92p.

Al Jahid, A. Elamrani, A. Lahlou, F-A. Hmimid, F. Bourhim, N. Belaghen, M. 2017- Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from the seeds of Moroccan *Artemisia campestris* L. Journal of Essential Oil Bearing plants. Vol: 20 – Issue 2. 375-384p.

Allal-Ikhlef, A-B. 2018 – Contribution à l'étude des phlébotomes dans un foyer à leishmanioses à Draa El Mizan (Kabylie, Algérie). Thèse. Doct. Univ. Oran. 159p.

Alloun, K. 2013 – Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.). Magister. ENSA. El- Harrach. 119p.

Al Nasr, I.S. 2020 - Evaluation of the in vitro antileishmanial activities of bioactive guided fractionations of two medicinal plants. Tropical Biomedicine 37(1): 15–23p.

Aloui, Z. Messaoud, C. Haoues, M. Neffati, N. Bassoumi Jamoussi, I. Essafi-Benkhadir, K. Boussaid, M. Guizani, I. Karoui, H. 2016 - *Asteraceae Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes. Hindawi Publishing Corporation ; Article ID 9147096: 15p.

Amirat, Z. Khammar, F. et Brudieux, R. 1975 – Variations pondérales saisonnières de l'appareil reproducteur, de la surrénale, et du rein chez le rat des sables (*Psammomys obesus*). Extrait du bulletin de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord. Tome 66 Fascicule 1 et 2: 31-60p.

Amro, A. Gashout, A. Al-Dwibe, H. Alam, M. Z. Annajar, B. Hamarsheh, O. Shubar, H. Schönian, G. 2012 – First molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Libya. Plos. Neg. Trop. Dis. 6 (6):1700.

Arias, A.R. Pandolfi, E. Vega, M.C. Rolon, M. 2012- Selected natural and synthetic phenolic compounds with antileishmanial activity: a five-year review. *Curr Bioact Compd* 8:307-333p.

Arruda, D.C. Miguel, D.C. Yokoyama-Yasunaka, J.K.U. Bortolin Uliana, S.R. 2009- Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 63(9):643-9.

Ashford, R.W. 2000- The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30. 1269-1281p.

Assadi, I. et Romdhane, M. 2014- Contribution à la valorisation de *l'Anethum graveolens*: Etude biologique et extraction des huiles essentielles. *Revue des Régions Arides*. N° 35. 104-113p.

Aulagnier, S. et Thevenot, M. 1986 – Catalogue des mammifères sauvages du Maroc. Travaux de l'Institut Scientifique. Série Zoologie. N° 41 : 163p.

Azizi, K. Shahidi-Hakak, F. Asgari, Q. Hatam, G. R. Fakoorziba, M.R. Miri, R. Moemenbellah-Fard, M.D. 2014 – In vitro efficacy of ethanolic extract of *Artemisia absinthium* (Asteraceae) against *Leishmania major* L. using cell sensitivity and flow cytometry assays. *J. Parasit. Dis.* DOI 10. 1007 / s 12639- 014-0569-5.

Bachi, F. 2006 – Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. La lettre de l'infectiologue – Tome XXI – n°1.

Bahlouli, S. 2015 – Apport thérapeutique de l'essence aromatique du thym (*Thymus vulgaris* L.) dans la lutte- prévention des pathologies fongiques et inflammatoire. Master. Univer. Blida 1. 52p.

Bahorun , T. 1997- Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research. Conseil Mauritus, Amas.

Bakkali, F. Averbeck, S. Averbeck, D. Idaomar, M. 2008- Biological effects of essential oils.- A review. Food. Chem. Toxicol. 46: 446-475p.

Barati, M. Sharifi, I. Shariffar, F. 2010 – In vitro evaluation of antileishmanial activities of *Zataria multiflora* Boiss, *Peganum harmala* and *Myrtus communis* by colorimetric assay. J Kerman Uni Med Sci. 17 (1): 32- 41 p.

Bejaoui, Y. Abderrabba, M. Ayadi, S. 2019- Biological Study from *Ruta* Plants Extracts Growing in Tunisia. Iran. J. Chem. Chem. Eng. Archive of SID. 38(2):85-89p.

Belazzoug, S. 1982 - Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). Bull. Soc. Pathol. Exot. 75 : 497-504p.

Belazzoug, S. 1983 - Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'Sila (Algérie), infestation naturelle de *Psammomys obesus* (rongeur, gerbillidae). Bull.Soc.Pathol Exot. 76 : 146-9.

Belazzoug, S. 1986 - Découverte d'un *Meriones shawi* (rongeur, gerbillidae) naturellement infesté par leishmania dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). Bull. Soc. Pathol. Exo. : 79 (5): 630-3.

Belazzoug, S. 1991- The sandflies of Algeria. Parasitology. 33 (1) : 85-7.

Belhadi, S. 2013- L'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits et des huiles essentielles de *Ruta Montana* L. de différentes régions (Batna, Blida et Bejaia) et influence des surfactants. Master 2 Sciences de la Nature. Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques. Université Saad Dahlab de Blida. 96p.

Belhattab, R. Boudjouref, M. Borroso, J-G. Pedro, L-P. Figueirido, A-C. 2011- Essential oil composition from *Artemisia campestris* grow in Algeria. Advances in Environmental Biology. 5 (2): 429-432p.

Benameur, Q. Gervasi, T. Pellizzeri, V. Pluchtova, M. Tali-Maama, H. Assaous, F. Guettou, B. Rahal, K. Grulova, D. Dugo, G. Marino, A. Ben-Mahdi, M.H. 2018 -

Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{ESBL} producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. Natural Product Research. 9p.

Benayache, S. Benayache, F. Dendoughi, H. Jay, M. 1991 – Les favomoïdes de *Inula viscosa* L. Plantes médicinales et phytothérapie. 25 (4) : 170-176p.

Benchabane, O. 2014- Chemical composition and insecticidal activities of essential oils of two Algerian endemic plants: *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. And *Thymus pallescens* de Noé. International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR). 4 (6): 185-192p.

Benkiki, N. 2006 – Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes: *Ruta Montana*, *Matricaria pubescens*, *Hypericum perforatum*. Thèse. Doct. Univ. El hadj Lakhdar- Batna. 198p.

Benyahia, A. 2014 – Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales: *Inula viscosa* et *Inula montana*. Master. Univ. Aboubekr Belkaid de Tlemcen. 75p.

Berchi, S. 1990 - Ecologie des phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) de l'Est algérien. Mem. Mag. Ent. Appl. Univ. Constantine, 116 p.

Berchi, S. 1993- Les phlébotomes (*Insecta, Diptera, Psychodidae*), vecteurs de leishmanioses dans l'Est Algérien. Bull. Soc. Zool. Fr. 118(3) : 341-349p.

Bernas, T. Dobrucki, JW. 2000- The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. Arch Biochem Biophys. 380: 108-116.

Boizot, N. et Charpentier, J.P. 2006- Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. 79-82p.

Boruga, O. Jianu, C. Misca, C. Golet, I. Gruaia, A. T. Horhat, F.G. 2014- *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. J.Med. Life. 7 (Spec Iss3) : 56-60 p.

Boudrissa, A. Cherif, K. Kherrachi, I. Benbetka, S. Bouiba, L. Boubidi, S.C. Benikhlef, R. Arrar, L. Hamrioui, B. Harrat, Z. 2012 – Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie. Bull. Soc. Pathol. Exot. 105 : 30-35p.

Bouguerra, N. Tine Djebbar, F. Soltani, N. 2017- Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. International Journal of Mosquito Research. 4(1): 37-42p.

Bouharb, H. El Badoui, K. Zair, T. El Amir, J. Chakir, S. Aloui, T. 2014- Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. J. App. Biosci. 6685-6693p.

Boumaza, D. 2011 – Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules : *Inula viscosa*, *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran. Magister. Université d'Oran. 78p.

Bouyahya, A. Et-Touys, A. Khouchlaa, A. El-Baaboua, A. Benjouad, A. Amzazi, S. Dakka, N. et Bakri, Y. 2018 - Notes ethnobotaniques et phytopharmacologiques sur *Inula viscosa*. Phytothérapie. Lavoisier. 263-268p.

Bruggisser, R. von Daeniken, K. Jundt, G. Schaffner, W. Tullberg-Reinert, H. 2002 - Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. Planta Med. 68(5):445-8p.

Bruneton, J. 1987 – Élément de phytochimie et pharmacognosie, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, 584p.

Bruneton, J. 1993- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2e édition, Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 915 p.

Bruneton, J. 1999 – Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. 227- 494p.

Cafarchia, C. De Laurentis, N. Milillo, M.A. Losacco, V. Puccini, V. 2002- Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia* 44: 153- 156 p.

Calixto-Junior, J.T. Maia de Morais, S. Gomez, C.V. Coronel-Molas, C. Rolon, M. Augusti-Boligon, A. Athayde, M.L. Datiane de Morais Oliveira, C. Tintino, S.R. Melo-Coutinho, H.D. 2016- Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from Brazilian northeast "Cerrado". *Saudi.J. Biol. Sci.* 23(3): 434-440p.

Chaa, C. 2018 - Efficacité de l'huile essentielle de *Thymus pallescens* de Noé contre *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* agent de la fusariose vasculaire de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et amélioration des propriétés chimiques et microbiologiques du sol. Master. Sciences de la Nature et de la Vie .Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi BBA. 84p.

Chaa, D. Haouas, N. Dedet, JP. Babba, H. Pralong, F. 2014- Leishmaniasis in Maghreb : An endemic neglected disease. Elsevier. *Acta Tropica*.132: 80-93p.

Chaibou, M. Bamba, A-N.M. Moussa, I. Tidjani Ilagouma, A. Khalid, I. 2020 - Etude bibliographique et phytochimique de quelques plantes médicinales utilisées pour le traitement de certaines maladies par les tradipraticiens de la zone de l'Azawagh au Niger. *European Scientific Journal*. 16(6): 126-151p.

Chalchat, J.C. et Cabassu, P. 2003- Composition of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Serbia. *J. Essent. Oil. Res.* 15: 251 -253p.

Chan, S.M. Khoo, K.S. Nam Weng Sit, N.W. 2015- Interactions between Plant Extracts and Cell Viability Indicators during Cytotoxicity Testing: Implications for Ethnopharmacological Studies *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* November. 14 (11): 1991-1998p.

Chaouch, N. et Dada Moussa, B. 2019- Screening phytochimique *Colocynthis vulgaris* (L) Schrader récolté à Oued N'SA (Région de Ouargla). *Algerian journal of arid environment*. 9 (1) : 71-79p.

Cherif, K. 2014 - Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le bassin du Hodna (M'Sila). Thèse Doct. Sciences. Univ. Ferhat Abbas-Setif 1 Fac. des Sciences de la Nat. et de la Vie. 197p.

Chikhoune, A. 2007- Huiles essentielles de Thym et d'Origan. Magister en Agronomie option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique El Harrach, Alger. 178p.

Cowan, M.M. 1999- Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12 (4) : 564-570 p.

Dahmane, T. 2010 – Contribution à l'étude de l'activité nématocide de quelques extraits de plantes contre *Meloidogyne incognita* (White et Kofoid, 1919) Chitwood 1949 (*Nematoda : Meloidoynidae*).

Daira, N. Maazi, M.C. Chefrou, A. 2016 - Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf.Briq.) de l'Est Algérien. *Bull. Soc. Roy. des Sciences de Liège*. Vol. 85 : 276 – 290p.

Dedet, J.P. Addadi, K. Belazzoug, S. 1984 – Phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) d'Algérie. *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* Vol : XXII, N°2 : 99-127p.

Dedet, J.P. 2001- Leishmanies, leishmanioses, biologie, clinique et thérapeutique. *Encycl. Méd. Chir* (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris) Maladies infectieuses. 8-506-A-10. 11p.

Dedet, J.P. 2009 – Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. Elsevier .Masson. *Mal. Infect.*8-506-A- 10. 3p.

de Lima, J.P.S., Pinheiro, M.L.B., Santos, A.M.G., Pereira, J.L.S., Santos, D.M.F., Silva-Jardim, I. and Costa, E.V. 2012- In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.* 4 (6): 692-702.

Demirci, F. Demirci, B. Ali, S.A. Shoudary, M.I. Baser, K.H.C. 1998- Bioassays on *Periplca graeca* L. (Silk Vine). *Acta Pharmaceutica Turcica* 40 :145-149p.

Derradji-Heffaf, F. 2013- Composition chimique et activité insecticide de trois extraits végétaux à l'égard de *Sitophilus oryzae* (L). (*Coleoptera : Curculionidae*). Magister. ENSA. El-Harrach. 92p.

Deschepper, R. 2017 - Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Doct. Pharm, Univ. Pharm.Marseille, 172p.

Djedioui, A. 2010- Evaluation de l'activité hypoglycémiant et anti- hyperglycémiant de l'extrait aqueux d' *Inula viscosa* ; une plante de l'Est Algérien chez le rat avec un diabète induit. Magister en biochimie, Université de Badji Mokhtar-Annaba. 111p.

Dohou, N. Yamni, K. Tahrouch, S. Idrissi- Hassani, L.M. Badoc, A. Gmira, N. 2003 – Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 142 : 61 – 78 p.

Douar-Latreche, 2012 – Composition chimique et activité antioxydante d'extraits du fenouil annuel (*Ammi Visnaga* Lamk.), du thé mexicain (*Chenopodium ambrosioides* L.) et d'une espèce de Thym (*Thymus pallescens* Noé). Magister. ENSA. El Harrach. 150p.

El Haib, A. 2011- Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse. Doct. Univ. Toulouse III. Paul Sabatier.195p.

El-Ouali Lalami, A. El-Akhal, F. Ouedrhiri, W. Ouazzani Chahdi, F. Guemmouh, R. Greche, H. 2013- Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis*. Les technologies de laboratoire. 8 (31) : 27-33p.

El Rhaffari, L. Hammani, K. Benlyas, M. Zaid, A. 2002- Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet. Biologie & Santé. 1 (4) : 10p.

Essid, R. Rahali, F.Z. Msaada, K. Sghair, I. Hammami, M. Bouratbine, A. Aoun, K. Limam, F. 2015- Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in northern Tunisia. Industrial Crops and products 77. 795-802p.

Estevez, Y. 2009 - Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse ; étude relation structure-activité. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III- Paul Sabatier. 77p.

Farias-Junior, P.A. Rios, M.C. Moura, T.A. Almeida, P.A. Alves, P.B. Blank, A.F. Fernandes, R.P.M. Scher, R. 2012 - Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biol. Res.* 45: 399- 402p.

Fellah, S. Romdhane, M. Abderraba, M. 2006- Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie J. Soc. Alger. Chim ; (16 (2) :193-202p.

Figueiredo, A.C. Borroso, J.G. Pedro, L.G. Salgueiro, L. Miguel, M.G. Faleiro, M.L. 2008 - Volatiles des espèces portugaises *Thymbra* et *Thymus*: composition chimique et activités biologiques. *Curr. Pharm. Des.* 14 (29) : 3120-40 p.

Figueredo, G. 2012 – Etude chimique et statistique de la composition d’huiles essentielles d’origans (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d’origine méditerranéenne. Thèse. Doct. Univ. Blaise Pascal (U.F.R Sciences et Technologie) 417p.

Frison, G. Favretto, D. Zancanaro, F. Fazzin, G. Ferrara, S.D. 2008 - A case of b-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic. Sci. Int.* 179: 37-43p.

Fylaktakidou, K.C. Hadjipavlou-Litina, D.J. Litinas, K.E. Nicolaidis, D.N. 2004 - Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.* 10 (30) :3813-33p.

Garnero, J. 1996- Techniques de l’ingénieur. Constantes physico-chimiques. Ed. Techniques de l’ingénieur, Paris. Vol.2 : 345p.

Garnotel, E. 2011- Epidémiologie et prophylaxie des leishmanioses (clinique, diagnostic, traitement). Cours d’épidémiologie. Inst.Pasteur.Paris.

Ghedira, K. 2005- Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* N°4 : 162- 169p.

Ghorab, H. Laggoune, S. Kabouche, A. Semra, Z. Kabouche, Z. 2013 - Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre*, 5 (2):189-192p.

Ginouves, M. Carne, B. Couppie, P. Prevot, G. 2014 – Comparaison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *J. Clin.Microbiol.* 52 : 2131 - 2138p.

Guignard, J.L. 2000- Biochimie végétale. 2^{ème} édition, Ed. Dunod, Paris. 274p.

Haddaf, Y. Kaloustian, J. Giordan, R.P. Cherfrouri, A. Abou, L. Mikail, C. Portugal, H. 2004 – Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie. 6^{ème} Symposium International d'Aromathérapie Scientifique et plantes médicinales. Grasse, France.

Han, M. Li, J.F. Tan, Q. Sun, Y.Y. Wang, Y .Y. 2010 – Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences.* 19 (3) : 195 -200 p.

Haouas, N. Chaker, E. Chargui, N. Gorcii, M. Belhadj, S. Kallel, K. Aoun, K. Messaadi-Akrout, F. Bensaid, M. Pratlong, F. Dedet, JP. Mezhoud, H. Lami, P. Zrib, M. Azaiez, R. Babba, H. 2012- Geographical distribution updating of Tunisian leishmaniasis foci: about the isoenzymatic analysis of 694 strains. *Act. Trop.* 124 : 221-228p.

Harrat, Z. Pratlong, F. Belazzoug, S. Dereure, J. Deniau, M. Rioux, J.A. Belkaid, M. et Dedet, J.P. 1996 – *Leishmania infantum* and *L.major* in Algeria. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.* 90 : 625-629p.

Harrat, Z. Boudrassa, A. Benhabyles, N. Hammadi, D. Belkaid, M. 2005 – Panorama des leishmanioses en Algérie. IX^{ème} journée Nationale de Parasitologie. Alger le 18 Mai 2005.

- Harrat, Z. Boubidi, S.C. Pratlong, F. Benikhlef, R. Selt, B. Dedet, J.P. Ravel, C. Belkaid, M.** 2009 – Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte and Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R. Soc. Trop.Med. Hyg.* 103 : 716-720p.
- Hatimi, S. Boudouma, M. Bichichi, M. Chaib, N. Idrissi, G.** 2000- Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Thérapeutique.* 3p.
- Hazzit, M. Baaliouamer, A.** 2009- Variation of essential oil yield and composition of *Thymus pallescens* de Noé from Algeria. *J. Essential Oil Res,* 21 (2): 162-165 p.
- Hojjati, M.** 2017- Chemical Constituents and Antibacterial Activity of Dill (*Anethum graveolens*) Essential Oil. *Proceedings of the 15th ASEAN Conference on Food Science and Technology.* 260-263p.
- Hooshyar, H. Talari, S. Feyzi, F.** 2014 - Therapeutic effect of *Hedera helix* alcoholic extract against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Balb/c mice. *Jundishapur J. Microbiol.* 7: e9432. 5p.
- Houti, L. Tabet-Aoul, M. Makhlouf, B. Achour, N. Kiel, T. Bouchenaki, N. Hassani, M.I.** 2012- Changement climatique et leishmaniose cutanée en Algérie : rôle des écosystèmes et gouvernance. *Projet de recherche mené par le Ministère de la santé (1/1/2008 au 31/12/2010).*
- Idrissi-Hassani, L.M. et El Hadek, M.** 1999 – Analyse de la composition de l'huile de *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*). *Acta. Bot. Gallica.* 146 (4) : 353-359p.
- Idrissi-Hassani, L.M. Ould Ahmedou, M.L. Mayad, E.H. Bouaichi, A.** 2002- Pouvoir insecticide de *Peganum harmala* sur *Schistocerca gregaria*: Effets de l'huile et des extraits de feuilles. *Biologie & Santé.* 2 (2) : 122- 133p.
- Inuoe, M. Suzuki, R. Koide, T. Sakaguchi, N. Ogihara, Y. Yabu, Y.** 1994 - Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204: 898.
- Izri, M.A. Belazzoug, S. Pratlong, F. Rioux, J.A.** 1992- Isolement de *Leishmania major*

chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie) fin d'une épopée écoépidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 67: n° 1, 31-32.

Izri, A. Belazzoug, S. 1993- *Phlebotomus (Laroussius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Ténes, Algéria. *Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87:399p.

Izri, A. Depaquit, J. Parola, P. 2006 – Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Médecine Tropicale.* 66 (5): 429- 435p.

Jerkovic, J. Mastelic, M. Milos, Juteau, F. Masotti, V. Viano, J. 2003 - Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour, Fragr. J.* 18: 436-440p.

Jianu, C. Misca, C. Pop, G. Rusu, L.C. Ardelean, L. Gruia, A.T. 2012- Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Dill (*Anethum graveolens* L.) Grown in Western Romania. *Rev. Chim. (Bucharest).* 63 (6):641-645p.

Kabouche, Z. Ghorab, H. Laggoune, S. Kabouche, A. Semra, Z. 2013 – Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algéria). *Der Pharmacia Lettre*, 5(2): 189 -192p.

Kambouche, N. Merah, B. Bellahouel, S. Bouayed, J. Dicko, A. Dicko, A. Derdour, AYounos, C. Soulimani, R. 2008 - Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food.* 11(3): 593-595p.

Karaman, S. Digrak, M. Ravid, U. Ilcim, A. 2001- Activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *Thymus revolutus* Celak de Turquie. *J. Ethnopharmacol* , 76 (2) : 183 -186p.

Khababae, K. et Van Ree, T. 2001- Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18 : 641-649p.

Khademvatan, S. Saki, J. Gharavi, M.J. Rahim, F. 2011- *Allium sativum* extract induces apoptosis in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) promastigotes . J. Med. Plant. Res. 3725-3732p.

Khaldi, A. 2017- Etude des effets antifongiques et antimucotoxiques des extraits des plantes médicinales dans la région de Béchar. Thèse de Doctorat. Faculté des sciences de la Nature et de la vie. Université Mustapha Stambouli Mascara. 175p.

Khoshzaban, F. Ghaffarifar, F. Koohsari, H.R.J. 2014 – *Peganum harmala* aqueous and ethanol extracts effects on lesions caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in BALB/C Mice. Jundishapur Journal of Microbiology. 7 (7): e 10992; 7p.

Killick Kendrick, R. 1990 - Phlebotomine vectors of leishmaniasis: Review. Med. Vet. Entomol., 4, 1-24.

Kowalski, K. et Rzebik-Kowalska, B. 1991- Mammals of Algeria. Polish Academy of Sciences. Institute of Systematics and evolution of Animals. 370 p.

Kurvin, V.A. 2003 - Phenylpropanoïds from medicinal plants : distribution, classification, structural analysis, and biological activity. Chem. Nat. compd. 39: 123- 153p.

Lawrence, B.M. 2000- Progress in essential oils- Perfumer and flavourist. 25 (5): 68-71p.

Leger, N. et Depaquit, J. 2002 – Systématique et biogéographie des phlébotomes (*Diptera* : *Psychodidae*). Ann. Soc. Entomol. Fr (n.s) 38(1-2): 163-175p.

Levine, N.D. Corliss, J.O. Cox, F.E.G. Deroux, G. Grain, J. Honigberg, B.M. Leedale, G.F. Loeblich, A.R. Lom, J. Lynn, D ; Merinfeld, E.G. Page, F.C. Poliansky, G. Spargue, V. Vavra, J et Wallace, F.G. 1980 - A Newly Revised Classification of the Protozoa* ; The committee on systematic and evolution of the society of protozoologists. . Protozool. 27(1): 37-58 p.

Li, X. Xing, Y. Jiang, Y. Ding, Y. et Li, W. 2009 - "Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens." *International Journal of Food Science & Technology*. 44(11) : 2161-2168p.

Loveland, B.E. Johns, T.G. Mackay, I.R. Vaillant, F. Wang, Z.X. Hertzog, P.J. 1992 - Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem Int.* 27(3): 501-510.

Maamri, S. 2008 - Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud Algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire. Magister. Université M'Hamed Bougara Boumerdes. Fac. Des Sciences. 139p.

Maatooq, G-T. El-Sharkawy, S-H. Afifi, M-S. Rosazza, P-N. 1997 – Hydroxybenzolglycoflavones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry*. 44 (1): 187-190p.

Mahmoudvand, H. Sharififar, F. Sezavar- Rahmal, M. Tavakoli, R. 2014- Evaluation of antileishmanial activity and cytotoxicity of the extracts of *Brebis vulgaris* and *Nigella sativa* against *Leishmania tropica*. *Journal of vector borne diseases*. 51 (4): 294 – 299p.

Mathlouthi, A. Belkessam, M. Sdiri, M. Djouani, M.F. Souli, A El-Bok, S. 2018 - Chemical Composition and Anti-*Leishmania major* Activity of Essential Oils from *Artemisia spp.* Grown in Central Tunisia. *Journal of Essential oil bearing plants*, 21: 1186-1198p.

Meerloo, J.V. Kaspers, G.J.L. Cloos, J. 2011- Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* 731(10): 237–245p.

Mihoubi, I. De Monbrison, F. Romeuf, N. Moulahem, T. Picot, S. 2006 – Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algérie). *Médecine Tropicale*. 66 (1): 39- 44p.

Mirzaei, M. Nostratabadi, S.J. Derakhshanfar, A. Sharifi, I. 2007- Anti leishmanial activity of *Peganum harmala* extract on the in vitro growth of *Leishmania major* promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. *Veterinarski. Arhiv*.77(4):365-375p.

Mohammadpour, G. Marzony, E.T. Farahmand, M. 2012- Evaluation of the anti-leishmaniamajor activity of *Satureja bakhtiarica* essential oil in vitro. Nat Prod Commun 7:133-136 p.

Mohammedi, Z. 2013 – Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud-Ouest de l’Algérie. Thèse. Doct. Biologie. Univ .Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 170p.

Monzote, L., Piñón, A., Setzer, W.N. 2014- Antileishmanial potential of tropical rainforest plant extracts. Medicines. 1: 32–55.

Mosmann, T. 1983- Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 16;65(1-2):55-63p.

Muniz, M.N. 2006 – Synthèse d’alcaloïdes biologiquement actifs: la (+) anatoxine –a et la (+/-) camptothécine : thèse de Doctorat en chimie. Univ. Joseph. Fournier. Grenoble. 117p.

Nikiema-Wendpagnagde, P.R. 2005 – Propriétés pharmacochimiques de *Calotropis procera* Ait (Asclepiadaceae) récolte au Mali : Etude préclinique des effets anti- inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines. Thèse. Doct. Univer. de Bamako. Mali. 162p.

Nostratabadji, S.J. Sharifi, I. Sharififar, F. Bamorovat, M. Daneshvar, H. Mirzaie, M. 2015- In vitro antileishmanial activity of methanolic and aqueous extracts of *Eucalyptus camaldulensis* against *Leishmania major*. J. Parasit. Did. 39 (1):18-21p.

Oskuee, R. Jafari, M. Farzad, S.A. Ramezani M. 2012- In vitro Leishmanicidal activity of *Calotropis gigantea* and its fractions against *Leishmania major*. J Med Plants Res 6:3977-83p.

Osório, E. Arangoa, G.J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M.A., Giménez, A. and Robledo, S. 2007- Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.* 111: 630-635.

Petter, F. 1961.- Répartition géographique et écologique des rongeurs désertiques (du Sahara occidental à l'Iran oriental). *Mammalia*, 25, numéro spécial, 222 p.

Pharmacopée Européenne. 2010 – 7^{ème} édition. Strasbourg ; Conseil de l'Europe.

Phillipson, J.D. et Wright, C.W. 1991- Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Med.* 57. S53.

Pina-Vaz, C. Goncalves-Rodrigues, A. Pinto, E. Costa-de-Oliveira, S. Salqueiro, L. Cavaleiro, C. Gonçalves, M.J. Martinez-de Oliveira, J. 2004 - Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 18(1):73-8p.

Pratlong, F. Dereure, J. Ravel, C. Lami, P. Balard, Y. Serres, G. Lanotte, G. Rioux, J.A. Dedet, J.P. 2009 – Geographical distribution and epidemiological features of old world cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop. Med. Inter. Heal.* 14 (9): 1071- 1085p.

Prudhomme, J. 2015- Phlébotomes et écosystème: impact des facteurs biotiques et abiotiques sur la structure génétique et phénotypique des populations. Thèse. Doct. Université de Montpellier. 258p.

Psotová, J. Kolár, M. Soušek, J. Svagera, Z. Vicar, J. Ulrichová, J. 2003- Biological Activities of *Prunella vulgaris* Extract. *Phytotherapy Reserarch* . 17 : 1082–1087p.

Rahimi-Moghaddam, P. Ebrahimi, S.A. Ourmazdi, H. Selseleh, M. Karjalian, M. Haj-Hassani, G. Alimohammadian, M.H. Mahmoudian, Shafiei, M. 2011- In vitro and in vivo activities of *Peganum harmala* extract against *Leishmania major*. *J. Res. Med. Sci.* 16(8): 1032-1039p.

Ramli, B. 2013- Extraction des flavonoïdes de la plante *Inula viscosa* de la région d'Oran et mise en évidence de l'activité microbienne. Magister en chimie, Université d'Oran. 86p.

Ramli, I. 2013- Etude in vitro de l'activité antileishmanienne de certaines plantes médicinales locales : cas de la famille des *Lamiacées*. Mémoire. Magister. Université Constantine 1. Fac. Sciences de la nature et de la vie. 128p.

Rana, V.S. Blazquez, M.A. 2014- Chemical composition of the essential oil of *Anethum graveolens* Aerial Parts. Journal of essential oil Bearing plants. 17 (6): 1219-1223p.

Rasooli, I. et Mirmostafa, S.A. 2003 - Sensibilité bactérienne aux huiles essentielles de *Thymus kotschyanus* et de *Thymus persicus* et composition chimique de celles-ci. J. Agric. Food Chem, 51(8) : 2200 - 2205p.

Rezaei, R. Hazrati Tappeh, K. Seyyedi, S. Mikaili, P. 2017 – The anti-leishmanial efficacy of *Artemisia dracuncululus* ethanolic extract in vitro and its effects on IFN- γ and IL-4. Iran J. Parasitol. 12 (3): 398 - 407p.

Rhajaoui, M. Nasereddin, A. Fellah, H. Azmi, K. Amarir, F. Al-Jawbreh, A. Ereqat, S. Planer, J. AbdeenB, Z. 2007- New clinico- epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis Morocco. Emerg. Infect. Dis. 13. 1358-1360p.

Rhajoui, M. 2011- Les leishmanioses humaines au Maroc: Une diversité nosogéographique. Elsevier. Pathol.biol. 59 : 226-229p.

Rioux, J.A. Lanotte, G. Petter, F. Dereure, J. Akalay, O. Pratlong, F. Velez, I.D. Fikri, N.B. Maazoun, R. Denial, M. Jarry, D.M. Zahaf ,A. Ashford, R.W. Cad-Soussi ,M. Killick-Kendrick, R. Benmansour, N. Kennou, M.F. Rispail, P. Knechtli,R. Serres, E. 1986a – Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique. L'exemple de trois « foyers », tunisien, marocain et français. Application éco-épidémiologiques. (Coll.int. CNRS/INSERM, 1984). IMEEE, Montpellier. 365-395p.

Rioux, J.A. Petter, F. Zahaf, A. Lanotte, G. Houin, G. Jarry, D. Perieres, J. Martini, A. Sarhani, S. 1986- Isolement de *Leishmania major* (Yakimoff et Schokhor, 1914) *kinetoplastida-trypanosomatidae* chez *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842) (*Rodentia-Gerbillidae*) en Tunisie. Ann. Parasitol. Hum. Comp., Ed: Masson. 61(2) : 139-145 p.

Rodrigues, V. Cabral, C. Evora, L. Ferreire, I. Cavaleira, C. Cruz, M.T. Salagueiro, L. 2015 - Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Thymus zygis* L. subsp. *Sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout. essential oil and its main compounds. Arabian journal of chemistry. 8p.

Roomiani, L. Soltani, M. Akhondzadeh- Basti, A. Mahmoodi, A. Taheri- Mirghaed, A. Yadollahi, F. 2013- Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12 (3) 702-716.

Rota, M.C. Herrera, A. Martinez, R.M. Sotomayor, J.A. Jordan, M.J. 2008 - Activité antimicrobienne et composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, de *Thymus zygis* et de *Thymus hyemalis*. Food Control. 19 (7): 681 – 687p.

Sahraoui, N. Abchich, H. Mellal, M. 2016- Optimisation par plan d'expériences de l'extraction de l'huile essentielle du (*Thymus pallescens*). International Journal of Scientific Research and Engineering Technology (IJSET). 85- 93p.

Saihi, R. 2011- Etude phytochimique, extraction des produits actifs de la plante *Artemisia campestris* de la region de Djelfa. Mise en évidence de l'activité biologique. Magister. Univ. Oran. 83p.

Santangelo, C. Vari, R. Scazzocchio, B. Di Benedetto, R. Filesi, C. Masella, R. 2007- Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. Annali Dell Istituto Superiore di Sanita, 43: 394-405p.

Saotoing, P. Tchuenguem, F-N.F. Dawe, A. Ngatarang, C. 2014 – Evaluation de l'effet insecticide de l'extrait acétonique des feuilles séchées de *Calotropis procera* Ait (*Asclepiadaceae*) chez les adultes de *Anopheles gambiae*, Maroua (Cameroun). Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(4): 1438-1444p.

Shemshadi, B. Ranjbar-Bahadory, S. Ahmadi, S. 2015 - Effect of *Caparis spinosa* root extract on promastigotes and amastigotes of *Leishmania major*. Journal of Paramedical Sciences (JPS) Vol.6, N°1 ISSN 2008-4978.

Stockert, JC. Blázquez-Castro, A. Cañete, M. Horobin, RW. Villanueva, A. 2012- MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem. 114(8): 785-796.

Tahrouch, S. Rapior, S. Monoloto-Cosson, L. Irissi-Hassani, L-A. Bessiere, J-M. Andary, C. 2002 - *Peganum harmala* : source combinée d'aromes et de colorants. Reviews in biology and biotechnology by the Moroccan society of biology in Canada. 2 (2): 33-37p.

Tapiero, H. Tew, K.D. Nguyen, B.G. Mathé, G. 2002- Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? Biomed.pharmacother. 56: 200-207p.

Telphon, T. 2005- ABC des huiles essentielles. Ed. Grancher, Canada, 398p.

Thériault, M. 2004 - Etude des propriétés antioxydantes et antimutagènes de composés phénoliques issus de l'Erable. Mémoire Maître es Sciences en Microbiologie Appliquée. INRS- Institut- Armand Frappier. 115p.

Touil, S. et Benrebiha, F-Z. 2014- Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* L de la région aride de Djelfa. AgroBiologia. 40-45p.

Traore, P. 2009- Etude de l'activité antioxydante et de la toxicité de quatre (04) plantes : *Calotropis procera* (Ait.) Ait (*Asclepiadacées*) ; *Centaurea perrottetii* (Dc) (*Asteracées*) ; *Euphorbia sudanica* A Chev. (*Euphorbiacées*) ; *Hyptis suaveolens* Poit. (*Lamiacées*). Thèse. Docteur en pharmacie. Univ. Bamako. 112p.

Ulukaya E., Ozdikicioglu F., Oral A. Y., & Demirci M. 2008 - The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. Toxicol.In Vitro 22: 232-239p.

Vale-Silva, L.A. Goncalves, M.J. Cavaleiro, C. Salgueiro, L. Pinto, E. 2010 - Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species . *Planta Med.* 76 : 882–888p.

Wabwoba, B. Anjili, C.O. Ngeiywa, M. Ngure, P.K. Kigundu, E.M. Ingonga, J. Makwail, J. 2010 - Experimental chemotherapy with *Allium sativum* (*Liliaceae*) methanolic extract in rodents infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani*. *J. Vector. Borne. Dis.* 47 : 160-167p.

Wang, P. Henning, S.M. and Heber, D. 2010 - Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4), e10202.

Weninger, B., Robledo, S., Arango, G.J., Deharo, E., Arango, R., Munoz, V., Callapa, J., Lobstein, A. and Anton, R. 2001- Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J.Ethnopharmacol.* 78 : 193–200.

Wisman, K.N. Perkins, A.A. Jeffers, M.D. Hagerman, A.E. 2008- Accurate assessment of the bioactivities of redox-active polyphenolics in cell culture, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7831-7837.

Zellagui, A. Belkassam, A. Belaidi, A. Gherraf, N. 2012- Environmental impact on the chemical composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta montana* (Clus) L. and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in Environmental Biology.* 6(10): 2684-2688p.

Annexes

ANNEXE 1 : Caractéristiques des plantes étudiées

1-*Artemisia campestris* (Linné.1753)



Photo : (H. Maleysson)

Artemisia campestris L.

Famille: Asteraceae

Genre: *Artemisia*

Espèce: *Artemisia campestris* (L. 1753)

Nom français : Armoise champêtre, Armoise rouge.

Nom Arabe : Dgouft, Alala.

Description botanique : *Artemisia campestris* est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. Cette plante possède des capitules très petits, étroits ovoïdes ou coniques, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles sont glabres de couleur vert- foncée, les tiges sont ligneuses à la base striée.

Répartition géographique : Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen. En Algérie, l'armoise rouge est très fréquente en zones semi-arides et arides.

Utilisation de la plante. La partie aérienne est utilisée dans le traitement des brûlures, des morsures de serpents, des piqûres de scorpions, l'eczéma, le rhumatisme. Elle est également utilisée pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux.

Artemisia campestris possède des activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques et répulsives contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*.

Composition chimique : Riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins. Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes et des saponines.

2- *Anethum graveolens* (Linné. 1753)



Photo : (wikimedia)

Anethum graveolens L

Famille : Apiaceae

Genre : *Anethum*

Espèce : *Anethum graveolens* (L. 1753)

Nom français : Fenouil batârd

Nom arabe : Habate hlawa, El bessbess béri

Description botanique : Plante herbacée annuelle, érigée pouvant atteindre 1.5 m de haut, glabre vert- foncé et légèrement striée de bleu au niveau supérieur à racine pivotante. Les tiges sont grêles, lisses, finement striées de bandes blanches et vertes. Les feuilles sont alternées de couleur bleu-vert. L'inflorescence est formée d'ombelles composées et plates pouvant atteindre jusqu'à 20 cm de diamètre. Les fleurs sont de très petites de taille, radiale, chacune composée de 05 sépales à limbe non développé, de 05 pétales jaunes à pointes recourbées vers l'intérieur, de 05 étamines saillantes et de 02 stylets courts. Le fruit est un diakène comprimé au niveau de la face dorsale. A maturité, les deux méricarpes se détachent l'un de l'autre.

Répartition géographique : L'Aneth est originaire du bassin méditerranéen, aimant les climats chauds. Il pousse au bord des terrains, aimant les sols secs et rocailleux. Il est rencontré dans toute l'Algérie septentrionale.

Utilisation de la plante : L'Aneth est un stomachique digestif, apéritif, antispasmodique, diurétique et anti-inflammatoire.

Composition chimique : L'huile essentielle de l'aneth se compose au moins de 10 composés aromatiques différents, le carvone, limonene et α -phellandrene constituent approximativement 90% de tous les composés.

3- *Ruta montana* (Linné., 1756)



Photo : (wikimedia)

Ruta Montana L.

Famille : Rutaceae

Genre : *Ruta*

Espèce : *Ruta montana* (L., 1756)

Nom français : Rue de montagne

Nom arabe : Fidjel

Description botanique : c'est un sous-arbrisseau vivace de 30 à 60 cm de hauteur à tige rameuse dans sa partie supérieure, semi-ligneux. Les feuilles, glauques finement découpées en segments linéaires, lancéolées ou souvent très allongées, enroulées en dessous par leur bord, leurs faces supérieures sont couvertes de pustules sécrétant une essence extrêmement malodorante. Les fleurs, petites de 4 à 5 mm, de couleur jaune, les pétales concaves, denticulés sur les marges, le calice persistant.

A maturité, le fruit est une capsule globuleuse, s'ouvrant en deux valves et laissant apparaître une graine globuleuse, noire et brillante.

Répartition géographique : La Rue pousse spontanément dans les rochers, les lieux arides, vieux murs, collines sèches et elle est abondante dans les terrains calcaires des régions méditerranéennes. En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur jusqu'à l'Atlas Saharien.

Utilisation de la plante : Elle est considérée comme une des plantes qui présente le plus de vertus médicamenteuses : stimulantes antiseptiques, antirhumatismales, antispasmodiques, calme les douleurs ainsi que les troubles d'origine nerveuse.

Les feuilles à petites doses sont vermifuges. Elles ont aussi des vertus toniques et stimulantes. L'essence de la Rue est utilisée en parfumerie, en pharmacie, dans la préparation des arômes.

Composition chimique : Des travaux antérieurs ont montré la richesse des rutacées en cétones dans l'huile essentielle extraite à partir des feuilles et des tiges.

4- *Thymus pallescens* (Noë ,1849)



Photo :(Rebbas, 2022)

Thymus pallescens Nöe.

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus pallescens* (Noë ,1849)

Nom français : Thym

Nom Arabe : Zaaitra ou Zaather

Description botanique : Le thym est un petit sous arbrisseau érigé ou prostré et odorant, il forme des touffes compactes très ramifiées de 10 à 30 cm. Ses tiges sont ramifiées tortueuses et ligneuses peu touffues et où les rameaux dressés sont grisâtres et compactes. Les feuilles du thym sont sessiles, petites et étroites de forme lancéolée de couleur verte- blanchâtre par-dessous. Les fleurs rosées à violet ont un calice bossu à poils durs et une corolle à deux lèvres et 04 étamines saillantes. Les fruits sont tétrakènes bruns et glabres.

Répartition géographique : C'est une plante très répandue dans le nord africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Lybie) ainsi que dans les montagnes d'Arabie du sud ouest. Elle pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues.

Utilisation de la plante : Le thym est l'un des meilleurs remèdes contre les affections dues au refroidissement (grippe, rhum de cerveau, courbatures, angines....), les maladies infectieuses et les parasites intestinaux (ascaris, oxyures, ankylostomes, tænia).

Composition chimique : L'huile essentielle de *Thymus pallescens* est caractérisée par la dominance d'un composé phénolique (le carvacrol) suivi d'hydrocarbures monoterpéniques.

5- *Thymus vulgaris* (Linné.1753)



Photo : (Futura planète)

Thymus vulgaris L.

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris* (L.1753)

Nom français : Thym vulgaire, Thym des jardins, Thym commun

Nom Arabe : Zaatar

Description botanique: *Thymus vulgaris* est une plante aromatique originaire du bassin méditerranéen, se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau de 10-30 cm, d'un vert-blanchâtre ou grisâtre, de type vivace et touffu, à tiges quadrangulaires et ligneuses et à feuilles sessiles. Ces dernières sont assez petites de forme lancéolée et de couleur gris-vert. Sa fleur est petite de 4 à 6 mm et se regroupe en épis foliacés visible, de juin à octobre, avec une teinte rosacée. La floraison a lieu de mai à juillet.

Répartition géographique : Le thym commun est originaire des pays méditerranéens. On le trouve surtout sur les sols calcaires secs. C'est une plante très répandue dans le nord africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye).

Utilisation de la plantes : La plante soulage un large panel de pathologies respiratoires. L'efficacité antibactérienne du thym a été prouvée dans la lutte contre *Helicobacter pylori*.

Composition chimique : Les constituants majeurs de l'huile essentielle sont les polyphénols (carvacrol et thymol).

6- *Inula viscosa* L. (Aiton, 1753)



Photo : (wikimedia)

Inula viscosa L. Aiton

Famille : Asteraceae

Genre : *Inula*

Espèce : *Inula viscosa* L.(Aiton, 1753)

Nom français : *Inule visqueuse*

Nom Arabe : Magramen

Description botanique : Elle apparaît sous forme de buissons hauts de 0.5 à 1 m, ligneuse dans sa partie inférieure. Les feuilles sont ondulées, dentées, aiguës, rudes recouvertes sur les deux faces de glandes visqueuses qui dégagent pendant la phase végétative une odeur forte et âcre. Les inflorescences sont de longues grappes fournies de capitules jaunes. Les fleurs périphériques sont liguliformes, celles du centre sont tubulaires. Les fruits sont des akènes velus à aigrette grisâtre.

Répartition géographique : Répandue dans tout le bassin méditerranéen, sur les sols salés, les prairies humides et les bords de cours d'eau, largement répandue en Algérie dans les rocailles et les terrains argileux.

Utilisation de la plante : L'Inule est connue pour ses vertus médicinales variées telles que : antipyrétique, antiseptique, anthelminthique, expectorant, diurétique ainsi pour les douleurs de rhumatisme. Au niveau de l'appareil respiratoire, elle agit comme sédatif de la toux et des spasmes bronchiques c'est un antiseptique de l'arbre respiratoire.

Composition chimique : Cette plante est riche en métabolites secondaires tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les composés terpénoïdes.

7- *Calotropis procera* (Aiton) W. T. (Aiton, 1811)



Photo : (wikimedia)



Photo : (wikimedia)

Calotropis procera (Aiton)

Famille : Asclepiadaceae

Genre : *Calotropis*

Espèce : *Calotropis procera* (Aiton) W. T. (Aiton, 1811)

Nom français : Pommier de Sodome, Arbre à soie,

Nom arabe : Kranka, Torha, Torcha

Description botanique : Le pommier de sodome est un petit arbre de 2 à 4 mètres avec de grandes feuilles presque sessiles opposées, entières, d'un vert- glauque, ovales et coriaces, couvertes de poils fins lorsqu'elles sont jeunes. Les inflorescences denses sont formées de nombreuses fleurs qui s'épanouissent surtout pendant la saison sèche. Celles-ci, portées par un long pédoncule, présentent une corolle large, étalée, de 2 à 3 cm, formée de 5 pétales blancs à violet-pourpre marquées d'une pointe violacée au sommet.

Le fruit, qui dépasse 10 cm de diamètre, est un gros follicule, verdâtre, ovoïde, riche en filaments soyeux, ce qui justifie l'appellation d'« arbre à soie ».

Les graines sont aplaties et surmontées d'une aigrette blanche ; l'écorce du tronc est entourée d'un liège épais, craquelé de façon particulière, de couleur beige.

Répartition géographique : *Calotropis procera* est un arbuste xérophyte, il se développe en Asie et en Afrique tropicale. Espèce commune dans le Sahara central et méridional, en Afrique orientale, en Libye et en Egypte. Au Maroc, on le rencontre dans l'Anti-Atlas, et dans l'extrême Sud du Maroc, il occupe les lits des Oueds et les palmeraies. En Algérie, il est répandu au sud-ouest dans les zones sèches sur sols sableux.

Utilisation de la plante : Elle possède de nombreuses propriétés: anthelminthiques, antisyphilitiques et purgatives. Elle est connue pour son action antibactérienne, antifongique, analgésique et traite la lèpre et les callosités.

Elle est également signalée comme anticoagulante, hépatoprotectrice, anti-tumorale, antipyrétique et anti-inflammatoire. La plante est nématocide et molluscicide, elle est aussi utilisée comme insecticide. Elle est très toxique pour les mammifères.

Composition chimique : Les feuilles et les tiges de cette espèce renferment de la calotropine et de la calotropagénine. Le latex renferme calotropine, uscharine et calotoxine. *C. procera*, contient également des résinols et de la gigantine.

8- *Colocynthis vulgaris* (Schard,1833).



Photo :(Sellami, 2015)

Colocynthis vulgaris Schard.

Famille : Cucurbitaceae

Genre : *Colocynthis*

Espèce : *Colocynthis vulgaris* (Schard,1833).

Nom français : Coloquinte

Nom Arabe : Handal , Hadag, Hadja.

Description botanique : *Colocynthis vulgaris* ou bien *Citrullus colocynthis* est une plante vivace à longues tiges anguleuses, rampantes qui s'étalent sur le sol et pouvant dépasser 1 m de long. Les feuilles sont profondément découpées de longueur 5 à 10 cm, ont un limbe découpé en 5 à 7 lobes séparés par des sinus larges, le lobe central est parfois ovale.

Pendant la période de floraison, vers le mois d'avril-mai, il apparaît des fleurs composées de cinq pétales jaunes claires. Le fruit sphérique de 5 à 10 cm de diamètre, ressemblant à une petite pastèque, de couleur verte panaché de jaune clair, devient complètement jaune à maturité. La chair légère, spongieuse, de couleur jaune-orangé, est très amère et toxique. Les nombreuses graines ovoïdes et aplaties, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre, sont comestibles.

Répartition géographique : Cette espèce se trouve en Arabie, en Syrie et en Egypte, ainsi que dans les étendues arides et sablonneuses du nord-ouest, du centre et du sud de l'Inde. Elle est aussi cultivée dans certaines régions de l'Espagne et de Chypre.

La coloquinte est commune dans tout le Sahara, au niveau des terrains sablonneux et sablo-argileux des lits d'oued et des dépressions. On trouve dans l'ancien Monde. Elle serait originaire des régions désertiques sablonneuses d'Afrique.

Utilisation de la plante : Les feuilles et les fruits sont utilisés en infusion, en cataplasme, en pommade et en compresse pour les traitements des piqures de scorpion, des indigestions, des dermatoses et des infections génitales. Elle est utilisée aussi comme antirhumatismal, antihelminthique et comme remède contre les infections de la peau. Les racines ont des propriétés purgatives et sont utilisées contre la jaunisse, les rhumatismes et les maladies urinaires.

Composition chimique : La coloquinte est riche en alcaloïdes présents dans tous les organes de la plante au niveau des fruits, graines, feuilles et racines. Sa composition est proche de celle de l'huile de tournesol. Ces graines sont également connues par leur teneur relativement élevée en protéines.

9- *Peganum harmala* (Linné. 1753)



Photo : (wikimedia)

Peganum harmala L.

Famille : Zygophyllaceae

Genre : *Peganum*

Espèce : *Peganum harmala* (L. 1753)

Nom français : Rue sauvage, Rue verte

Nom arabe : Harmel

Description botanique : plante herbacée vivace atteignant jusqu'à 90 cm de haut, à feuilles allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines. Elle présente des fleurs d'un blanc-jaunâtre veinées de vert. Le fruit est une grande capsule de la grosseur d'un pois, de forme sphérique entouré par un calice persistant comprenant plusieurs graines nombreuses, petites, anguleuses, sub triangulaires, de couleur marron foncé dont le tégument externe est réticulé et renferme un pigment rouge.

Répartition géographique : Elle pousse en Europe-ausrale et austro-orientale, Asie mineure, Tibet, Iran, Turkestan, Syrie, Arabie, Egypte et en Afrique du Nord. En Algérie, *Peganum harmala* L. est commune de la zone littorale, les plaines littorales, l'Atlas tellien et les hauts plateaux de l'Oranie, de l'Atlas saharien de l'Algérois, dans les hauts plateaux de l'Atlas saharien du constantinois (Aurès) et au nord du Sahara. Elle est réputée pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations.

Utilisation de la plante : Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter différents troubles digestifs, cutanés et infectieux. Elle possède des propriétés anti inflammatoire, anti oxydante, anti microbienne, analgésique, anti tumorale, vasodilatatrice, antispasmodique,

antidépresseur et surtout des effets hallucinogènes. Cette plante possède également une activité anti-protazoaire notamment contre la leishmaniose, la theileriose méditerranéenne et tropicale, le paludisme, ainsi qu'un pouvoir insecticide sur *Schistocerca gregaria* et nématocide contre *Meloidogyne ssp.*, nématodes à galles.

Composition chimique : Cette plante est réputée pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes particulièrement dans les graines et racines. Ces alcaloïdes sont de type β-carbolines (Harmaline ou harmidine, Harmine ou banistéline, Harmalol, et Harmane), et des dérivés quinazolines (vasicine, peganine et vasicinone). *Peganum harmala* contient des acides aminés (valine, proline, thréonine, histidine, acide glutamique, l'aniline, N-phénylformamide, et N-acétylaniline phénylalanine), des carbohydrates, des flavonoïdes, des coumarines, des bases volatiles, des tanins, des stérols, et des triterpènes.

ANNEXE 2 : Composition du milieu NNN

1- Préparation de la gélose

5g de gélose

3g de NaCl

500 ml d'eau distillée

- Verser le NaCl dans de l'eau distillée, rajouter la gélose lorsque l'eau salée frémit.
- Remuer sans arrêt avec une baguette en verre jusqu'à dissolution complète.
- Distribuer dans des tubes stériles (environ 8 ml).
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn.

2- Ponction cardiaque du lapin

- Prélever stérilement à la seringue du sang par ponction cardiaque.
- Distribuer le sang dans des flacons contenant du citrate de sodium à 10% stérile, ajouter 250000 UI de pénicilline.
- Agiter le tout et conserver à +4°C.

3- Mélange gélose et sang

- Sortir du réfrigérateur les tubes de gélose.
- Les flacons de sang sont maintenus deux heures à température ambiante.
- Liquéfier la gélose, puis la ramener à 45°C.
- Rajouter 1 ml de sang par tube et mélanger par mouvement circulaire en évitant la formation de bulles d'air.
- Laisser refroidir les tubes en position inclinée.
- Conservation à +4°C.

Publications

- **Annexe 3 : (Doctorat)**

Benelmouffok Amina-Bouchra, Bouabid Cyrine, Guizani-Tabbane Lamia et Sellami Mahdi. 2021- Activité antileishmanienne et composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes médicinales algériennes. *Revue Agrobiologia* (2021) **11**(2): 2734-2743.

- **Annexe 4 : (Magister)** Suite à une enquête épidémiologique de la leishmaniose cutanée en Algérie, le sujet de thèse a été proposé.

Benelmouffok A.B., Sellami M., Boughoufalah A. 2017- Bilan quadriennal (2008-2011) de la leishmaniose cutanée en Algérie. *Medecine et Santé Tropicales* 2017 ; 27 : 310-314.

ACTIVITÉ ANTILEISHMANIENNE ET COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES DE PLANTES MEDICINALES ALGÉRIENNES

BENELMOUFFOK Amina-Bouchra^{1*}, BOUABID Cyrine^{2,3}, GUIZANI-TABBANE Lamia^{2,3} et SELAMI Mahdi¹

1. Département de Zoologie Agricole et Forestière - Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) 16200 El Harrach Alger-Algérie.

2. Département de Parasitologie Médicale, Biotechnologie et Biomolécules - Institut Pasteur de Tunis. Place Pasteur 1002 Belvédère, Tunis – Tunisie.

3. Université de Tunis El Manar. Tunisie.

Reçu le 21/05/2021, Révisé le 11/10/2021, Accepté le 27/11/2021

Résumé

Description du sujet : Recherche d'espèces végétales endémiques antileishmaniennes.

Objectifs : Evaluer l'activité antileishmanienne et cytotoxique de cinq huiles essentielles (HEs) extraites de plantes médicinales d'Algérie.

Méthodes : L'extraction des HEs a été réalisée par hydro-distillation, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'activité antileishmanienne et cytotoxique des HEs ont été réalisées *in vitro* par le test colorimétrique MTT.

Résultats : Les HEs de *Thymus palleescens* avec 59,15% de carvacrol et de *Thymus vulgaris* avec 56,80% de thymol ont montré une activité contre les promastigotes de *Leishmania major* mais une cytotoxicité contre les cellules macrophagiques Raw 264,7. L'HE d'*Artemisia campestris* riche en monoterpènes hydrocarbonés et l'HE d'*Anethum graveolens* renfermant 23,86% de myristicine ont montré une bonne activité contre *Leishmania major* avec respectivement une CI50 de 14,02±0,18 µg/ml et 13,83±0,30 µg/ml. Elles ont exprimées une faible cytotoxicité avec des CC50 de 183±0,18 µg/ml et CC50 de 158,1±0,22 µg/ml et des indices de sélectivité (IS) de 13,05 et 11,43 respectivement.

Conclusion : *Artemisia campestris* et *Anethum graveolens* peuvent être considérées comme une initiation aux traitements naturels des leishmanioses. *Anethum graveolens* mérite plus d'attention puisque c'est la première mention de l'activité antileishmanienne que nous rapportons.

Mots clés: Activité antileishmanienne ; Cytotoxicité ; Plantes médicinales ; Huiles essentielles ; Algérie.

ANTILEISHMANIAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM ALGERIAN MEDICINAL PLANTS

Abstract

Description of the subject: Research of endemic antileishmanial plant species.

Objective : Evaluate the antileishmanial and cytotoxic activity of five essential oils (EOs) extracted from Algerian medicinal plants.

Methods : The extraction of the EOs was performed out by hydro-distillation and then analyzed by gas chromatography - mass spectrometry (GC/MS). The antileishmanial and cytotoxic activities of the EOs were performed *in vitro* by the MTT.

Results : The EO of *Thymus palleescens* with 59.15 % of carvacrol and *Thymus vulgaris* with 56.80% of thymol showed activity against the promastigotes of *Leishmania major* but a cytotoxicity against macrophages cells Raw 264.7. The EO of *Artemisia campestris* rich in monoterpenes hydrocarbons and EO of *Anethum graveolens* with 23.86% of myristicin showed a good activity against *Leishmania major* with respectively IC50 of 14.02±0.18 µg/ml and 13,83±0,30 µg/ml and also a low cytotoxicity with CC50 of 183±0,18 µg/ml and 158.1±0.22 µg/ml and selectivity indices (SI) of 13.05 and 11.43 respectively.

Conclusion : *Artemisia campestris* and *Anethum graveolens* can be considered as potential candidates for naturel treatments. *Anethum graveolens* deserves more attention since it is the first mention of antileishmanial activity that we report.

Keywords : Antileishmanial activity; Cytotoxicity; Medicinal plant; Essentials oils; Algeria.

* Auteur correspondant: BENELMOUFFOK Amina-Bouchra, E-mail : aminabenelmouffok@yahoo.fr

INTRODUCTION

Les leishmanioses représentent un véritable problème de santé publique en Algérie et occupent la première place des maladies parasitaires à déclaration obligatoire [1]. Deux formes cliniques sévissent à l'état endémique : La leishmaniose viscérale (LV) et la leishmaniose cutanée (LC).

La (LC), plus fréquente et plus extensive que la (LV) est représentée par trois entités cliniques et trois parasites différents. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) du sud à *Leishmania major* inféodé aux régions steppique et saharienne [2 et 3], la leishmaniose cutanée chronique à *Leishmania killicki* proche de *Leishmania tropica* limité pour le moment à Ghardaïa au sud du pays [4] et La leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) à *Leishmania infantum* dans la région du Tell [2 et 3].

Longtemps confinée au Sahara, la (LCZ) à *Leishmania major* connaît une extension géographique en dehors des foyers naturels de la maladie ceux de Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest vers les Hauts Plateaux avec une survenue d'épidémie, en 1982 à M'sila [5] suivie d'une autre en 1985 à Ksar Chellala (Tiaret) [6]. Ces dernières années, la barrière géographique formée par l'Atlas tellien, qui séparait la forme cutanée du nord et la forme cutanée du sud a été franchie avec une avancée rapide de cette dernière vers le nord du pays [7]. Le réservoir de la (LCZ) est représenté essentiellement par deux rongeurs gerbillidés. Le premier étant *Psammomys obesus* (le Rat des sables), [8 et 9] et le second *Meriones shawi* (la Merione de Shaw) [6 et 10]. Dans ces régions cohabitent le principal vecteur *Phlebotomus papatasi* [11 et 12].

Selon l'Institut National de la Santé Publique (INSP) le taux d'incidence de la (LC) a augmenté, il est passé de 11,62 en 2014 à 28,19 en 2017 cas pour 100.000 habitants. Cette recrudescence et la propagation de la maladie à de nouveaux foyers font de la leishmaniose cutanée un problème épineux. Malgré cette alerte, la lutte contre cette maladie n'a jamais réussi à établir une stratégie efficace et durable. Celle adoptée par le comité technique national mis en place en 2006 par le Ministère de la Santé Publique et la Réforme Hospitalière (MSPRH), repose essentiellement sur la lutte anti-vectorielle par des aspersions intra domiciliaires et extra domiciliaires d'insecticides rémanents avec pour objectifs de réduire de 50% l'incidence annuelle.

Malheureusement, celle ci continue d'augmenter et s'explique par l'absence d'action ciblant efficacement le réservoir du parasite. Cependant, *Psammomys obesus* est une espèce protégée dans notre pays (Loi du 20 août 1983) et le deuxième réservoir est péri domestique représenté par *Meriones shawi* est l'une des espèces arvicoles les plus dévastatrices en Algérie, elle cause d'importants dégâts dans nos parcelles agricoles notamment sur céréales. Une campagne de lutte est décrétée tous les ans par l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) à partir du mois d'octobre à fin mars, correspondant à la période de disette du rongeur qui se pratique uniquement au niveau des zones agricoles, ce qui ne permettra guère l'éradication définitive de ce fléau, notamment avec le développement de l'agriculture steppique. L'absence d'une stratégie adéquate de lutte dans les zones non agricoles permet à ces mammifères d'envahir de nouveaux espaces et d'élargir leur zone de reproduction.

En général, le traitement des leishmanioses est dominé, par les dérivés antimoniés pentavalents qui demeurent encore de nos jours les médicaments de première intention dans plusieurs pays endémiques [3]. La toxicité et le coût élevé des médicaments antileishmaniens habituels ainsi que l'émergence grandissante des souches parasitaires résistantes ont fait que la recherche d'espèces végétales endémiques antileishmaniennes efficaces et peu toxiques continue de s'imposer.

L'Algérie par sa position géographique présente une grande diversité végétale, les chances de trouver des plantes actives contre cette maladie sont importantes. Cette richesse végétale est due à une grande variété de biotopes liée à des différences d'altitude ainsi qu'à des facteurs climatiques.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité antileishmanienne de cinq huiles essentielles (HEs) extraites de la partie aérienne de diverses plantes médicinales sur des cultures promastigotes de *Leishmania major* et leur effet cytotoxique sur les cellules macrophagiques Raw 264.7.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Nous avons utilisé cinq plantes médicinales récoltées dans les régions steppiques d'Algérie, milieux peuplés par les deux réservoirs de la leishmaniose cutanée.

Leur identification a été réalisée à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) El-Harrach-Alger. Les parties aériennes de ces plantes ont été retenues en raison de leurs

informations ethnobotaniques (Tableau 1). Les feuilles et les tiges récoltées ont été séchées pendant 20 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à l'extraction.

Tableau 1: Les plantes étudiées et leurs propriétés médicinales

Familles	Noms des plantes	Lieu de récolte (wilaya)	Propriétés médicinales
<i>Asteraceae</i>	<i>Artemisia campestris</i>	M'Sila	Antioxydantes, antifongiques, antibactériennes
<i>Apiaceae</i>	<i>Anethum graveolens</i>	Tablat	Antispasmodiques, anti inflammatoire
<i>Rutaceae</i>	<i>Ruta montana</i>	Tablat	Anti rhumatismale, vermifuge
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus palleescens</i>	SourEl Ghozlane	Maladies infectieuses, parasites intestinales
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Bouira	Maladies respiratoires

1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs a été réalisée par hydro distillation dans un appareil de type « Clevenger » selon la Pharmacopée Européenne [13]. 100g de matière végétale a été hydro distillée dans 01 litre d'eau pendant 03 heures. L'huile obtenue a été transférée dans des flacons en verre ambré et conservée à 4°C jusqu'aux analyses.

1.2. Analyse des huiles essentielles

Les HEs ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) (système informatisé Hewlett-Packard, comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A), équipé d'une colonne capillaire en silice fondue HP5MS™ (30 m × 0,25 mm de diamètre interne ; épaisseur de film de 0,25 µm). Les spectres CG-MS ont été obtenus dans les conditions suivantes : gaz porteur, hélium ; débit, 0,5 ml/min ; mode, fractionné (50:1) ; volume d'injection, 1 µL ; température d'injection, 250°C ; programme de température du four, 60°C pendant 8 min, puis augmentation à 2°C/min jusqu'à 250°C et maintien à 250°C pendant 15 min ; mode d'ionisation, impact électronique à 70 eV. Les pourcentages des composants ont été calculés à partir des surfaces des pics CG/FID. L'indice de rétention (IR) de tous les composants a été déterminé par la méthode de Kovats par co-injection des échantillons avec une solution contenant la série homologue de n- alcanes (C8-C28) sur la colonne HP 5MS™. L'identification a été faite en comparant les indices de rétention et les spectres de masse avec les données publiées dans la littérature [14] et en faisant correspondre leurs spectres de masse enregistrés avec des spectres de référence dans la bibliothèque de l'ordinateur [National Institute of Standards and Technology (NIST) et les bibliothèques Wiley].

2. Matériel biologique

Nous avons utilisé des promastigotes de *Leishmania major* fournis par l'Institut Pasteur de Tunis : PGLC 94 pour l'activité antileishmanienne et une lignée cellulaire de macrophages murins Raw 264.7 pour le test de cytotoxicité

2.1. Activité antileishmanienne des huiles essentielles

La viabilité de *Leishmania major* a été évaluée à l'aide du test colorimétrique au bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium (MTT) basé sur la réduction du sel de tétrazolium en cristaux de formazan par les déshydrogénases mitochondriales [15].

Les promastigotes de *Leishmania major* ont été cultivés dans les conditions suivantes (26°C et 5% de CO₂) dans un milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA), supplémenté avec 100 U/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA) et enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco). Les promastigotes ont été répartis dans des plaques de 96 puits à une densité cellulaire de 2,10⁶ parasites par puits et incubés à 26°C pendant 72h en présence d'HE solubilisées dans RPMI+DMSO (Sigma-Aldrich, USA) 0,05 % [16] à des concentrations de ½ allant de (100µg/ml à 0,78µg/ml).

L'amphotéricine B (Sigma- Aldrich, USA) a été utilisée comme contrôle positif à des concentrations allant de (07,8 µg/ml à 0,06 µg/ml) et les parasites non traités (RPMI+DMSO 0,05%) ont été considérés comme contrôle négatif. Après 72h d'incubation à 26°C des plaques de culture cellulaire, 10 µl de MTT (Sigma Aldrich, USA) à une concentration finale de 0,5 mg/ml ont été ajoutés par puits et l'incubation a été poursuivie dans l'obscurité pendant 4h supplémentaires. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100µl d'une solution d'isopropanol acidifiée [15].

La lecture a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Synergy HT, Bio-Tek) où les densités optiques (DO) sont lues à 540 nm, ce qui permet de calculer le pourcentage (%) d'inhibition avec l'équation suivante : % d'inhibition = [(DO contrôle négatif-DO échantillon) / DO contrôle négatif] × 100 [15].

En utilisant le programme Graph Pad Prism 5, une étude statistique a été réalisée en utilisant l'analyse de régression non linéaire dose-réponse, la concentration d'inhibition qui inhibe 50% de la population cellulaire (CI50) a été déterminée. Selon Osório *et al.* et de Lima *et al.* [17 et 18] les composés ont été classés comme suit : CI50 < 10 µg/ml très actif ; 10 µg/ml < CI50 > 50 µg/ml actif ; 50 µg/ml < CI50 > 100 µg/ml modérément actif et CI50 > 100 µg/ml non actif.

2.2. Test de cytotoxicité et indice de sélectivité

La cytotoxicité des HES a été évaluée à l'aide de la lignée cellulaire de macrophages Raw 264.7, maintenues en culture dans du RPMI-1640, supplémenté de 2 mM de L-glutamine et d'antibiotique : 100 U/ml de streptomycine (Sigma), enrichi de 10% de sérum veau fœtal (SVF). La viabilité cellulaire a été évaluée après incubation avec du bleu trypan à 0,1% en comptant les cellules colorées au microscope optique.

Les macrophages ont été répartis dans des plaques de 96 puits à une densité cellulaire de $2 \cdot 10^4$ cellules par puits, on les a laissés adhérer pendant une nuit à 37°C et 5% de CO₂ ; puis remplacé le milieu par un frais contenant 100 µl de dilution en série d'HE allant de (100 µg/ml à 0,78 µg/ml). L'amphotéricine B a été utilisée comme contrôle positif et les cellules non traitées ont été considérées comme contrôle négatif. Les cellules ont été incubées pendant 72h à 37°C et leur viabilité a été estimée par le test MTT dont l'expression des résultats a été décrite précédemment [15], ainsi la concentration cytotoxique de 50% (CC50) a été déterminée. L'indice de sélectivité (IS) est un paramètre définissant l'équilibre entre la cytotoxicité et l'activité biologique du composé (huile) correspondant à la concentration active la plus élevée sans toxicité et exprimé par le rapport CC50 macrophages/ CI50 parasites [19]. Pour une valeur de (IS) supérieure à 10, l'huile est considérée comme efficace contre les parasites et sans danger pour les macrophages [20 et 21].

3. Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± Erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs des concentrations d'inhibition à 50% (CI50) et des concentrations cytotoxiques à 50 % (CC50) pour chaque HE ont été déterminées par une analyse de régression non linéaire en utilisant le logiciel (Graph Pad Prism 5 San Diego USA). Le test de Tukey (Graph Pad Prism5) pour de multiples comparaisons et permet de distinguer les groupes avec un niveau de confiance de 95%. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p \leq 0,05$.

RÉSULTATS

1. Composition chimique des huiles essentielles (HES)

La composition chimique de nos HES est représentée dans le (Tableau 2) dont les composants ont été classés selon leurs indices de rétention (IR). La composition chimique de nos HES a été caractérisée par la présence de deux à trois composants majoritaires à des concentrations assez élevées par rapport aux autres composants présents en faibles quantité. En effet, cette composition est dominée par des monoterpènes hydrocarbonés (23,54%) de β -pinène, (16,35%) de α -pinène et (11,23%) de limonène pour *Artemisia campestris*, d'un composé aromatique dérivé du phénylpropane (23,86%) de la myristicine pour *Anethum graveolens*, de cétones (77,60%) de 2-undecanone pour *Ruta montana* et de composés phénoliques (59,15%) de carvacrol et (56,80%) de thymol pour les *Thymus*.

2. Activité antileishmanienne

L'activité antileishmanienne des huiles essentielles a été évaluée sur les promastigotes de *Leishmania major* et comparée à celle de l'amphotéricine B médicament de référence en utilisant le dosage colorimétrique du méthylthiazole tétrazolium (MTT) est un composé organique coloré en jaune, il est réduit uniquement dans les cellules métaboliquement actives (vivantes) par des déshydrogénases mitochondriales, en un composé violet, insoluble : le formazan. Cette modification chimique s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption. Ceci permet une mesure spectrophotométrique du formazan et de sa quantification. Après 72h d'incubation, une observation des plaques de culture cellulaire au microscopique optique inversé afin d'évaluer l'état des parasites dans chaque condition.

Puis les traiter au MTT. Après solubilisation (dissoudre les cristaux de formazan) (Fig. 1), une lecture par spectrophotométrie à une longueur

d'onde égale à 540 nm nous a permis de calculer le pourcentage d'inhibition à 72 h et de tracer les graphes (Fig. 2).

Tableau 2 : Composition chimique en pourcentage (%) des HES par hydrodistillation

composants	IR ^a	IR ^b	A.c	IR ^b	A.g	IR ^b	R.m	IR ^b	T.p	IR ^b	T.v
α-Thujene	930	931	3,17	-	-	-	-	924	0,9	-	-
α-Pinene	939	939	16,35	941	8,7	938	0,1	943	1,98	940	2,16
Camphene	954	-	-	947	2,28	-	-	955	0,83	-	-
Sabinene	975	-	-	969	1,2	-	-	-	-	-	-
β-Pinene	979	975	23,54	974	11,2	-	-	977	0,78	980	0,19
Myrcene	990	982	8,7	-	-	-	-	982	3,2	-	-
α-Phellandrene	1002	-	-	997	14,8	1005	0,23	-	-	-	-
ρ-Cymene	1024	-	-	1025	4,25	-	-	1019	10,6	1022	15,50
o-Cymene	1026	1025	3,65	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1029	1031	11,23	1032	13,3	1021	0,57	1028	0,2	1036	1,25
γ-Terpinene	1059	1050	4,35	1054	9,02	1060	0,23	1057	4,3	1054	8,76
Terpinolene	1088	-	-	-	-	-	-	1083	0,54	-	-
Fenchone	1086	-	-	1089	0,1	-	-	-	-	-	-
Linalool	1096	1090	0,23	1098	3,2	-	-	1092	0,87	1096	4,15
2-Nonanol	1098	-	-	-	-	1096	1,2	-	-	-	-
Trans- Pinocarveol	1139	1137	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans- Sabinol	1142	-	-	1139	0,6	-	-	-	-	-	-
Camphor	1146	-	-	1141	1,4	-	-	1153	0,1	-	-
Citronellal	1153	-	-	-	-	-	-	-	-	1151	1,25
Terpinen-4-ol	1177	1175	2,78	-	-	-	-	-	-	1174	1,17
α- Terpineol	1188	1183	2,04	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanone	1192	-	-	-	-	1189	12,89	-	-	-	-
Myrtenal	1195	1192	2,26	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanol	1199	-	-	-	-	1201	0,83	-	-	-	-
Thymol	1290	1286	0,17	1290	0,2	-	-	1309	12,43	1288	56,80
2-Undecanone	1294	-	-	-	-	1291	77,60	-	-	-	-
Carvacrol	1299	1295	3,2	1299	0,4	-	-	1315	59,15	1301	3,07
2-Undecanol	1301	-	-	-	-	1305	0,41	-	-	-	-
Citraldimethoxy (E)	1341	-	-	-	-	-	-	-	-	1339	0,82
Carvacryl Acetate	1367	-	-	-	-	-	-	1368	0,97	-	-
α-Gurjunene	1409	1402	1,29	-	-	-	-	1406	0,3	-	-
(E)-Caryophyllene	1419	-	-	1411	0,1	-	-	1424	0,25	1416	1,5
Aromadendrene	1441	-	-	-	-	-	-	1445	0,14	1439	0,29
α-Humulene	1454	-	-	1448	-	-	-	-	-	1452	0,14
α-Patchoulene	1456	1454	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-
Farnesene (E)- β	1456	1461	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-
Curcumene	1472	1476	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Selinene	1490	1488	3,02	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Tridecanone	1496	-	-	-	-	1491	0,80	-	-	-	-
γ-Cardinene	1513	-	-	-	-	-	-	-	-	1509	0,11
Myristicine	1518	-	-	1514	23,86	1533	0,32	-	-	-	-
δ-Cardinene	1523	-	-	1530	0,1	-	-	1531	0,13	1528	0,16
Elemicine	1557	-	-	1551	1,2	1560	0,10	-	-	-	-
Spathulenol	1578	1572	2,87	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpènes hydrogénés			70,99		64,75		1,13		23,33		27,86
Monoterpènes oxygénés			11,98		5,90		92,93		73,52		67,26
Sesquiterpènes hydrogénés			5,51		24,06		1,12		0,82		2,2
Sesquiterpènes oxygénés			2,87		1,2		0,10		-		-
Total (%)			91,35		95,91		95,28		97,67		97,32

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams , IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM , A.c : *Artemisia campestris*, A.g : *Anethum graveolens*, R.m : *Ruta montana*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*

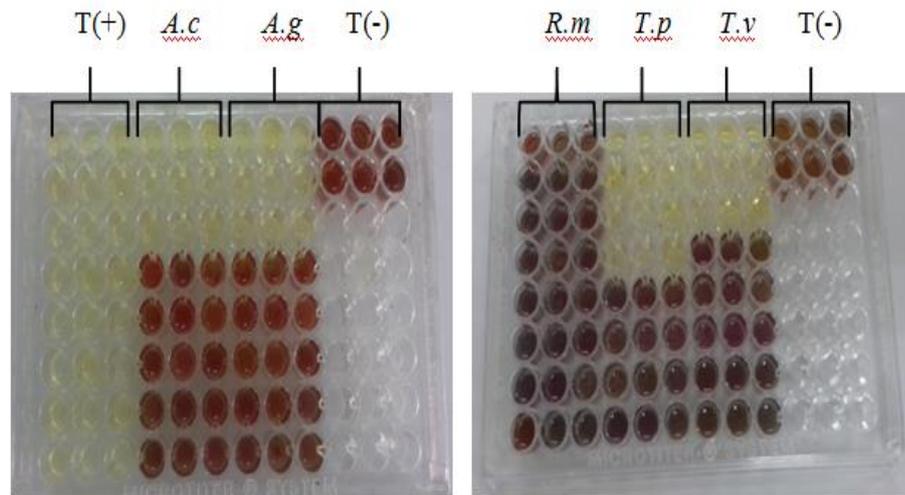


Figure 1: Résultats du test MTT sur plaque
 T(+):Témoin positif (Amphotéricine B), A.c :*Artemisia campestris*, A.g :*Anethum graveolens*,
 R.m : *Ruta montana*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*, T(-) : Témoin négatif

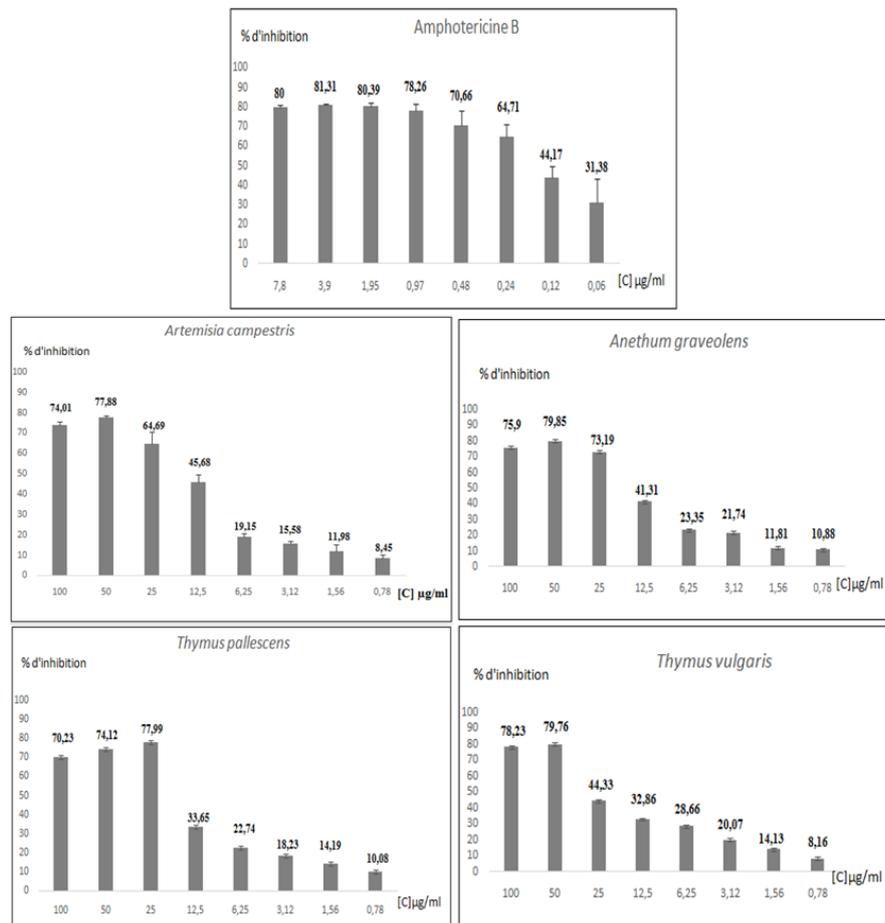


Figure 2 : Pourcentage d'inhibition des promastigotes vis-vis des différentes concentrations

Un premier criblage sur des cultures de *Leishmania major* nous a permis d'identifier quatre espèces végétales à activité antileishmanienne à l'exception de *Ruta montana*. La concentration de (50µg/ml) à enregistrée les taux les plus élevés d'inhibition de promastigotes avec (77,88%) pour *Artemisia campestris*, (79,85%) pour *Anethum graveolens*

et (79,76%) pour *Thymus vulgaris*. Par contre, *Thymus pallescens* a enregistré un taux de (77,99%) pour une concentration de (25µg/ml). Les résultats obtenus ont été analysés par le test de régression non linéaire dose-réponse à l'aide du programme GraphPad Prism 5. La CI₅₀ est déterminée (Fig. 3).

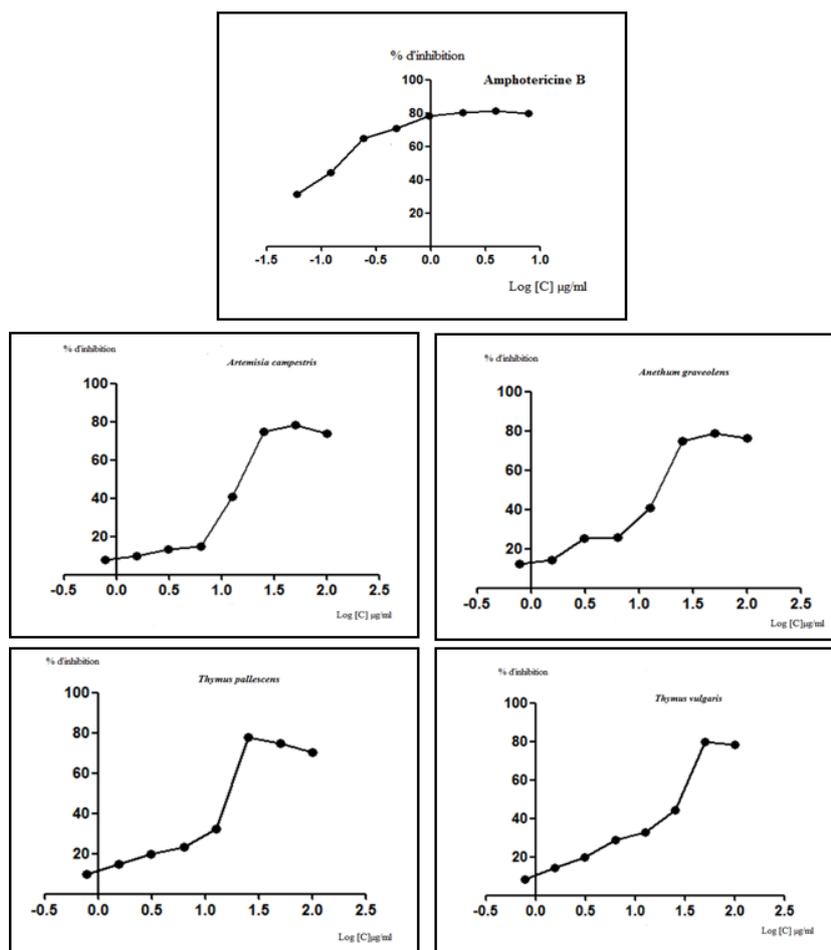


Figure 3 : Pourcentage d’inhibition des promastigotes en fonction du Log des différentes concentrations

Nos HES ont présenté une activité leishmanicide inférieure à celle de l’amphotéricine B (produit pur). Les HES de *Thymus pallescens*, *Anethum graveolens* et *Artemisia campestris* ont exprimé un meilleur pouvoir antiparasitaire contre *Leishmania major* par

rapport à *Thymus vulgaris*. Le test de Tukey a révélé que les CI50 de ces trois HES n’étaient pas significativement différentes entre elles $p > 0,05$ (Tableau 3).

Tableau 3 : Activité antileishmanienne *in vitro* sur les promastigotes de *Leishmania major*

Plantes étudiées	CI50±SEM Promastigotes	CI50	Classement
<i>Artemisia campestris</i>	14,02 ^a ±0,18	10 <CI> 50	Active
<i>Anethum graveolens</i>	13,83 ^a ±0,30	10 <CI> 50	Active
<i>Ruta montana</i>	-	>100	Non active
<i>Thymus pallescens</i>	13,72 ^a ±0,20	10 <CI> 50	Active
<i>Thymus vulgaris</i>	31,60 ^b ±0,50	10 <CI> 50	Active
Amphotéricine B	0,061 ^b ±0,01	< 10	Très actif

CI50: Concentration d’inhibition à 50%, Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif), Les lettres (a et b) indiquent les différences significatives selon le test de Tukey , a : $p > 0,05$ et b : $p < 0,05$

3- Test de cytotoxicité et indice de sélectivité

Le test de cytotoxicité des huiles essentielles a été évalué sur les cellules macrophagiques (Raw 264.7) et comparées à l’amphotéricine B pour évaluer leur utilité comme produits bioactifs à effet leishmanicide. Il ressort de cette activité, après 72h d’incubation et traitement des plaques au MTT (Fig. 4) puis une lecture par

spectrophotométrie que les *Thymus* sont toxiques sur les macrophages Raw 264.7 dont les IS sont inférieurs à 10 et que les huiles d’*Artemisia campestris* et d’*Anethum graveolens* ont montré une faible cytotoxicité sans danger pour les macrophages. Le test de Tukey a révélé une différence significative entre les moyennes des CC50 $p < 0,05$ (Tableau 4).

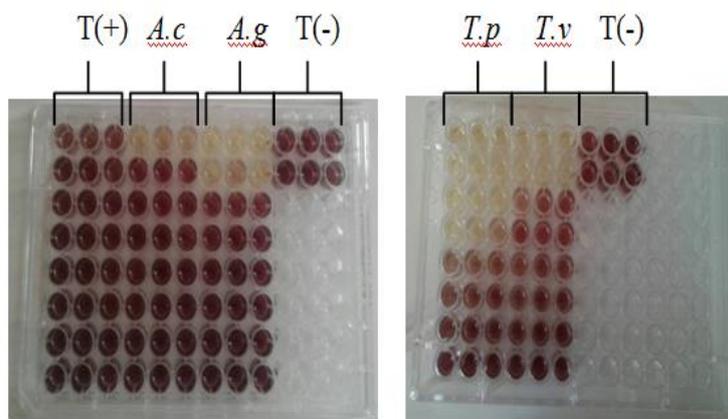


Figure 4: Résultats du test MTT sur plaque

T(+):Témoin positif (Amphotéricine B), A.c :*Artemisia campestris*, A.g :*Anethum graveolens*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*, T(-) : Témoin négatif

Tableau 4: Activité cytotoxique sur les cellules Raw264.7 et indice de sélectivité.

Plantes étudiées	CC50±SEM	CC50/CI50
	Macrophages	Indice de sélectivité
<i>Artemisia campestris</i>	183 ^a ±0,18	13,05
<i>Anethum graveolens</i>	158,1 ^a ±0,22	11,43
<i>Thymus pallescens</i>	5,024 ^a ±0,49	0,36
<i>Thymus vulgaris</i>	23,79 ^a ±0,26	0,75
Amphotéricine B	2,2 ^a ±0,26	36,06

CC50: Concentration cytotoxique à 50%, c Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif). la lettre (a) indique la différence significative avec le test de Tukey p<0,05.

DISCUSSION

Les compositions chimiques de ses huiles avaient été étudiées par de nombreux chercheurs algériens [22- 29] où les résultats sont assez proches avec quelques variations des composants et de leurs teneurs dans l'huile essentielle. D'ailleurs, il est connu que la composition chimique d'une huile essentielle dépend des facteurs environnementaux, du patrimoine génétique et du stade de développement de la plante [30].

L'activité antileishmanienne de nos huiles essentielles a révélé que *Ruta montana* riche en cétones dont le composé majoritaire est le 2-undécanone avec (77,60%) représentant la quasi-totalité de l'huile, n'a montré aucune activité.

Les huiles de *Thymus pallescens* renfermant (59,15%) de carvacrol et de *Thymus vulgaris* avec (56,80%) de thymol ont montré une activité significative contre les promastigotes de *Leishmania major*. Il semblerait que cette activité antileishmanienne est liée à la présence des composés phénoliques. En effet, les diverses propriétés biologiques rapportées pour les *Thymus*, telles que les activités antioxydantes, insecticides, antibactériennes, antifongiques et antivirales [31-33], sont généralement liées aux composés phénoliques,

particulièrement le thymol et le carvacrol [34-36].

Nous avons noté que l'huile essentielle de *Thymus pallescens* riche en carvacrol était plus efficace, que celle de *Thymus vulgaris* riche en thymol. Des travaux réalisés par Farias-junior et al. [37] pour lequel l'huile essentielle de *Lippia sidoides* riche en carvacrol était plus efficace que l'huile riche en thymol vis-à-vis de *Leishmania chagasi*.

Cependant, nos huiles essentielles de *Thymus* ont montré une toxicité contre les macrophages Raw 264.7. D'après Lawrence [38], l'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. A cet effet, il semblerait que le thymol et le carvacrol seraient responsables de la toxicité. En effet, les travaux réalisés par Rodrigues et al. [39] ont démontré que les deux composés phénoliques thymol et carvacrol possédaient une cytotoxicité élevée à tous les types de cellules testées.

Quant aux huiles d'*Artemisia campestris* riche en monoterpènes hydrocarbonés et d'*Anethum graveolens* contenant 23,86% de myristicine ont montré une bonne activité antileishmanienne avec une faible cytotoxicité. Cette activité antileishmanienne n'est pas seulement due au composé majeur de (HE) mais également à la synergie entre les différents constituants.

En effet, les résultats d'une étude ont montré que α -pinène et p -cymène avaient une activité antileishmanienne [39]. Dans notre étude *Artemisia campestris* contient (16,35%) de α -pinène et *Anethum graveolens* (8,7%) α -pinène et (4,25%) p -cymène.

De même, les résultats d'une autre étude ont montré que la plante *Myrtus communis* avait des propriétés anti leishmaniennes *in vitro* probablement en raison de sa teneur en α -pinène [40].

Rodrigues et al. [39] ont montré que α -pinène était efficace contre les formes de *leishmania amazonensis* et présentaient une faible cytotoxicité contre les macrophages murins et les érythrocytes humains.

En effet, *Artemisia campestris* a déjà été étudiée par Essid et al. Et Mathlouthi et al. [41 et 42], tandis qu'*Anethum graveolens* mérite plus d'attention car à notre connaissance il s'agit du premier rapport concernant l'activité antileishmanienne.

CONCLUSION

Les leishmanies sont responsables d'un taux élevé de mortalité et de morbidité mondiale et les plantes médicinales pourraient être une source intéressante de composés naturels avec des activités de lutte antiparasitaire. Les deux huiles d'*Artemisia campestris* et d'*Anethum graveolens* qui présentent une activité leishmanicide vis-à-vis de *Leishmania major* avec une faible cytotoxicité envers les cellules macrophagiques Raw 264.7 peuvent être considérées comme une initiation à la recherche de nouveaux traitements naturels en vue de se substituer aux médicaments chimiques considérés comme onéreux et toxiques. À l'avenir, des études sont nécessaires pour révéler les composés bioactifs et moins toxiques car l'huile essentielle est un mélange complexe de substances et la purification de composés actifs pourrait entraîner une augmentation considérable de leur activité antileishmanienne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Achour-Barchiche N. et Madiou M. (2009). Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathol Biol.*, 57 : 65-70.
- [2]. Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J. Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M. et Dedet J.P. (1996). *Leishmania infantum* and *L.major* in Algeria. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.*, 90 : 625-629p.
- [3]. Bachi F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La lettre de l'infectiologie* – Tome XXI – n°1.
- [4]. Harrat Z., Boubidi S.C., Pratlong F., Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C. Belkaid M. (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte and Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 716-720.
- [5]. Belazzoug S. (1982). Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 75 : 497-504.
- [6]. Belazzoug S. (1986). Découverte d'un *Meriones shawi* (rongeur, gerbillidae) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*: 79 (5): 630-3.
- [7]. Boudrissa A., Cherif K., Kherrachi I., Benbetka S., Bouiba L., Boubidi S.C., Benikhlef R., Arrar L., Hamrioui B., Harrat Z. (2012). Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105 : 30-35.
- [8]. Belazzoug S. (1983). Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'Sila (Algérie), infestation naturelle de *Psammomys obesus* (rongeur, gerbillidae). *Bull.Soc.Pathol Exot.* 76 : 146-9.
- [9]. Ashford R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30. 1269-1281.
- [10]. Kowalski K. et Rzebiak-Kowalska B. (1991). Mammals of Algeria. Polish Academy of Sciences. *Institute of Systematics and evolution of Animals.* 370 p.
- [11]. Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S. 1984 – Phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) d'Algérie. *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* Vol : XXII, N°2 : 99-127.
- [12]. Izri M.A., Belazzoug S., Pratlong F., Rioux J.A. (1992). Isolement de *Leishmania major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie) fin d'une épopée écoépidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 67 : n° 1, 31-32.
- [13]. Pharmacopée Européenne. (2010). 7^{ème} édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe.
- [14]. Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry; 4 th Ed. USA.
- [15]. Meerloo J.V., Kaspers G.J.L., Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.*, 731(10): 237–245.
- [16]. Aloui Z., Messaoud C., Haoues M., Neffati N., Bassoumi-Jamoussi I., Essafi-Benkhadir K., Boussaid M., Guizani I., Karoui H. (2016). *Asteraceae Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes. *Hindawi Publishing Corporation* ; Article ID 9147096: 15 .
- [17]. Osório E., Arango G.J., Jiménez N., Alzate F., Ruiz G., Gutiérrez D., Paco M.A., Giménez A., Robledo S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J.Ethnopharmacol.* 111: 630-635.
- [18]. de Lima J.P.S., Pinheiro M.L.B., Santos A.M.G., Pereira J.L.S., Santos D.M.F., Silva-Jardim I., Costa E.V. (2012). In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.*, 4: 692-702.

- [19]. Weninger B., Robledo S., Arango G.J., Deharo E., Arango R., Munoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J.Ethnopharmacol.*, 78 : 193–200.
- [20]. Acerby L., Jullian V., Sauvain M. (2008). Ethnopharmacologie et leishmanioses en Amérique latine. *Ethnopharmacologia.*, 41 : p19.
- [21]. Monzote L., Piñón A., Setzer W.N. (2014). Antileishmanial potential of tropical rainforest plant extracts. *Medicines.*, 1: 32–55.
- [22]. Ghorab H., Laggoune S., Kabouche A., Semra Z., Kabouche Z. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre.*, 5 (2): 189-192.
- [23]. Touil S. et Benrebhiha F.Z. (2014). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* L de la région aride de Djelfa. *AgroBiologia.*, 4(1) : 40-45.
- [24]. Alloun K., (2013). Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Silvia officinalis* L.) et la rue des montagnes (*Ruta montana* L.) Magister en Technologie Alimentaire - Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El – Harrach Alger. p.119.
- [25]. Zellagui A., Belkassam A., Belaïdi A., Gherraf N. (2012). Environmental impact on the chemical composition and yield of essential oils of Algeria *Ruta Montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in environmental Biology.*, 6(10): 2684-2688.
- [26]. Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R. (2008). Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food.*, 11(3): 593-595.
- [27]. Benchabane O. (2014). Chemical composition and insecticidal activities of essential oils of two Algerian endemic plants: *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. And *Thymus pallescens* de Noé. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR).*, 4(6): 185-192.
- [28]. Sahraoui N., Abchich H., Mellal M. (2016). Optimisation par plan d'expériences de l'extraction de l'huile essentielle du (*Thymus pallescens*). *International Journal of Scientific Research and Engineering Technology (IJSET).*, 85- 93.
- [29]. Benameur Q., Gervasi T., Pellizzeri V., Pluchtova M., Tali-Maama H., Assaous F., Guettou B., Rahal K., Grulova D., Dugo G., Marino A., Ben-Mahdi M.H. (2018). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{ESBL} producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. *Natural Product Research.*, p. 9.
- [30]. Deschepper R. (2017). Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. *Doct. Pharm, Univ. Pharm.Marseille.*, p.172.
- [31]. Figueiredo A.C., Borroso J.G., Pedro L.G., Salgueiro L., Miguel M.G., Faleiro M.L. (2008). Volatiles des espèces portugaises *Thymbra* et *Thymus*: composition chimique et activités biologiques. *Curr.Pharm.Des.*,14 (29): 3120-40.
- [32]. Pina-Vaz C., Goncalves-Rodrigues A., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Salgueiro L., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de Oliveira J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 18(1) : 73-8.
- [33]. Vale-Silva L.A., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Salgueiro L., Pinto E. (2010). Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species . *Planta Med.*, 76: 882–888.
- [34]. Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A. (2001). Activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *Thymus revolutus* Celak de Turquie. *J. Ethnopharmacol.* , 76 (2) : 183 -186.
- [35]. Rasooli I. et Mirmostafa S.A. (2003). Sensibilité bactérienne aux huiles essentielles de *Thymus kotschyanus* et de *Thymus persicus* et composition chimique de celles-ci. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (8):2200–2205.
- [36]. Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J. (2008). Activité antimicrobienne et composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, de *Thymus zygis* et de *Thymus hyemalis*. *Food Control.*, 19 (7): 681–687.
- [37]. Farias-Junior P.A., Rios M.C., Moura T.A., Almeida P.A., Alves P.B., Blank A.F., Fernandes R.P.M., Scher R. (2012). Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biol Res* , 45: p. 399- 402 .
- [38]. Lawrence B.M. (2000). Progress in essential oils-Ravensara oil. *Perfumer and flavourist*, 25(5) : 68-71.
- [39]. Rodrigues V., Cabral C., Evora L., Ferreire I., Cavaleira C., Cruz M.T., Salagueiro L. (2015). Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Thymus zygis* L. subsp. *Sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout. essential oil and its main compounds. *Arabian journal of chemistry.*, p.8.
- [40]. Mahmoudvand H., Ezzatkhab F., Shariffar F., Sharifi I., Dezaki E.S. (2015). Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. *Korean J . Parasitol.*, (53):21–27.
- [41]. Essid R., Rahali F.Z., Msaada K., Sghair I., Hammami M., Bouratbine A., Aoun K., Limam F. (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in northern Tunisia. *Industrial Crops and products.*, 77: 795- 802.
- [42]. Mathlouthi A., Belkessam M., Sdiri M., Djouani M.F., Souli A., El-Bok S. (2018). Chemical Composition and Anti-*Leishmania major* Activity of Essential Oils from *Artemisia* spp. Grown in Central Tunisia. *Journal of Essential oil bearing plants.*, 21: 1186-1198.



L'essentiel de l'information
scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/mst/sommaire.md?type=text.html>

Cahiers d'études et de recherches francophones



Médecine et Santé Tropicales

Vol. 27, N° 3
Juillet-Août-Septembre
2017
ISSN : 2281-5084



www.medsantetrop.com

Montrouge, le 23/09/2017

A.B. Benelmouffok

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :
Bilan quadriennal (2008-2011) de la leishmaniose cutanée en Algérie

paru dans

Médecine et Santé Tropicales, 2017, Volume 27, Numéro 3

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire.

Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.

© John Libbey Eurotext, 2017

Bilan quadriennal (2008-2011) de la leishmaniose cutanée en Algérie

Cutaneous leishmaniasis in Algeria: quadrennial assessment (2008-2011)

Benelmouffok A.B.¹, Sellami M.², Boughoufalah A.³

¹ École nationale supérieure agronomique, Harrach, 16000 Alger, Algérie

² École nationale supérieure agronomique, El Harrach 16000 alger, Algérie

³ Institut national de la santé publique Alger, Algérie

Article accepté le 15/3/2017

Résumé. *Objectifs* : Étudier la prévalence et les facteurs épidémiologiques de la leishmaniose cutanée en Algérie sur une période allant de 2008 à 2011. *Résultats* : Le foyer de M'Sila est le plus important en Algérie après le foyer historique de Biskra, mais la maladie s'étend rapidement et crée de nouveaux et importants foyers tels ceux de Batna, Bechar, El Oued et Ghardaïa. *Conclusion* : La recrudescence du nombre de cas et l'extension de la maladie nécessite une surveillance accrue de l'évolution de cette zoonose et l'application de mesures de lutte adéquate.

Mots clés : Leishmaniose cutanée, Zoonose, Algérie, bilan quadriennal, épidémiologie.

Correspondance : Benelmouffok AB
<aminabenelmouffok@yahoo.fr>

Abstract. *Aims and Objectives*: To study the prevalence and epidemiological factors of cutaneous leishmaniasis in Algeria from 2008 through 2011. *Results*: The endemic site of M'Sila is the most important in Algeria after the historic site of Biskra, but the disease has spread rapidly and created new and important sites of infection, including Batna, Bechar, El Oued and Ghardaïa. *Conclusion*: The increased number of cases and the spread of this zoonosis require increased surveillance of its evolution and the application of adequate control measures.

Key words: *Cutaneous leishmaniasis, Zoonosis, Algeria, quadrennial assessment, epidemiology.*

Introduction

La leishmaniose cutanée (LC), plus fréquente et plus extensive que la leishmaniose viscérale constitue un problème de santé publique majeur en Algérie. Elle est représentée par trois entités cliniques et trois parasites différents. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) du sud à *Leishmania major* inféodée aux régions steppique et saharienne [1], la leishmaniose cutanée chronique à *L. killicki* proche de *L. tropica* limitée pour le moment à Ghardaïa au sud du pays [2] et la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) à *L. infantum* dans la région du Tell [1].

Longtemps confinée au Sahara, la LCZ connaît une extension géographique en dehors des foyers naturels de la maladie. Au cours de ces dernières années, la barrière géographique formée par l'Atlas tellien, qui séparait la forme cutanée du Nord et la forme cutanée du Sud, a été franchie avec une avancée rapide de cette dernière vers le nord du pays [3].

Compte tenu de la réémergence de la leishmaniose et la variabilité géographique de l'épidémiologie, le but de notre travail est d'étudier :

- la prévalence de la leishmaniose cutanée en Algérie sur une période allant de 2008 à 2011 ;
- les facteurs épidémiologiques et écologiques favorables au développement de la maladie.

Méthodologie

Notre travail est une étude rétrospective de la leishmaniose cutanée en Algérie sur une période de 4 années allant de 2008 à 2011.

Toutes les données nous ont été fournies par l'institut national de santé publique (INSP).

Ce qui nous a permis d'analyser 88 fiches émanant de toutes les wilayas.

Les paramètres étudiés en premier lieu sont :

- les cas de leishmaniose cutanée recensés par année dans toutes les wilayas.
- la répartition mensuelle à l'échelle nationale ;
- la répartition par tranche d'âge et de sexe à l'échelle nationale.

Après traitement des données de cette zoonose en Algérie, nous avons retenu les wilayas les plus touchées dont les taux d'incidence ont atteint des niveaux élevés, afin d'étudier les facteurs épidémiologiques et écologiques favorables au développement de la maladie. Ce sont les wilayas de Batna, Biskra, Bechar, M'Sila, El Oued et Ghardaïa. Les paramètres étudiés en deuxième lieu sont :

- la répartition mensuelle pour les six wilayas retenues ;
- la répartition par tranche d'âge et de sexe pour les mêmes wilayas.

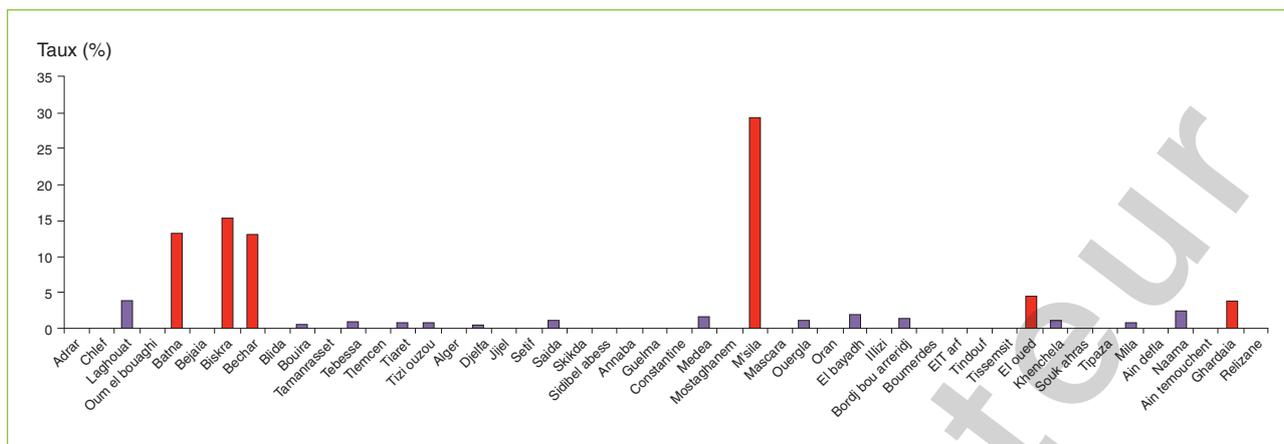


Figure 1. Répartition annuelle de la LC en Algérie 2008.
Figure 1. Annual distribution of cutaneous leishmaniasis in Algeria 2008.

Une étude statistique a été réalisée pour chaque paramètre.

Résultats et discussion

Résultats

L'année 2008 a été caractérisée par un nombre total de 7631 cas de (LC) enregistrés, soit 22,54 cas pour 100 000 habitants et que la wilaya M'Sila a enregistré le taux le plus élevé soit 29,4 % (figure 1).

L'année 2009 a enregistré 12 097 cas de (LC), soit un taux d'incidence de 35,25 cas pour 100 000 habitants et que c'est toujours la wilaya de M'Sila qui a enregistrée le taux le plus élevé (figure 2).

L'année 2010 caractérisée par une nette augmentation de cas de (LC) dont le nombre total est de 21 049 cas, soit 58,93 cas pour 100 000 habitants. L'incidence a doublé dans les wilayas de Biskra et Ghardaïa, avec des taux respectivement passés de 401,26 à 828,7 cas et 63,34 à 135,86 cas. La situation est alarmante à El Oued avec un taux qui était à 71,41 pour atteindre 561,27 cas ; il a carrément octuplé. La wilaya de Biskra qui a enregistrée le nombre de cas le plus élevé de (LC) (figure 3).

Pour l'année 2011, il a été enregistré de 16 670 cas de (LC), soit 45,62 cas pour 100 000 habitants. On note une légère baisse passant de 58,93 à 45,62 cas (figure 4).

Il est à noter qu'un foyer épidémique important est notifié par la wilaya de Laghouat avec une incidence de 317,05 cas.

Pour ce qui est de la répartition mensuelle de la LC la figure 5 révèle des taux élevés durant l'hiver, chute au printemps et en été pour augmenter à nouveau en automne en atteignant des pics au mois de décembre et janvier.

En ce qui concerne la répartition par tranche d'âge et de sexe de la LC, la figure 6 révèle que ce sont surtout les enfants [1-9 ans] et les jeunes adultes [9- 29 ans] qui sont les plus touchés.

Discussion

La leishmaniose cutanée est observée durant toute l'année. C'est en automne et en hiver que les taux les plus élevés ont été enregistrés, confirmant ainsi le caractère saisonnier de la zoonose en Algérie, ce qui concorde avec les travaux réalisés [4-6].

Elle touche tous les âges, du nourrisson à la personne âgée. Les enfants et les jeunes adultes sont les plus atteints, ce qui

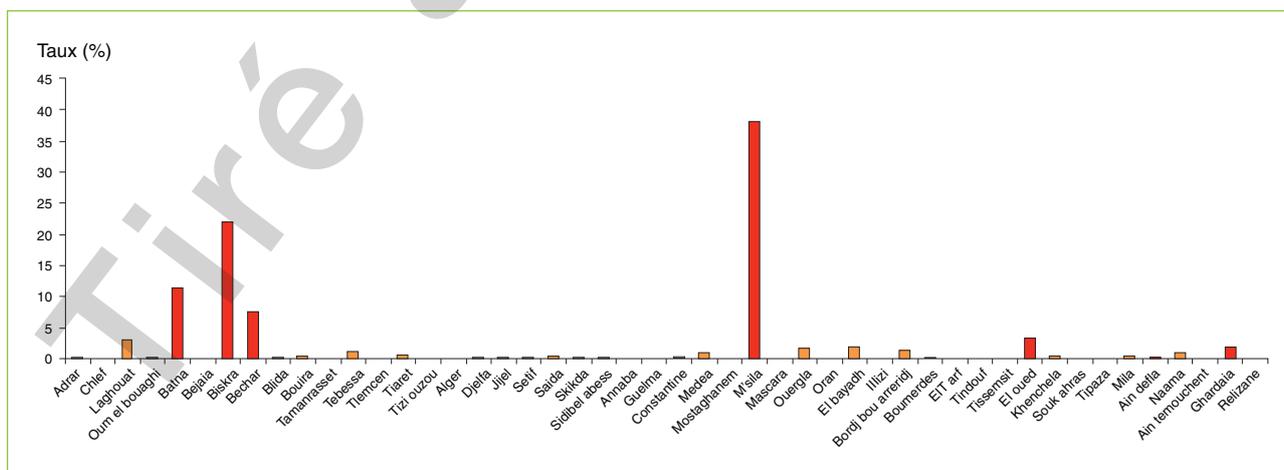


Figure 2. Répartition annuelle de la LC en Algérie 2009.
Figure 2. Annual distribution of cutaneous leishmaniasis in Algeria 2009.

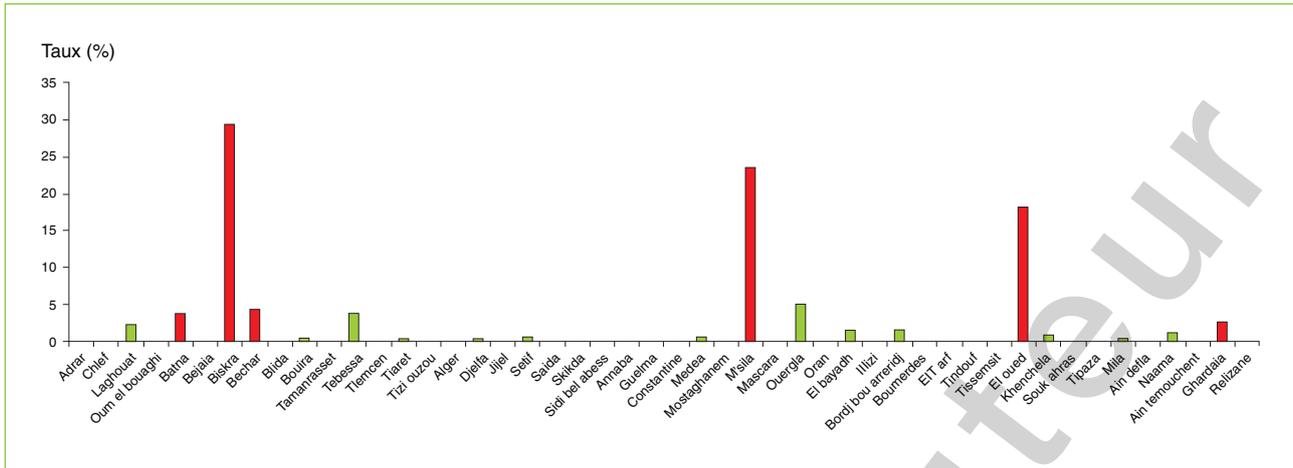


Figure 3. Répartition annuelle de la LC en Algérie 2010.
Figure 3. Annual distribution of cutaneous leishmaniasis in Algeria 2010.

s'accorde avec les travaux réalisés en Algérie par [6], en Tunisie par [7] et au Maroc [8].

Aucune différence concernant le sexe des patients atteints n'a été constatée, et ceci est en accord avec les travaux antécédents [6-8].

À l'instar de Biskra (ancien foyer), les wilayas de Batna, Bechar, M'Sila, El-Oued et Ghardaïa avaient enregistré des taux d'incidence élevés. Toutes ces wilayas sont situées dans les régions steppiques à sahariennes avec des climats semi-arides à per arides et sont le terrain propice au déroulement du cycle parasitaire de la LCZ dont le principal agent est *L. major* [3, 5, 9, 10].

Depuis ces dernières années, les maladies à transmission vectorielle connaissent une netterecrudescence en Algérie. Malgré cette alerte, la lutte contre cette maladie n'a jamais réussi à établir une stratégie efficace et durable. En effet, l'élimination des hôtes réservoirs est l'un des éléments des stratégies de lutte recommandé dans le cas de la leishmaniose cutanée zoonotique.

Cependant, *Psammomys obesus* (rat des sables) est une espèce protégée dans notre pays (loi du 20 août 1983). Le

deuxième réservoir est péri domestique représenté par *Meriones shawi* (la mérione de Shaw). Une campagne de lutte est décrétée tous les ans par l'Institut national de la protection des végétaux (INPV) à partir du mois d'octobre à fin mars, correspondant à la période de disette du rongeur.

La figure 7 a révélé que durant la campagne 2008, les opérations d'appâtage dans les zones infestées ont touché 20 wilayas céréalières soit 73 370 ha réparties sur une superficie infestée de 75 000 ha.

La campagne 2010 a été caractérisée par un regain de l'activité de ce rongeur. La superficie infestée est passée de 49 083 ha en 2009 à 96 922 ha en 2010. Cette recrudescence est le résultat de deux années consécutives de pluies abondantes ainsi qu'à la baisse de vigilance des agriculteurs quant à la surveillance de ce fléau. Les opérations d'appâtage ont touché 22 wilayas déclarées infestées par arrêté du wali.

La superficie infestée au cours de la campagne 2010-2011 a augmenté par rapport à la campagne écoulée passant de 96.922 ha à 114 126 ha répartis sur 23 wilayas.

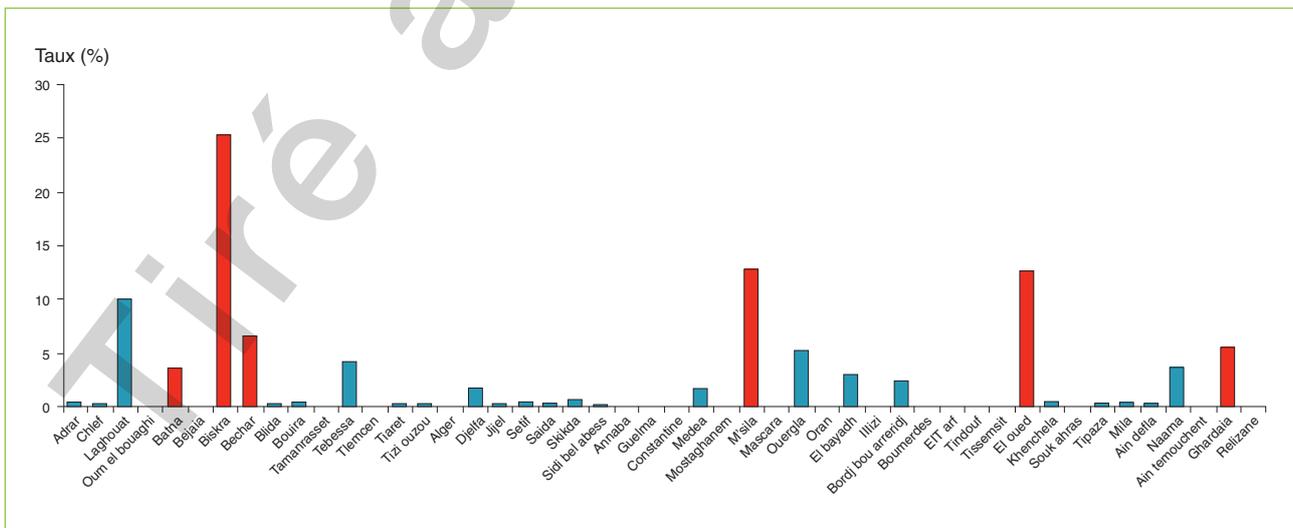


Figure 4. Répartition annuelle de la LC en Algérie 2011.
Figure 4. Annual distribution of cutaneous leishmaniasis in Algeria 2011.

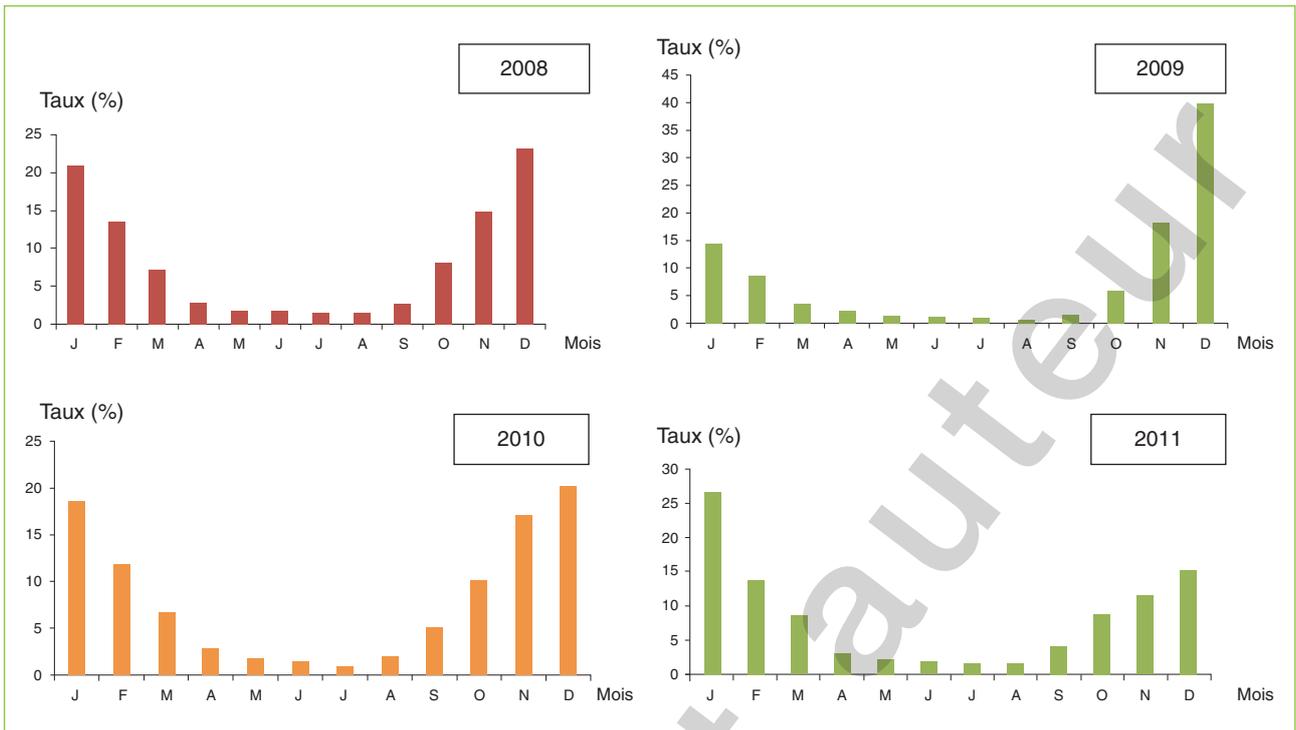


Figure 5. Répartition mensuelle de leishmaniose cutanée en Algérie.
Figure 5. Monthly distribution of cutaneous leishmaniasis in Algeria.



Figure 6. Répartition par tranche d'âge et sexe de LC en Algérie.
Figure 6. Distribution of cutaneous leishmaniasis in Algeria by age group and by sex.

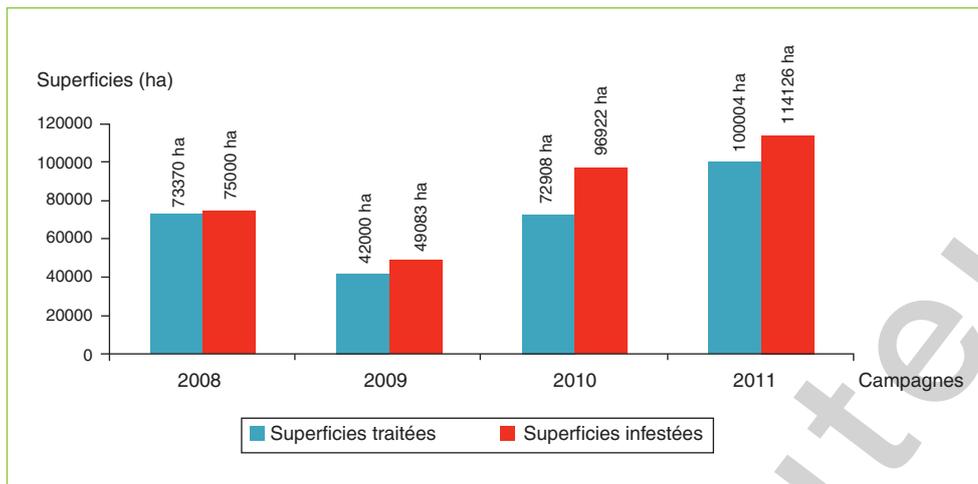


Figure 7. Superficies traitées et infestées par *Meriones shawi* (INPV, 2011).

Figure 7. Surface area treated for and infested by *Meriones shawi* (INPC, 2011).

Il est à noter, que la lutte contre les rongeurs se pratique uniquement au niveau des zones agricoles, ce qui ne permettra guère l'éradication définitive de ce fléau, notamment avec le développement de l'agriculture steppeuse.

D'autre part, la combinaison de plusieurs facteurs a provoqué l'extension de la maladie à la quasi-totalité des wilayas atteignant le chiffre de 21 049 cas de leishmaniose cutanée en 2010, à savoir :

- facteurs climatiques : ils peuvent favoriser ou limiter la pullulation des insectes. Ainsi une sécheresse prolongée limite la prolifération des rongeurs et par conséquent celle des insectes inféodés. À l'inverse, des pluies abondantes favorisent la végétation et les populations animales et donc le développement des insectes [4, 11], expliquant la recrudescence de la leishmaniose en 2010, suite à deux (2) années consécutives de pluies abondantes ;
- facteurs socio-économiques : la dégradation du cadre de vie et de l'hygiène du milieu peuvent augmenter le nombre de gîtes larvaires et de lieux de repos pour les phlébotomes [12], ainsi que l'urbanisation anarchique et le rapprochement des habitations en milieu rural à proximité des terriers des rongeurs qui sont autant de facteurs favorisant la prolifération de cette maladie [5, 11, 13].
- écologiques : les mises en valeur des terres, les périmètres irrigués et le développement des steppes ont favorisé la multiplication des rongeurs et par conséquent la propagation de la leishmaniose cutanée [5, 14].

Conclusion

La leishmaniose cutanée à *Leishmania major* est la forme la plus rencontrée en Algérie. Elle s'observe surtout dans les régions steppeuses, principalement au niveau de la frange nord du Sahara. Dans ces régions cohabitent le principal vecteur *Phlebotomus papatasi* et les rongeurs réservoirs naturels de la maladie *Psammomys obesus* et *Meriones shawi*.

Le foyer de M'Sila est le plus important en Algérie après le foyer historique de Biskra, mais la maladie s'étend rapidement et crée de nouveaux et importants foyers tels ceux de Batna, Béchar, El Oued et Ghardaïa.

La recrudescence du nombre de cas et l'extension de la maladie nécessitent une surveillance accrue de l'évolution de cette zoonose et l'application de mesures de lutte adéquates.

Liens d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Harrat Z, Pralong F, Belazzoug S, et al. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996 ; 90 : 625-9.
2. Harrat Z, Boubidi SC, Pralong F, et al. Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte and Pralong 1986) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 ; 103 : 716-20.
3. Boudrissa A, Cherif K, Kherrachi I. Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie. *Bull Soc Pathol Exot* 2012 ; 105 : 30-5.
4. Izri A, Depaquit J, Parola P. Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Méd Trop* 2006 ; 66 : 429-35.
5. Bachi F. Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La lettre de l'infectiologie* 2006 ; 21 : 1-7.
6. Zait H, Hamrioui B. Leishmanioses cutanées en Algérie. Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009 ; 412 : 33-9.
7. Ben Abda I, Aoun K, Ben Alaya N, et al. Données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques actualisées de la leishmaniose cutanée en Tunisie. *Rev Tun Infect* 2009 ; 31-6.
8. Zougaghi L, Bouskraoui M, Amine M, Akhdari N, Amal S. Leishmaniose cutanée à *Leishmania tropica* dans la région de Marrakech (Maroc) : un foyer rebelle ! *Revue Francophone des Laboratoires* 2011 ; 429 : 35-9.
9. Mihoubi I, De Monbrison F, Romeuf N, Moulahem T, Picot S. Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algérie). *Méd Trop* 2006 ; 66(1):39-44.
10. Garni R. *Information spatiale et épidémiologique des maladies vectorielles : Développement d'une méthode de cartographie des zones à risque de leishmaniose cutanée, Ghardaïa, Algérie*. Master international d'entomologie médicale et vétérinaire. 2012 ; 38 p.
11. Achour-Barchiche N, Madiou M. Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathol Biol* 2009 ; 57 : 65-70.
12. Organisation mondiale de la Santé. *La lutte contre les leishmanioses. Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses*. Genève : OMS, 228 p.
13. Tchicha B, Slimi D. Les leishmanioses. Bulletin d'information de santé publique. *Infos Santé* 2010 ; 1-4.
14. Fendri AH, Beldjoudi W, Ahrous S, Djallah M. Les leishmanioses diagnostiquées au CHU Benbadis de Constantine. Algérie : bilan de cinq années (2006-2010). *Bull Soc Pathol Exot* 2011 ; 105 : 46-8.

ملخص

نشاط معادي لبعض النباتات الجزائرية العفوية ضد *Leishmania major*

الأهداف : تقييم النشاط المضاد للشمانية لبعض نباتات عفوية الجزائرية وهي: *Anethum* , *Artemisia campestris* , *Calotropis* , *Inula viscosa* , *Thymus vulgaris* , *Thymus pallescens* , *Ruta montana* , *graveolens* , *Leishmania major* , *Procera* , *Peganum harmala* و *Colocynthis vulgaris* تجاه *Leishmania major* المعنية **الطريقة :** تم جمع النباتات بشكل رئيسي من مناطق السهوب الجزائرية. يتم استخراج الزيوت الأساسية (HEs) المعنية (05) نباتات وهي: *Thymus* , *Ruta montana* , *Anethum graveolens* , *Artemisia campestris* , *Thymus pallescens* و *Thymus vulgaris* ، عن طريق التقطير المائي ، ثم تحليل كروماتوجرافيا الغاز مقرونًا بمطياف الكتلة (CG/MS) تم استخلاص المستخلصات الكلية للنباتات التالية: *Calotropis procera* , *Inula viscosa* , *Colocynthis vulgaris* و *Peganum harmala* عن طريق النقع في مذيب وتحديدًا باختبارات كيميائية نباتية. تم تنفيذ الأنشطة المضادة للشمانية والسامة للخلايا لنباتاتنا في المختبر من خلال اختبار قياس الألوان باستخدام 3-MTT (2,5-dimethylthiazol-2-yl-4-methyltetrazolium) .

النتائج : أظهرت أربعة أنواع من أصل خمسة نشاطًا مضادًا للشمانية. *Ruta montana* HE غنية بالكيتونات بنسبة (77,6%) /undecanone-2 لم تظهر أي نشاط. أظهرت HE من *Thymus pallescens* مع 59,15% carvacrol و *Thymus vulgaris* مع 56,80% thymol نشاطًا ضد بروماستيجونات الليشمانيا الرئيسية ولكن السمية الخلوية ضد الخلايا الضامة الخام 264.7. أظهر HE من *Artemisia campestris* الغني بالمونوتريبينات الهيدروكربونية و *Anethum graveolens* HE التي تحتوي على 23,86% من ميريسيتيسين نشاطًا جيدًا ضد الليشمانيا الكبرى مع 50CI على التوالي $0,18 \pm 14,02$ ميكروغرام / مل و $0,30 \pm 13,83$ ميكروغرام / مل. أعربوا عن انخفاض سمية الخلايا مع 50CC من $0,18 \pm 183$ ميكروغرام / مل و $0,22 \pm 158,1$ ميكروغرام / مل ومؤشرات انتقائية (IS) تبلغ 13,05 و 11,43 على التوالي. أما بالنسبة للمستخلصات الكلية فقد كشفت الأنواع الأربعة عن وجود مركبات نيتروجينية حيث اشتهر *Peganum harmala* بغناه بالقلويدات مقارنة بالأنواع الأخرى المدروسة والمركبات الفينولية ومركبات التربين (heterosides). أظهرت هذه النباتات الأربعة نشاطًا مضادًا للشمانية قبل العلاج بـ MTT. ومع ذلك ، بعد العلاج به تداخل اثنان من المقطعات الأربعة مع الكاشف وهما: *Calotropis procera* و *Peganum harmala*. أما بالنسبة للمستخلصين الآخرين ، فقد أظهر *Colocynthis vulgaris* قوة طفيلية أفضل مقارنة مع *Inula viscosa* بـ $0,9 \pm 31,74$ IC50 و $1,6 \pm 126,3$ ميكروغرام / مل على التوالي. لأسباب صحية (COVID19) ، لم تتمكن من إكمال النشاط السام للخلايا لهذين النباتين. **خاتمة :** يمكن اعتبار *Artemisia campestris* و *Anethum graveolens* بداية للعلاجات الطبيعية لداء الليشمانيات. يستحق *Anethum graveolens* مزيدًا من الاهتمام لأن هذا هو أول ذكر للنشاط المناهض للشمانية الذي يبلغ عنه. بالنسبة إلى *Colocynthis vulgaris* و *Inula viscosa* ، فإن النشاط على خلايا البلاعم ضروري لاستكمال الدراسة.

الكلمات المفتاحية : النشاط المضاد للشمانية ، *Leishmania major* ، نباتات عفوية ، الجزائر .

Abstract

Antileishmanian activity of some Algerian spontaneous plants against *Leishmania major*

Objectives: To evaluate the antileishmanian activity of some Algerian spontaneous plants namely : *Artemisia campestris*, *Anethum graveolens*, *Ruta Montana*, *Thymus pallescens* and *Thymus vulgaris*, *Inula viscosa*, *Calotropis procera*, *Colocynthis vulgaris* and *Peganum harmala* against *Leishmania major*.

Methods: The plants were collected mainly in the steppe regions of Algeria. The extraction of essential oils (EO) concerned (05) plants, namely *Artemisia campestris*, *Anethum graveolens*, *Ruta Montana*, *Thymus pallescens* and *Thymus vulgaris* was performed by hydro-distillation then analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The extraction of total extracts of following plants: *Inula viscosa*, *Calotropis procera*, *Colocynthis vulgaris* and *Peganum harmala* were extracted by solvent maceration and identified by phytochemical tests.

The antileishmanian and cytotoxic activities of our plants were realized in vitro by the colorimetric test with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT.

Result:

Regarding essential oils, four species out of five showed antileishmanian activity. *Ruta montana* EO rich in ketones with (77,6%) 2-undecanone showed no activity.

Thymus pallescens EO with 59,15% carvacrol and *Thymus vulgaris* EO with 56,80% thymol showed activity against *Leishmania major* promastigotes but cytotoxicity against Raw 264.7 macrophage cells. *Artemisia campestris* EO rich in hydrocarbon monoterpenes and *Anethum graveolens* EO containing 23,86% myristicin showed good activity against *Leishmania major* with an IC₅₀ of 14,02±0,18 µg/ml and 13,83±0,30 µg/ml respectively. They expressed low cytotoxicity with CC₅₀ of 183 ±0,18 µg/ml and CC₅₀ of 158,1 ± 0,22 µg/ml and selectivity indices (SI) of 13,05 and 11,43 respectively.

As for the total extracts, the four species revealed the presence of nitrogenous compounds where *Peganum harmala* is known for its richness in alkaloids compared to the other species studied, phenolic compounds and terpene compounds (heterosides). All four plants showed anti-leishmanian activity before treatment with MTT. However, after treatment with MTT, two of the four extracts interfered with the reagent, namely: *Peganum harmala* and *Calotropis procera*.

As for the other two extracts, *Colocynthis vulgaris* expressed a better parasitic power compared to *Inula viscosa* with IC₅₀ values of 31.74±0.9 and 126.3±1.6 µg/ml respectively.

For sanitary reasons (COVID19), we were not able to complete the cytotoxic activity of these two plants.

Conclusion: *Artemisia campestris* and *Anethum graveolens* can be considered as an initiation of natural treatments for leishmaniasis. *Anethum graveolens* deserves more attention since it is the first mention of antileishmanian activity that we report.

As for *Colocynthis vulgaris* and *Inula viscosa*, activity on macrophagic cells is required to complete the study.

Key words: Antileishmanian activity, *Leishmania major*, Spontaneous plants, Algeria.

Résumé

Activité antileishmanienne de quelques plantes spontanées Algériennes vis-à-vis de *Leishmania major*

Objectifs : Evaluer l'activité antileishmanienne de quelques plantes spontanées Algériennes à savoir : *Artemisia campestris*, *Anethum graveolens*, *Ruta montana*, *Thymus pallescens*, *Thymus vulgaris*, *Inula viscosa*, *Calotropis procera*, *Colocynthis vulgaris* et *Peganum harmala* vis-à-vis de *Leishmania major*.

Méthodes : Les plantes ont été récoltées principalement dans les régions steppiques d'Algérie. L'extraction des huiles essentielles (HEs) a concerné (05) plantes à savoir : *Artemisia campestris*, *Anethum graveolens*, *Ruta montana*, *Thymus pallescens* et *Thymus vulgaris*, a été réalisée par hydro-distillation, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS). L'extraction des extraits totaux des plantes suivantes : *Inula viscosa*, *Calotropis procera*, *Colocynthis vulgaris* et *Peganum harmala* a été réalisée par macération dans un solvant et leur identification par les tests phytochimiques.

Les activités antileishmanienne et cytotoxique de nos plantes ont été réalisées in vitro par le test colorimétrique au bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltétrazolium) MTT.

Résultats : En ce qui concerne les huiles essentielles, quatre espèces sur cinq ont montré une activité antileishmanienne. L'HE de *Ruta montana* riche en cétones avec (77,6%) de 2-undécane n'a montré aucune activité.

Les HEs de *Thymus pallescens* avec 59,15% de carvacrol et de *Thymus vulgaris* avec 56,80% de thymol ont montré une activité contre les promastigotes de *Leishmania major* mais une cytotoxicité contre les cellules macrophagiques Raw 264.7. L'HE d'*Artemisia campestris* riche en monoterpènes hydrocarbonés et l'HE d'*Anethum graveolens* renfermant 23,86% de myristicine ont montré une bonne activité contre *Leishmania major* avec respectivement, une CI50 de $14,02 \pm 0,18$ $\mu\text{g/ml}$ et $13,83 \pm 0,30$ $\mu\text{g/ml}$. Elles ont exprimé une faible cytotoxicité avec des CC50 de $183 \pm 0,18$ $\mu\text{g/ml}$ et CC50 de $158,1 \pm 0,22$ $\mu\text{g/ml}$ et des indices de sélectivité (IS) de 13,05 et 11,43 respectivement.

Quant aux extraits totaux, les quatre espèces ont révélé la présence de composés azotés où *Peganum harmala* réputé pour sa richesse en alcaloïdes par rapport aux autres espèces étudiées, de composés phénoliques et de composés terpéniques (hétérosides). Ces quatre plantes ont montré une activité antileishmanienne avant traitement au MTT. Cependant, après traitement avec celui-ci deux des quatre extraits ont interféré avec le réactif à savoir : *Peganum harmala* et *Calotropis procera*.

Quant aux deux autres extraits, *Colocynthis vulgaris* a exprimé un meilleur pouvoir parasitaire par rapport à *Inula viscosa* avec des CI50 égales $31,74 \pm 0,9$ et $126,3 \pm 1,6$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Pour des raisons sanitaires (COVID19), nous n'avons pas été en mesure de mener, à bien et à terme l'activité cytotoxique de ces deux plantes.

Conclusion : *Artemisia campestris* et *Anethum graveolens* peuvent être considérées comme une initiation aux traitements naturels des leishmanioses. *Anethum graveolens* mérite plus d'attention puisque c'est la première mention de l'activité antileishmanienne que nous rapportons.

Quant à *Colocynthis vulgaris* et *Inula viscosa* une activité sur les cellules macrophagiques est nécessaire pour compléter l'étude.

Mots-clés : Activité antileishmanienne, *Leishmania major*, Plantes spontanées, Algérie.