

République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

N° d'Ordre : 56Mag/2013

N° de Série : 03/MBio/2013

THESE

En vue de l'obtention du diplôme :

Magister en Biologie Appliquée

THEME

***ETUDE, IN VITRO, DE L'ACTIVITE ANTI
LEISHMANIENNE
DE CERTAINES PLANTES MEDICINALES LOCALES :
CAS DE LA FAMILLE DES LAMIACEES***

Présentée par

RAMLI Imene

Soutenue le :

30/06/2013

Devant le jury :

Président :	Mr M. Merghem	Professeur Université de Constantine 1
Rapporteur :	Mme I. Mihoubi	Professeur Université de Constantine 1
Examineurs :	Mme Z. Kabouche	Professeur Université de Constantine 1
	Mr A. Yahia	Professeur Centre Universitaire de Mila
	Mr Z. Harrat	Professeur Institut Pasteur d'Alger

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2012/2013

Dédicaces

A mes très chers parents

A ma très chère grand-mère Yamina

A mes chers sœurs et frères

A mes amis

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mon encadreur Professeur *ILHEM MIHOUBI* pour tous ses efforts et ses encouragements, pour son aide et sa patience infinie, et pour le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction, je lui exprime ma profonde gratitude. MERCI !

A mon maitre, *Mr MERGHEM Rachid*, Professeur au département de Biochimie et de Microbiologie et mon enseignant durant mon cursus de formation, en graduation et post graduation, à l'Université de Constantine 1. Sa présence en tant que président de ce Jury, malgré ses multiples préoccupations m'honore beaucoup.

L'étude phytochimique a été réalisée au Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques. (LOST) de la faculté des sciences exactes de l'Université Constantine 1 sous la direction du Professeur *Zahia KABOUCHE*. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de préparer mon magister dans les meilleures conditions, et pour bien vouloir juger mon modeste travail.

J'exprime mes sincères remerciements au Docteur *Zoubir HARRAT*, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire au niveau de l'Institut Pasteur Algérie (IPA) , pour son aide et disponibilité, et aussi pour bien vouloir juger mon travail.

Je voudrais également exprimer mes vifs remerciements à *Pr. Abdelouahab YAHIA* du Centre Universitaire de Mila membre du jury qui a bien voulu juger ce modeste travail.

Je remercie vivement M^{me} *EDDAIKRA Nawel* pour la confiance, l'aide, et les conseils concernant les essais leishmanicides, qu'elle m'a apporté lors des différents suivis au sein de l'Institut Pasteur me permettant ainsi la réalisation de l'activité antileishmanienne, pour sa grande patience et sa gentillesse.

Je remercie de tout mon cœur, *Mr. GARNI Rafik* pour m'avoir prodigué l'aide dans la réalisation de l'activité antileishmanienne, l'étude statistique, et dans la rédaction du mémoire. Sa totale disponibilité et sa gentillesse incomparable ont été pour moi d'une grande stimulation. MERCI d'autant qu'il y a de mots!

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à, *Benallal Kamel, Ihcene Kherchi, Lezhari, Sihem, Razika, Souad, Adlene, et Ghania*, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ces trois mois au sein de service éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur Algérie (J'ai passé des moments inoubliables avec vous).

A mes collègues *Wafa, Sanaa, Hadjer, meriem, Amina, Samira, Alima, Hind, Anissa, et Hichem* et à toutes mes amis.

Que tous ceux, que je n'ai pas nommé, et qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Liste des abréviations

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

AMPc Adenosine mono phosphate cyclique.

ATP : Adénosine tri phosphate.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CI₅₀ : Concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire.

DAT : Agglutination directe.

DO_{pyr} : Absorbance de pyrogallol.

EASA : Phase acétate d'éthyle de *Salvia aurasiaca*.

EASG : Phase acétate d'éthyle de *Stachys guyoniana*.

EBSA : Phase butanolique de *Salvia aurasiaca*.

EBSG : Phase butanolique de *Stachys guyoniana*.

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

ES : Electrosynérèse.

FAB : bombardement par des atomes accélérés.

HAI : Hémagglutination indirecte.

HIV : Human immunodeficiency virus.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

IC₁₀₀ : la concentration inhibitrice de 100% de la croissance cellulaire .

IC : ionisation chimique.

IE : Impact électronique.

IFI : Immunofluorescence indirecte.

LC : Leishmaniose cutanée.

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse.

LCM : Leishmaniose cutaneo-muqueuse.

LCN : Leishmaniose cutanée du nord.

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique.

LDL : Lipoprotéines de faible densité.

LV : Leishmaniose viscérale.

MeOH : Méthanol .

m_{ext} : Masse de l'extrait.

m_{pyr} : Masse de pyrogallol.

MTT : Bromure de 3(4.5-diMéthylThiazol-2-yl)-2.5-diphényl Tétrazolium.

NNN : Novy-Mac Neal- Nicolle.

PCR : Polymérase Chain Reaction..

PMA : Phorbol myristate acétate.

PI : Pourcentage d'inhibition.

RPMI : Roswell Park Memorial Park Institut.

SbIII : Antimoine trivalent.

SbV : Antimoine pentavalent.

SVF : Sérum veau fœtal.

TNF α : facteur nécrosant des tumeurs α

TH1 : T helper 1

TH2 : T helper 2

Thp-1 : monocytes des lignées humaines

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Généralités sur les leishmanioses.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Epidémiologie.....	3
I.2.1. Le parasite.....	3
I.2.1.1. Morphologie.....	3
I.2.1.2. Biologie.....	5
I.2.1.3. Le cycle évolutif	5
I.2.1.4. Classification et taxonomie.....	6
I.2.2. Le vecteur	7
I.2.3. Le réservoir	7
I.2.4. Réponse immunitaire chez l'hôte vertébré.....	8
I.2.5. Distribution géographique des leishmanioses.....	9
I.2.6. Formes cliniques des leishmanioses.....	10
I.2.6.1. La leishmaniose viscérale (LV).....	10
I.2.6.2. La leishmaniose cutanée (LC).....	11
I.2.6.3. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD).....	11
I.2.6.4. La leishmaniose cutaneo-muqueuse (LCM).....	11
I.2.6.5. La leishmaniose canine.....	12
I-3- Diagnostic des leishmanioses.....	12
I.3.1. Examen microscopique	12
I.3.2. Culture	12
I.3.3. Inoculation aux animaux.....	13
I.3.4. Techniques modernes permettant la détection du parasite	13
I.3.5. Examens sérologiques.....	13
I.3.6. Intradermo-réaction de Monténégro à la leishmanine.....	13

I.4. Traitement des leishmanioses.....	14
I.4.1. Traitement de première intention.....	14
I.4.2. Traitement de seconde intention.....	14
Chapitre II : Les plantes médicinales et la phytothérapie	16
II.1. Les plantes médicinales.....	16
II.1.1. Définition.....	16
II.1.2. Les plantes médicinales et leurs utilisations.....	16
II.2. La phytothérapie	17
II.2.1. Définition	17
II.2.2. Les différents types de phytothérapie.....	17
II.2.3. Les intérêts de la phytothérapie	18
II.2.4. Composant à effet thérapeutique	18
II.2.5. Drogue végétale.....	19
II.2.6. Préparation à base de drogue végétale.....	19
Chapitre III : Métabolites secondaires et pharmacodynamique.....	20
III.1. Les terpènes.....	20
III.2. les alcaloïdes.....	21
III.3. Les composés phénoliques	21
III.3.1. Biosynthèse des polyphénols	23
III.3.1.1. La voie de shikimate	23
III.3.1.2. la voie des phénylpropanoïdes.....	24
III.3.2. Principales classes des composés phénoliques.....	26
III.3.2.1. Les acides phénols	26
III.3.2.2. Les coumarines	27
III.3.2.3. Les tanins.....	28
III.3.2.3.1 Les tanins hydrolysables.....	29
III.3.2.3.2. Les tanins non hydrolysables.....	29
III.3.4. Les flavonoïdes	29

III.3.2.4.1. Biosynthèse.....	30
III.3.4.2.2 Structure chimique.....	31
III.3.2.4.3 Les anthocyanes.....	33
III.3.2.4.4. Les flavonones et les flavonols.....	34
III.3.2.4.5. Les isoflavones.....	34
III.3.2.4.6. propriétés des flavonoïdes.....	35
III.3.2.4.6.1. Propriétés anti radicalaire.....	35
III.3.2.4.6.2. Propriétés créatrices des ions métalliques.....	36
III.3.2.4.6.3. Inhibition enzymatique.....	36
III.3.2.4.6.4. Propriétés anticancéreuses.....	36
III.3.2.4.6.5. Activité anti inflammatoire.....	37
III.3.2.4.6.6. Effets cardiovasculaire.....	37
III.3.2.4.6.7. Propriétés antibactériennes.....	38
III.3.2.4.6.8. Propriétés antivirales.....	38
III.3.2.4.6.9. Propriétés antiallergiques.....	38
III.3.2.4.6.10. Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques.....	38
III.3.2.4.6.11. Activité antileishmanienne.....	39
III.4. Méthodes d'analyse des substances naturelles.....	41
III.4.1. Extraction, isolement, purification et analyses structurales des flavonoïde.....	41
III.4.1.1. Récolte des plantes.....	41
III.4.1.2. Extraction.....	41
Chapitre IV : Etude des plantes médicinales investiguées.....	43
IV.1. Aperçu bibliographique sur les plantes médicinales ayant une activité anti Leishmanienne.....	43
IV.2. Généralités sur les Lamiaceae.....	53
IV.3. Présentation du genre <i>Salvia</i>	54

IV.3.1. Description botanique.....	54
IV.3.2. Habitat.....	54
IV.3.3. Principes actifs.....	54
IV.3.4. Propriétés pharmacologiques.....	55
IV.3.5. Présentation de l'espèce <i>Salvia aurasia</i>	55
IV.4. Présentation du genre <i>Stachys</i> L.....	55
IV.4.1. Aspect botanique	56
IV.4.2. Habitat	56
IV.4.3. Principes actifs.....	56
IV.4.4. Propriétés pharmacologiques	56
IV.4.5. Présentation de l'espèce <i>Stachys guyoniana</i>	57

MATERIEL ET METHODES :

Chapitre I : Etude phytochimique des espèces <i>S.aurasiaca</i> et <i>St.guyoniana</i>	59
I.1. Récolte du matériel végétal	59
I.1.1. La plante <i>Salvia aurasia</i>	59
I.2. L'extraction	59
I.3. Dosages des polyphénols totaux des extraits	62
I.4. Dosage des flavonoïdes.....	63
Chapitre II : Etude de l'activité anti leishmanienne.....	64
II.1. Etude in vitro de l'activité anti leishmanienne.....	64
II.1. Matériel biologique.....	64
II.1.1. Parasites.....	64
II.1.1.2. Cellules Thp-1.....	64
II.1.1.3. Milieux de culture.....	64

II.1.2. Activité leishmanicide.....	65
II.1.2.1. Sur la forme promastigote.....	65
II.1.2.2. Test colorimétrique à la MTT	66
II.1.2.3. Test de cytotoxicité	66

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : L'étude phytochimique	68
I.1. Extraction.....	68
I.3. Dosage des polyphénols totaux	68
I.4. Dosage des flavonoïdes	71
Chapite II : Etude des activités biologiques.....	73
II.1. Activité leishmanicide	73
II.1.1. Effet leishmanicide des extraits phénoliques sur la forme promastigote de <i>L. major</i>	73
II.1.1.1. Calcul d'IC ₅₀ des extraits testés sur <i>L. major</i>	75
II.1.2. Effet leishmanicide des extraits phénoliques sur la forme promastigote de <i>L. infantum</i>	79
II.1.3. Test de cytotoxicité des extraits EASG et EBSG	82
Conclusion et perspectives.....	84
Références bibliographiques	
Résumé	

Liste des Figures

Figure 1 : Forme promastigote de <i>Leishmania</i>	04
Figure 2 : La forme amastigote de <i>Leishmania</i>	04
Figure 3 : Cycle de vie et transmission de la leishmaniose.....	06
Figure 4: Phlébotome femelle gorgé de sang.....	07
Figure 5: Modèle de la relation infection-état immunologique de l'hôte.....	09
Figure 6 : Distribution mondiale des leishmanioses.....	10
Figure 7 : schéma générale de la voie de shikimate	24
Figure 8 : Schéma générale de la voie de phénylpropanoïde.....	25
Figure 9 : Structures de quelques acides phénols.....	27
Figure 10 : structure de base des coumarines.....	28
Figure 11 : Structure de base de quelques tanins.....	29
Figure 12 : schéma simplifié des flavonoïdes.....	31
Figure 13 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	32
Figure 14 : Structure de quelques classes des flavonoïdes.....	33
Figure 15: Structure générale des anthocyanes (Le cation flavylum).....	34
Figure 16 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et La formation d'une structure stable.....	35
Figure 17: Protocole générale d'extraction	42
Figure 18: La distribution géographique des deux espèces <i>S.guyoniana</i> et <i>S.aurasiaca</i> dans le monde.....	58
Figure 19: Schéma générale de l'extraction de l'espèce <i>S.aurasiaca</i>	61

Figure 20 : Comparaison entre le contenu polyphénolique des phases des espèces <i>S.aurasiaca</i> et <i>St.guyoniana</i>	69
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de quercétine.....	71
Figure 22 : Comparaison du contenu en flavonoïdes des extraits des espèces <i>S.aurasiaca</i> . et <i>St guyoniana</i>	72
Figure 23 : Effet leishmanicide des extraits en fonction des différentes concentrations sur <i>L.major</i>	73
Figure 24 : Effet leishmanicide de l'extrait EASA en fonction de différentes concentrations sur <i>L.major</i>	74
Figure 25 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSA en fonction de différentes concentrations sur <i>L.major</i>	74
Figure 26 : Effet leishmanicide de l'extrait EASG en fonction de différentes concentrations sur <i>L.major</i>	74
Figure 27 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSG en fonction des différentes concentrations sur <i>L.major</i>	75
Figure 28 : Effet leishmanicide de l'extrait EASG en fonction de différentes concentrations sur <i>L.major</i>	76
Figure 29 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSG en fonction des différentes concentrations sur <i>L.major</i>	77
Figure 30: Effet leishmanicide des extraits en fonction de la concentration sur <i>L.</i> <i>infantum</i>	79
Figure 31 : Effet leishmanicide de l'extrait EASA en fonction de la concentration sur <i>L.</i> <i>infantum</i>	79

Figure 32 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSA en fonction de la concentration sur <i>L. infantum</i>	80
Figure 33 : Effet leishmanicide de l'extrait EASG en fonction de la concentration sur <i>L. infantum</i>	80
Figure 34 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSG en fonction de concentration sur <i>L. infantum</i>	80
Figure 35 : Test de cytotoxicité des extraits EASG et EBSG sur les cellules Thp1	82

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	22
Tableau 02: Quelques exemples de coumarines	28
Tableau 03 : Quelques polyphénols et flavonoïdes antileishmaniens.....	40
Tableau 04 : Quelques plantes antileishmaniennes	44
Tableau 05 : Quantités et rendement des phases organiques de l'espèce <i>Salvia aurasiaca</i>	68
Tableau 06 : Résultats de dosage des polyphénols totaux de l'espèce <i>S.aurasiaca</i>	69
Tableau 07: Résultats de dosage des polyphénols totaux de l'espèce <i>St. guyoniana</i>	69
Tableau 08 : teneur en flavonoïdes des extraits butanolique et acétate de <i>St. Guyoniana</i> et <i>S.aurasiaca</i>	71
Tableau 09 : calculs de l'IC ₅₀ leishmanienne des différents extraits	75
Tableau 10 : calculs des IC ₅₀ leishmanienne des deux extraits EASG et EBSG.....	77
Tableau 11 : calculs des IC ₅₀ leishmanienne des extraits pour <i>L. infantum</i>	81
Tableau 12 : Effet toxique des extraits EASG et EBSG (%) sur les cellules Thp-1.....	82

Introduction

Les maladies dues à des protozoaires, comme, le paludisme, la trypanosomiase et la leishmaniose constituent un problème majeur de santé publique dans le monde.

Les leishmanioses sont des anthroponoses endémo-épidémiques transmises par un diptère hématophage, le phlébotome femelle et qui infectent les macrophages de l'hôte. En Algérie, selon le Ministère de la Santé, un total de 7.784 cas de leishmaniose a été déclaré en 2008 où la maladie est passée de 29 cas pour 100.000 habitants en 1997 à 94 cas pour 100.000 habitants en 2008. Le pic d'alerte a été relevé en 2005 où 30.227 cas ont été recensés. C'est une maladie parasitaire pour laquelle les traitements disponibles reposent essentiellement sur des composés découverts il y a plus de 50 ans: les sels d'antimoine, l'Amphotéricine B et un composé d'utilisation récente issu de la recherche sur le cancer, la miltefosine mais qui ne peut pas être utilisée chez la femme enceinte. Ces médicaments sont coûteux, toxiques et les patients présentent des résistances de plus en plus importantes à ces traitements courants.

Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim, 2006). A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires pour la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997). Ce n'est pas qu'un simple effet de mode, mais un retour vers la nature s'appuyant sur des bases scientifiques (Bigo, 2011). Elles demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (Tabuti *et al.*, 2003).

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes. Parmi ces plantes médicinales, la famille des lamiacées dont la composition chimique, de diverses parties des plantes, a fait l'objet d'un grand nombre de publications (Kolak *et al.*, 2009 ; Kabouche *et al.*, 2005 ; Deineka, *et al.* 2004).

L'objectif de notre travail vise à mettre en évidence les propriétés antileishmaniennes de deux genres de Lamiacées : *Salvia* et *Stachys*. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la

quantification des composés phénoliques. Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antileishmanienne réalisée afin de déterminer l'efficacité des produits phénolique y compris les flavonoïdes, extraits des plantes *Salvia aursiaca* et *Stachys guyoniana*, contre les souches *Leishmania major* et *Leishmania infantum* incriminées respectivement dans les leishmanioses cutanée et viscérale en Algérie.

Revue
bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les leishmanioses

I.1. Définition

Sont regroupées sous le nom de « Leishmaniose », un groupe de parasitoses tropicales qui demeure encore aujourd'hui un grave problème de santé publique à travers le monde malgré les avancées de la recherche. Ce sont des maladies parasitaires dues au parasitisme des cellules mononuclées par des protozoaires flagellés (Del Giudice *et al.*, 2001). Ces parasites obligatoires dihéteroxyènes (Marignac, 2003) affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme (Dedet, 2001), auxquelles ils sont transmis par la piqûre infestante d'un insecte diptère vecteur hématophage de 2 à 4 mm de long, (Marty, 2002) appartenant au genre *Phlebotomus* dans l'Ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (Osman *et al.*, 2000). Cette maladie est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde, comme la dengue et la trypanosomiase africaine (Estevez, 2009).

I.2. Epidémiologie

I.2.1. Le parasite

I.2.1.1. Morphologie

Les leishmanies sont des protozoaires (unicellulaires), de l'ordre des Kinetoplastidea se caractérisant par la présence d'une organelle unique : le kinétoplaste qui est situé à la position basale adjacente au flagelle (prés de la poche flagellaire) et qui représente l'ADN mitochondrial (fragment d'ADN extranucléaire) (Pimenta *et al.*, 1991)

Les leishmanies présentent au cours de leur cycle de vie, 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.

➤ Le stade promastigote

Munie d'un flagelle antérieur, cette forme est issue de la forme amastigote aspirée par le phlébotome au cours d'un repas sanguin. Il s'agit d'un organisme allongé, d'environ 10 à 25µm de longueur. Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste est situé en

position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure (Figure 01). Cette forme se développe par scissiparité dans l'intestin moyen du phlébotome puis migre jusqu'au pharynx.. Le parasite est régurgité par l'insecte au moment de son repas sanguin. C'est la forme que l'on retrouve dans les milieux de culture.

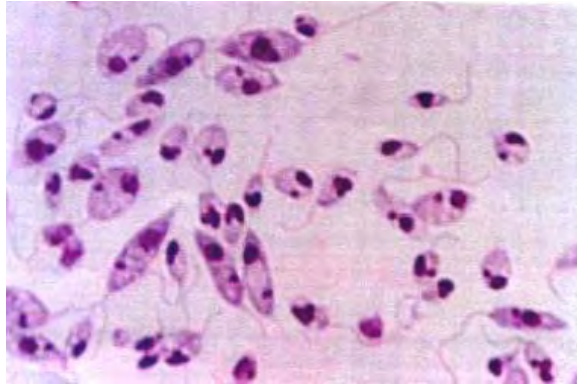


Figure 01 : Forme promastigote de *Leishmania* (www.alae.iquebec.com)

➤ **Le stade amastigote**

C'est la forme intracellulaire des leishmanies que l'on retrouve dans les cellules du système réticulo-histocytaire des hôtes vertébrés et dans les cellules mises en culture. Ce sont de petits corpuscules ovalaires ou arrondis de 2 à 6 μm de diamètre, immobiles, enveloppés d'une membrane bien définie, présentant un noyau, un kinétoplaste et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur (Figure 02).

La paroi des leishmanies est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne et renferme des composants jouant un rôle important dans l'endocytose des parasites et dans les phénomènes immunologiques accompagnant les infections leishmaniennes. Le cytoplasme contient une kinase jouant un rôle dans la survie des leishmanies dans les cellules parasitées (Euzéby, 2008).

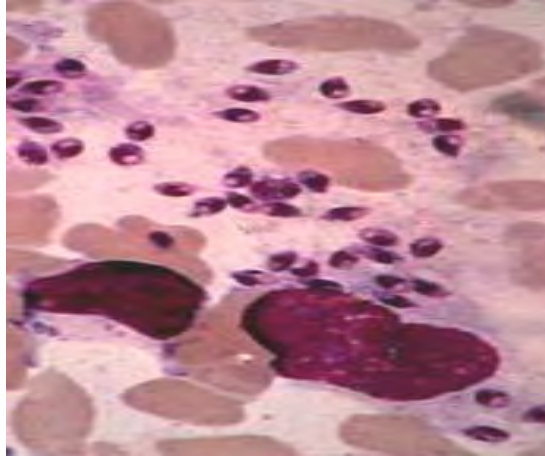


Figure 02 : La forme amastigote des *Leishmania*(www.parasitologie.univ-montpl.fr)

I.2.1.2. Biologie

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les nœuds lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse. Elles sont rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage. Se multiplient à l'intérieur des macrophages. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage : les parasites sont alors libérés puis phagocytés par d'autres macrophages. Ceci conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme (Bussiéras *et al.*, 1992 ; Slappendel *et al.*, 1998).

I.2.1.3. Le cycle évolutif

Quelle que soit l'espèce, le cycle de reproduction des *Leishmania* est sensiblement le même. Cependant, il existe une grande variabilité dans les hôtes, les vecteurs (plus de 30 espèces de phlébotomes (Sharma *et al.*, 2008) et les manifestations cliniques.

Les promastigotes contenus dans le tube digestif du phlébotome sont injectés à l'humain lors d'un repas sanguin. Ils sont ensuite phagocytés par les macrophages, et à ce stade, dans le phagolysosome macrophagien, a lieu la transformation en amastigotes. Ces amastigotes, dépourvus de moyens de locomotion, se multiplient au sein du macrophage. Après la piqûre, le sang peut transporter des parasites qui seront hébergés dans d'autres cellules que les macrophages. Les fibroblastes des ganglions lymphatiques sont les principales cellules mises en cause, et seraient responsables de la persistance du parasite dans l'organisme après la guérison (Bogdan *et al.*, 2000 ; Nicolas *et al.*, 2000).

Les macrophages infestés sont ensuite réabsorbés par un phlébotome lors d'un repas sanguin, et les amastigotes qu'ils contiennent sont libérés et vont se transformer en promastigotes (Figure 03).

De nombreux animaux, essentiellement des mammifères, sont hôtes de ces parasites. Certains développeront des signes cliniques (hôtes secondaires) alors que certaines espèces seront porteuses saines (hôtes primaires).

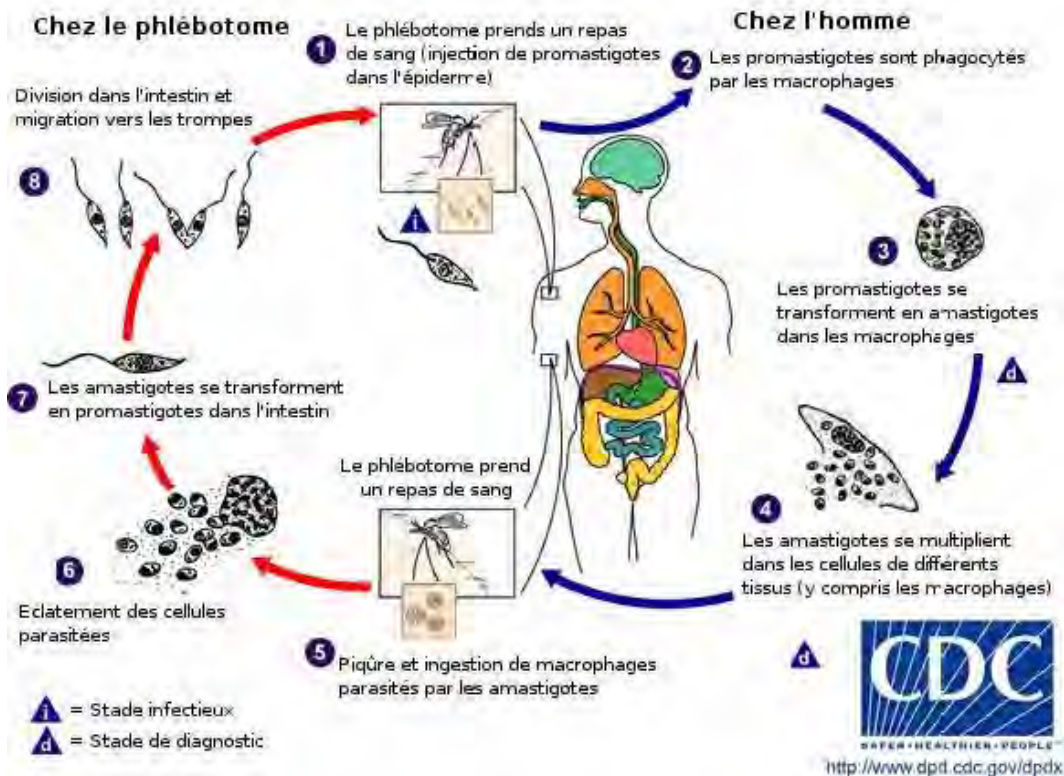


Figure 03 : Cycle de vie et transmission de la leishmaniose (www.dpd.cdc.gov/dpdx)

I. 2. 1. 4. Classification et taxonomie

La classification des leishmanies a été établie par Levine *et al.* en 1980 (Pratlong *et al.*, 1999). Selon l'OMS (1999), le parasite *Leishmania* appartient au :

- **Règne:** Protista
- **Sous-Règne:** Protozoa
- **Phylum:** Sacromastigophora
- **Sous-phylum:** Mastigophora
- **Classe:** Zoomastigophara
- **Ordre :** Kinetoplastida
- **Sous –ordre :** Typanosomatina
- **Famille:** Typanosomatidae
- **Genre :** *Leishmania*

1.2.2. Le vecteur

Il représente un maillon important dans la chaîne de transmission. Diptères nématocères de la famille des Psychodidae, les phlébotomes sont, à l'état adulte, des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps : 1,5 à 4mm) (Figure 4). Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne. Seule la femelle, hématophage, 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, 2001).



Figure 4: Phlébotome femelle gorgé de sang
(ANOFEL 3)

1.2.3. Le réservoir

Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés. Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres : canidae, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates ou périssodactyles. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite (Dereure, 1999).

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet comme réservoir le chien (Belazzoug *et al.*, 1984 ; Belazzoug *et al.*, 1985 ; Belazzoug *et al.*, 1987) ont confirmé le rôle joué par cet animal et ont fait la corrélation entre foyer de leishmaniose canine et leishmaniose viscérale

humaine. La leishmaniose canine concernant tout le territoire national avec une prévalence variant d'une région à l'autre.

Le réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages gerbillidés. Le premier étant *Psammomys obesus*, naturellement infesté par *Leishmania major* (Belazzoug, 1983), et le second : *Meriones shawi* au niveau du foyer de Ksar Chellal (Belazzoug, 1986). Quant à la leishmaniose cutanée variant enzymatique de *L. infantum*, le réservoir est le chien.

1.2.4. Réponse immunitaire chez l'hôte vertébré

Les leishmanioses se caractérisent par un spectre clinique de phénotypes différents qui dépend de la réponse immune de la part de l'hôte pouvant aller de lésions à cicatrisation spontanée jusqu'à destruction des muqueuses (Reithinger *et al.*, 2007).

Après leur entrée dans l'organisme, les promastigotes sont capturés par les cellules phagocytaires (cellules dendritiques, macrophages). C'est la réponse immunitaire non spécifique. Ces cellules présentent alors des antigènes leishmaniens aux lymphocytes T via le complexe majeur d'histocompatibilité et enclenchent la réponse acquise, spécifique. Cette réponse va différer selon les protéines leishmanienne présentées. Un nombre élevé de cellules relais et de cytokines entrent en jeu pour réguler l'infection et tous ces aspects sont encore loin d'être élucidés (Sacks *et al.*, 2002 ; Banuls *et al.*, 2007). La destruction du parasite dans le macrophage après activation semble médiée par deux voies principales, celle du monoxyde d'azote (NO) produit lors de la poussée oxydative, et celle du facteur nécrosant les tumeurs α (TNF α). Ces deux voies sont diversement activées ou freinées par les différentes cytokines (Mossalayi *et al.*, 1999). Selon la nature de la réponse immunitaire prépondérante, les manifestations cliniques seront différentes. Schématiquement, une réponse médiée principalement par les cellules T auxiliaires 1 (TH1) entraînera des formes cutanées à guérison spontanée (Figure 05). L'absence de réponse TH1 (plutôt qu'à présence de réponse TH2) donnera lieu à des formes cutanées diffuses, et la superposition des voies TH1 et TH2, associée à une présence élevée d'interféron γ évoluera vers les formes mucocutanées (Banuls *et al.*, 2007).

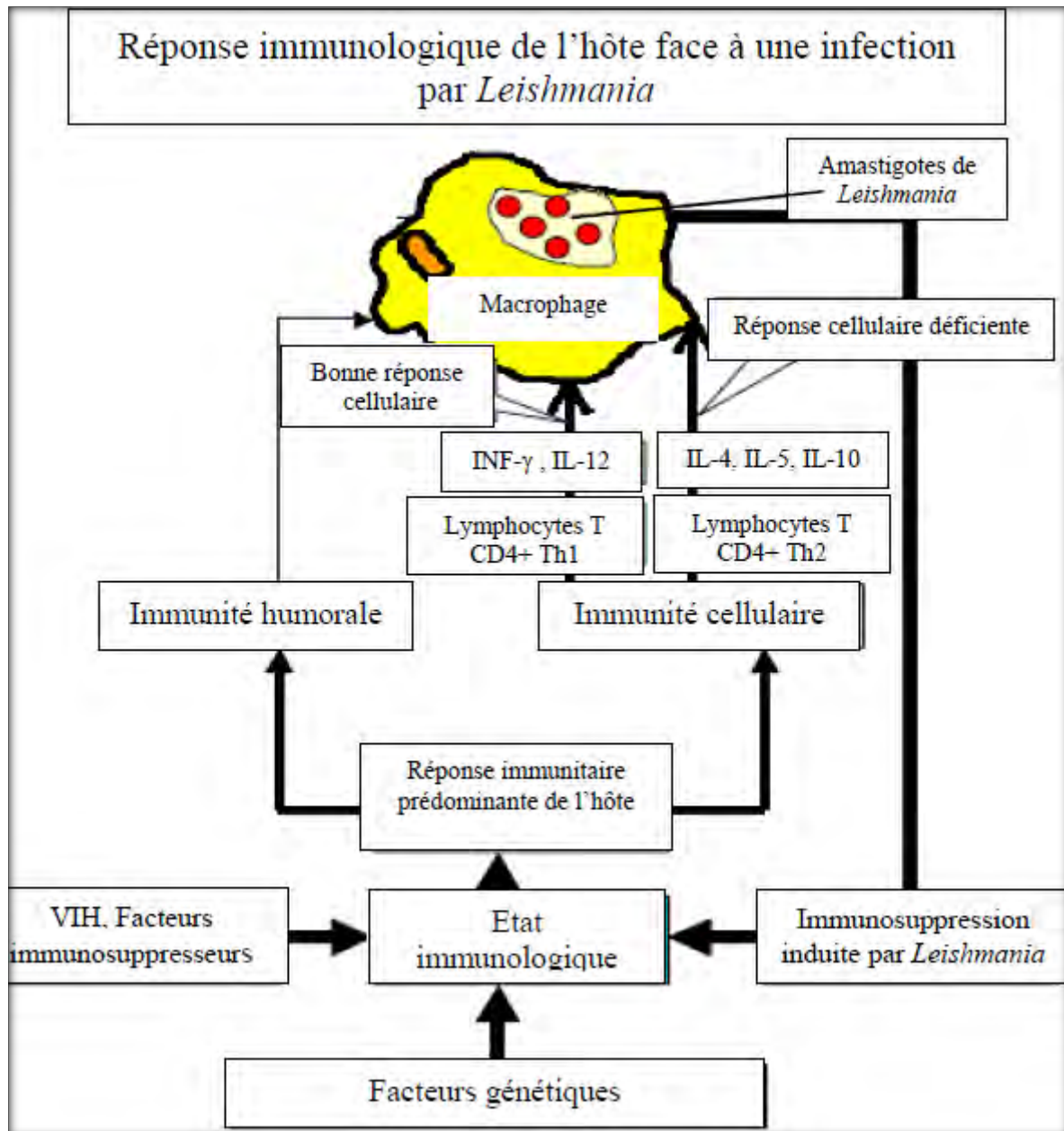


Figure 05: Modèle de la relation infection-état immunologique de l'hôte (INS, 2000).

1.2.5. Distribution géographique des leishmanioses

Les leishmanioses connaissent une aire géographique globalement circumterrestre, mais débordant largement sur les zones tempérées d'Afrique du Nord, du Sud de l'Europe et d'Asie. Présentes sur cinq continents dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays : 16 sont des pays industrialisés et 72 des pays en développement, dont 13 parmi les pays les moins développés (Desjeux *et al.*, 2001) (Figure 06).

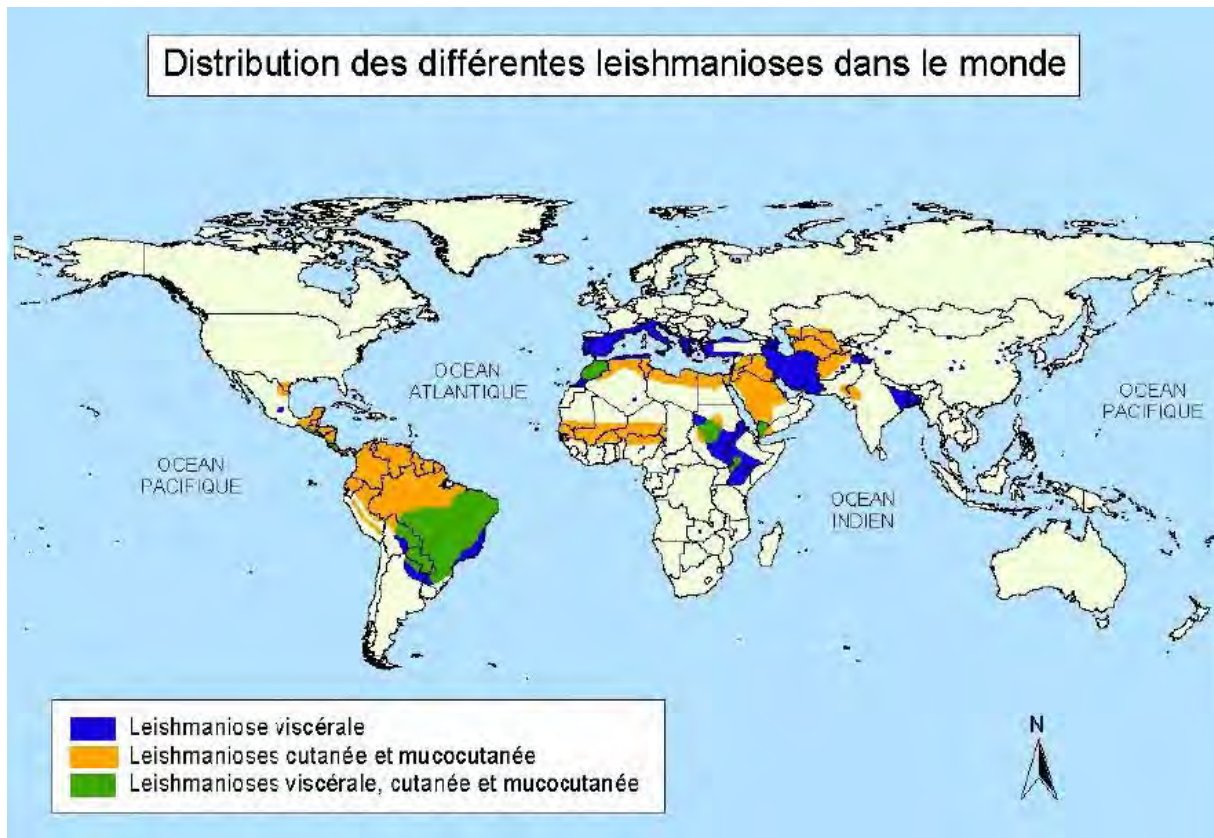


Figure 06 : Distribution mondiale des leishmanioses (Handman, 2001)

On distingue deux grandes situations géographiques : l'Ancien monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche Orient et Asie) et le Nouveau monde (Amérique du Nord, du Sud et Centrale). Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes, mais ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania* (Handman, 2001)

En Algérie, deux types de leishmanioses sévissent à l'état endémique : la leishmaniose cutanée sous ses deux formes (leishmaniose cutanée zoonotique et la leishmaniose cutanée du nord) et la leishmaniose viscérale. Elles rentrent dans des complexes épidémiologiques différents, faisant intervenir des vecteurs et des réservoirs de parasites bien distincts.

I.2.6. Formes cliniques des leishmanioses

I.2.6.1. La leishmaniose viscérale (LV)

Appelée également kala azar c'est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l'absence de traitement. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulière, une perte de poids importante, une hépato-splénomégalie (augmentation du

volume de la rate et du foie) et de l'anémie. Il existe deux formes cliniques de leishmaniose viscérale : la LV infantile et la LV de l'adulte, l'agent causal étant *Leishmania infantum*.

I.2.6.2. La leishmaniose cutanée (LC)

En général, les caractéristiques cliniques de la leishmaniose cutanée ne sont pas uniformes dans toutes les régions ni même à l'intérieur d'une région donnée, par suite de différences touchant à l'espèce parasitaire ou aux types zoonotiques en cause. La lésion classique débute sous forme d'un nodule au point d'inoculation. Une croûte se forme au centre et, si elle est arrachée, elle révèle une ulcération qui évolue vers la guérison au prix d'une cicatrice profonde présentant une altération de la pigmentation. Les nodules satellites au bord de la lésion sont caractéristiques (Mihoubi, 2006). Il existe deux formes distinctes de la LC : la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), appelé aussi « clou de Biskra » et la leishmaniose cutanée du nord (LCN), connue sous l'appellation de « clou de Mila). Elles admettent, respectivement, comme agent causal *L. major* et *L. infantum* (Harrat *et al.*, 1996) et aussi *L. tropica*. L'Algérie, comme d'autres pays méditerranéens, est fortement concernée par ces zoonoses qui sont classées dans notre pays parmi les maladies à déclaration obligatoire (Harrat *et al.*, 1995) De part sa situation géographique bioclimatiques (Stewart, 1974), caractérisée par plusieurs étages allant du climat méditerranéen au nord au climat saharien au sud, en passant par de vastes zones semi arides et arides, et d'autre part, par sa forte population rurale, présente un terrain favorable à l'émergence de plusieurs formes cliniques de la maladie. En Algérie, les espèces responsables des deux formes cliniques de leishmaniose appartiennent à deux complexes distincts : le complexe *L. infantum* et le complexe *L. major*.

I.2.6.3. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

Cette forme produit des lésions cutanées étendues nodulaires, non ulcérées, pseudolépromeuses, anergiques et particulièrement difficiles à traiter. Cette forme de la maladie est attribuée aux espèces *L. aethiopica* et *L. amazonensis*.

I.2.6.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

Limitée géographiquement au continent sud-américain, la LCM, appelée Espundia, est due à *L. braziliensis* (Mihoubi, 2006). C'est une atteinte cutanée initiale classique, puis 1 à 40 ans plus tard, apparaissent des métastases muqueuses de la sphère ORL (nez, bouche), entraînant une perforation de la cloison nasale (Sacks *et al.*, 2001).

I.2.6.5. La leishmaniose canine

La leishmaniose canine est une atteinte assez commune du chien dans des foyers où sévit la leishmaniose viscérale humaine. Des études portant sur des chiens soumis à des conditions d'infestation en milieu naturel ont permis de démontrer que l'affection débute par un chancre d'inoculation, surviennent ensuite des lésions qui peuvent apparaître après 1 à 6 mois d'incubation (Kilicki, 1999).

I.3. Diagnostic des leishmanioses

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son acide désoxyribonucléique (ADN), et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants ou hypersensibilité retardée (Le Fichoux *et al.*, 1999).

I.3.1. Examen microscopique

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. On y reconnaîtra le noyau de couleur pourpre et le kinétoplaste juxta nucléaire plus foncé (Murray *et al.*, 2005). Les frottis seront faits à partir de matériel prélevé par ponction de moelle osseuse, de rate ou de lymphé dermique. Pour les lésions cutanées, le prélèvement se fera par raclage au vaccinostyle à la périphérie de la lésion (Mihoubi *et al.*, 2006). Les frottis fixés au méthanol, seront colorés au May Grünwald Giemsa. Réalisé par un opérateur expérimenté, la microscopie semble être le meilleur examen pour le diagnostic (Del Giudice *et al.*, 1998).

I.3.2. Culture

Elle permet la croissance des formes promastigotes, dans des milieux d'isolement appropriés (Werry, 1995). 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.

D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI qui donne d'excellents résultats avec un minimum de risque de contamination. Tous ces milieux sont additionnés d'antibiotiques : pénicilline streptomycine ou pénicilline- gentamycine et exceptionnellement d'antifongiques, la 5-fluorocytosine (Bachi, 2001).

I.3.3. Inoculation aux animaux

Le hamster doré de Syrie et le cobaye sont les animaux les plus réceptifs. L'inoculation se fera dans le coussinet plantaire pour les parasites de la peau, par voie intra péritonéale pour les parasites viscéraux. Une période pré-patente de plusieurs semaines est souvent observée. Les animaux sont aussi utilisés comme intermédiaire entre un prélèvement impossible à stériliser et la mise en culture, lorsqu'il est important d'isoler la souche (Wery, 1995).

I.3.4. Techniques modernes permettant la détection du parasite

Elles permettent de mettre en évidence d'infimes quantités de matériel génomique parasitaire dans un prélèvement (ponction ou biopsie). Elles permettent aussi de déterminer avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable (Mihoubi *et al.*, 2006). La détection des antigènes excrétés par les amastigotes se fera par des anticorps monoclonaux et celle des acides nucléiques du parasite, par hybridation moléculaire (sondes marquées aux isotopes) ou amplification de séquences identifiées (PCR) suivie d'hybridation.

I.3.5. Examens sérologiques

De nombreuses techniques immunologiques sont utilisées dans le diagnostic de la LV. Elles font appel à des antigènes de nature et de modalités de préparation variées. Les préparations contiennent soit des antigènes figurés, soit des extraits antigéniques.

De nombreuses réactions immunologiques ont été utilisées. Les plus courantes sont les réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI), d'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), d'électrosynérèse (ES), d'agglutination indirecte (DAT) et d'hémagglutination indirecte (HAI) (Dedet, 2001) le Western Blot (W.B.) (Mihoubi, 2006).

I.3.6. Intradermo-réaction de Monténégro à la leishmanine

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée provoquée par l'injection intradermique de promastigotes de culture, lavés et mis en suspension dans une solution saline contenant 0,5% de phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance (il n'y a pas de spécificité d'espèce). La « leishmanine » contient un million de parasites par ml. La dose individuelle comporte 0,1 ml, c'est-à-dire, 100.000 parasites. Une injection de 0,1 ml de solution phénolée sans parasites est faite à proximité, comme témoin d'une éventuelle sensibilité du patient au phénol.

Après 48 à 72 heures, une réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème. On facilite la mesure en traçant au bic, sur la peau avoisinante et suivant les diamètres, des lignes

qui s'arrêtent au bord de l'induration. Les degrés sont exprimés de 1 à 4, d'après le diamètre (de <4 mm à > 8 mm).

Cette réaction est positive chez les sujets ayant fait une leishmaniose viscérale antérieurement. Elle reste positive après la guérison pendant toute la vie du patient et est utilisée en épidémiologie du Kala-azar. Pour les leishmanioses cutanées, elle peut aider au diagnostic (Wery, 1995).

I.4. Traitement des leishmanioses

I.4.1. Traitement de première intention

Les traitements de premières intentions font appel à des sels d'antimoine : le N-méthyl glucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostan®) dont les teneurs en antimoine pentavalent (SbV) sont respectivement de 8,5% (85 mg/ml) et 10% (100 mg/ml), la dose prescrite par l'O.M.S de SbV est de 20 mg/Kg/jour. A cette dose, le SbV peut provoquer des problèmes de santé comme la cardio-toxicité et la néphro-toxicité. De plus, certaines souches de *Leishmania* responsables de leishmaniose cutanée et mucocutanée ont démontré des résistances à ces médicaments (Grogl *et al.*, 1992).

Ces produits ont une action inhibitrice sur la formation de l'ATP et nécessitent une conversion intracellulaire en SbIII (antimoine trivalent) pour être actif. Il vient d'être démontré que l'antimoine trivalent est un inhibiteur de la trypanothione réductase du parasite, enzyme présente seulement chez le parasite (Baiocco *et al.*, 2009).

I.4.2. Traitement de seconde intention

Les traitements de seconde intention sont l'usage de l'amphotéricine B ou de la pentamidine. C'est un puissant antifongique capable de modifier la perméabilité de la membrane parasitaire en agissant sur l'ergostérol par affinité permettant la formation de pores aqueux mais aussi capable de stimuler la production d'IL en agissant sur les récepteurs Toll-like (Sau *et al.*, 2003). La pentamidine bloque, quant à elle, la thymidine synthétase et par conséquent la synthèse de l'ADN parasitaire et se fixe sur l'ARN de transfert. Il semblerait que la cible de la pentamidine soit un composant de la mitochondrie (Basselin *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2006). Ces médicaments présentent une toxicité supérieure à celle des sels d'antimoine et nécessitent une prise en charge hospitalière. Le traitement par AmBisome, amphotéricine B liposomale, moins toxique, ne présente quasiment pas d'effet (W.H.O, 2007).

De nouveaux produits ont montré récemment des résultats très intéressants, notamment la miltéfosine dont le mode d'action n'est pas encore totalement déterminé mais qui laisse supposer une action sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine (Croft *et al.*, 2003). Généralement, la miltéfosine est employée contre les LV (W.H.O. 2007).

L'avantage de ce médicament est qu'il permet un traitement oral (2,5 mg/kg/jour) avec des effets secondaires négligeables et qu'il présente des taux de réussite élevés (Berman, 2005).

Chapitre II : Les plantes médicinales et la phytothérapie

Depuis des siècles, la phytothérapie, le traitement par les plantes, est à la base de la médecine. Les plantes sont certes là pour nous permettre de nous soigner, mais également pour favoriser le bon fonctionnement de notre organisme (Bigo, 2011).

I.1. Les plantes médicinales

II.1.1. Définition

Les plantes médicinales sont des plantes dont un des organes (feuille, écorce) possède des vertus curatives et parfois toxiques selon son dosage. Les plantes médicinales sont les plantes utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs, elles peuvent être vendues en herboristerie, en pharmacie, avec ou sans prescription selon la réglementation du pays .

II.1.2. Les plantes médicinales et leurs utilisations

Les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Cette connaissance ancestrale fut à l'arrivée de la médecine traditionnelle mise de côté au profit de la prise de médicaments d'ordonnance souvent plus puissants et agissant plus rapidement que la médecine traditionnelle utilisée auparavant. Par contre, aujourd'hui nous assistons au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé. Chaque plante médicinale a une définition qui lui est propre et une utilisation spécifique. (Kansole, 2009).

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent, en effet, des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus.

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisées directement comme des agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Decaux, 2002). Par exemple : la tubocurarine, le relaxant musculaire le plus puissant, est dérivé du curare (*Chondrodendron tomentosum*) ;

l'analgésique le plus puissant, est tirée du pavot à opium (*Papaver somniferum*) et la cocaïne utilisée comme anesthésiant est tirée du coca (*Erythroxylum coca*) (Fouché, 2000). L'OMS estime qu'environ 80% de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaires. Plus de la moitié de la population mondiale utilise principalement des plantes médicinales pour se soigner (Sheng-Ji, 2001). Au moins 35 000 espèces végétales sont utilisées dans le monde à des fins médicales. Les plantes médicinales servent pour la production de produits pharmaceutiques, thés, onguents, crèmes et autres produits naturels. Environ 90 espèces servent à la production des médicaments industriels les plus importants et les remèdes traditionnels utilisés dans les pays en développement sont généralement élaborés à partir de mélanges d'herbes issus de collectes sauvages (Farnsworth *et al.*, 1991). Les plantes sont donc la source principale de substances actives, et pas uniquement dans la médecine traditionnelle (Palomo, 2011).

II.2. La phytothérapie

II.2.1. Définition

La phytothérapie, selon Bruneton (1999), est le traitement par les plantes ; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation de produits préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection de molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif mais tout ce que contient la plante. Par ailleurs la phytothérapie requiert une connaissance parfaite de substances chimiques contenues dans un organe végétal et une bonne connaissance de mode d'emploi. On peut distinguer la phytothérapie utilisée dans une pratique traditionnelle, parfois très ancienne, basée sur l'utilisation de plantes ayant des vertus découvertes empiriquement de la phytothérapie basée sur les études scientifiques recherchant les principes actifs des plantes et leurs effets (Kansole, 2009).

II.2.2. Les différents types de phytothérapie

On peut distinguer différents types de thérapies par les plantes :

- La phytothérapie : l'utilisation des différentes parties des plantes (racine, feuilles, fleurs...ou la plante entière) sous différents formes galéniques.
- La gemmothérapie : l'utilisation des bourgeons de la plante.
- L'aromathérapie : l'utilisation des huiles essentielles obtenues grâce à divers procédés d'extraction. (Vernex-Lozet, 2011).

- Phytothérapie pharmaceutique : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (Strang, 2006).

II.2.3. Les intérêts de la phytothérapie

Tout d'abord, la phytothérapie est une indication de premier plan, c'est-à-dire qu'elle peut représenter un mode thérapeutique à elle seule. On retrouve par exemple cela avec le millepertuis dans la dépression légère, l'aubépine dans les troubles mineurs du rythme cardiaque, le ginkgo et la vigne rouge dans l'insuffisance veineuse, ou encore les plantes à mucilages ou à dérivés anthracéniques dans la constipation . La phytothérapie est aussi utilisée en thérapeutique de second plan, comme adjuvant en complément d'un traitement plus puissant. Par exemple, dans le cas d'une hypertension artérielle mineure, on peut employer une préparation à base des feuilles d'olivier en plus d'un traitement antihypertenseur. Enfin, la phytothérapie est utilisée en traitement de troisième plan, en traitement de terrain. Elle permet alors de prendre en charge une maladie dans sa globalité, et également en prévention. C'est le cas par exemple pour l'utilisation de plantes immunostimulantes (comme l'échinacée), ou encore des plantes riches en vitamines et oligoéléments (Duriez F, 2000). Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la Diagoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Iserin *et al.*, 2001).

Le grand intérêt de la phytothérapie est la bonne tolérance des plantes, lorsque celles-ci sont utilisées aux bonnes posologies. De plus, l'utilisation des plantes en tant que médicaments est souvent basée sur des observations empiriques et des traditions qui datent parfois de milliers d'années. Les effets secondaires, le plus souvent peu marqués, sont donc généralement mieux connus que pour les molécules de synthèse (Arnal-Schnebelen, 2004).

II.2.4. Composant à effet thérapeutique

Le composant à effet thérapeutique est une substance, ou un groupe de substances qui est défini chimiquement, et dont la contribution à l'effet thérapeutique est connue (Anton R, 2003).

II.2.5. Drogue végétale

La drogue végétale est la substance de la plante fraîche ou desséchée, utilisée en thérapeutique. Cette partie se trouve le plus souvent à l'état sec. On retrouve parfois la plante entière, mais le plus souvent ce sont des parties de plantes comme les fleurs, les fruits, les feuilles, les sommités fleuries, la racine, l'écorce. On retrouve également les exsudats comme le latex, le baume, la gomme, mais qui ne doivent avoir subi aucun traitement. Les drogues végétales sont définies par la dénomination scientifique (genre, espèce, variété, auteur). On les obtient à partir de plantes cultivées ou de plantes sauvages. Leur qualité est garantie si les conditions de culture, de récolte, de collecte, de séchage, de fermentation, et de stockage, sont respectées. On les identifie par identification macroscopique, microscopique (Bailleul, 2009).

II.2.6. Préparation à base de drogue végétale

La préparation à base de drogue végétale est obtenue après que la drogue ait subi divers traitements de fractionnement, de purification, ou de concentration, tels que la coupe fine, le broyage, le tamisage, l'extraction par solvant, la distillation, l'expression, ou encore le fractionnement partiel. Les extraits, les teintures, les huiles essentielles, les huiles grasses, certaines poudres, et certains jus végétaux, sont donc des préparations à base de drogue végétale. Cependant, les composés purs, isolés, chimiquement définis et extraits des drogues végétales (comme la rutine), ou même les produits en mélange (comme les ginsénosides), ne sont pas des préparations à base de drogue végétale, mais ce sont des produits purs. Ils ne font donc pas partie de la réglementation de la phytothérapie. Par ailleurs, les solvants, les diluants, et les conservateurs peuvent faire partie des composants des préparations à base de drogue végétale. Mais leur présence doit être indiquée (Bailleul, 2009).

Chapitre III : Métabolites secondaires et pharmacodynamique

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires.

La pharmacodynamie (discipline qui étudie l'effet des médicaments sur l'organisme) est utile pour justifier l'activité des principes actifs isolés ou associés. Par ailleurs, pour toute utilisation de plantes, il faut recourir soit à des médecins soit à des pharmaciens compétents dans ce domaine (Kansole, 2009).

Les métabolites secondaires peuvent être classés en 3 principales familles : les alcaloïdes, les terpènes, et les polyphénols.

III.1. Les terpènes

Les terpènes (= Terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire (Paris *et al*, 1965). Ce sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (Bruneton, 1999). A ce jour, avec plus de 30000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre :

- Monoterpènes qui comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone
- Sesquiterpènes qui contiennent 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone
- Diterpènes qui comportent 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone
- Sesterpènes qui comptent 25 atomes de carbone
- Triterpènes qui comportent 30 atomes de carbone
- Tétraterpènes qui contiennent 40 atomes de carbone.

III.2. les alcaloïdes

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur et leur véritable valeur ne s'affirme qu'entre les mains du médecin car ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques. Selon leur composition chimique et surtout leur structure moléculaire, les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes :

- des phénylalanines: capsaïcine du piment, colchicine du colchique;
- des alcaloïdes isoquinoléiques : morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine contenues dans l'opium du pavot; et des alcaloïdes indoliques: ergométrine, ergotamine, ergotoxine de l'ergot des céréales;
- des alcaloïdes quinoléiques : tige feuillée de la rue commune;
- des alcaloïdes pyrimidiques et pipéridimiques : ricinine du ricin, trigonelline du fenugrec, conine (poison violent) de la ciguë;
- des alcaloïdes dérivés du tropane : scopolamine et atropine de la belladone;
- des alcaloïdes stéroïdes: racine de véatrate, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (Seghiri, 2005).

III.3. Les composés phénoliques

C'est une vaste famille qui regroupe des composés non azotés présentant des cycles aromatiques, le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme de glycoconjugués. Elle comprend des petits composés biologiquement actifs comme l'acide salicylique et certaines isoflavones, des composés présents dans certaines huiles essentielles (en association avec des terpènes à faible poids moléculaire), mais aussi des composés anti-nutritionnels comme les tannins, et la lignine, un polymère de haut poids moléculaire formé à partir d'unités dérivées de l'acide cinnamique.

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont l'un des plus importants groupes rencontrés dans les plantes, ou leur distribution est considérablement large comprenant au moins 8000 différentes structures connues (Bravo, 1998). Ces composés sont aussi un produit du métabolisme secondaire des plantes. Ils présentent des effets anticarcinogénétique, anti inflammatoire, anti athérogène antithrombotique, modulations immunitaire et des activités analgésiques (Tableau 1) et entre autres, ils exercent ces effets comme étant des antioxydants (Catapano, 1998).

Les fonctions principales attribuées à ces polyphénols chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant aussi (Lebham, 2005).

Tableau 1: Activités biologiques des composés polyphénoliques (Bahorun, 1997)

Polyphénols	Activité
Acides phénoliques(cinnamiques et benzïloques)	Antibactérienne Antifongique Antioxydante
Coumarines	Protectrice vasculaire et antioedémateuse
Flavonoïdes	Antitumorale Anticarcinogène Anti-inflammatoire Hypotenseur et diurétique Antioxydante
Anthocyanes	Protectrice capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydante Antitumorale Antifongique Anti-inflammatoire
Tanins gallique et cathéchiques	Antioxydante

En général, on peut les diviser en, au moins, 10 types selon leur structure de base : les phénols simples, les acides phénoliques, les coumarines et les isocoumarines, les naphthoquinones, les xanthones, les stilbènes, les anthraquinones, les lignines et les flavonoïdes qui constituent la classe la plus importante des polyphénols avec plus de 5000 molécules déjà décrite (Wollgast *et al.*, 2000).

III.3.1. Biosynthèse des polyphénols

La synthèse des polyphénols suit généralement deux voies: la voie de shikimate et celle du phénylpropanoïde.

III.3.1.1. La voie de shikimate

C'est la voie de biosynthèse principale des composés aromatiques. Cette voie du shikimate est très spécifique des végétaux et conduit à la synthèse des trois acides aminés essentiels suivants : tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Figure 07) (Kening *et al.*, 1995).

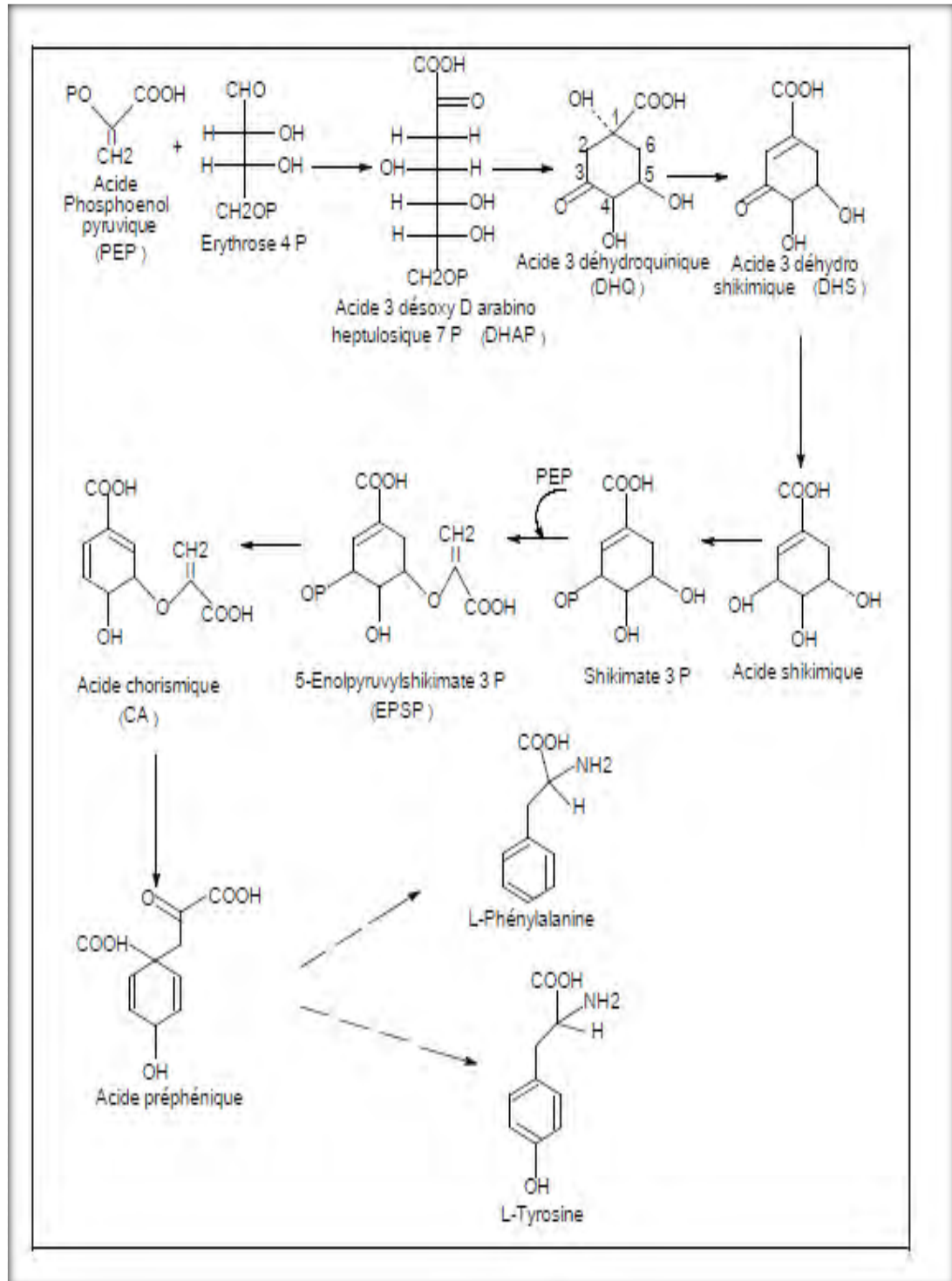


Figure 7 : Schéma général de la voie de Shikimate (Floss, 1997).

III.3.1.2. La voie des phénylpropanoïdes :

La voie de phénylpropanoïde (Figure 08) commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

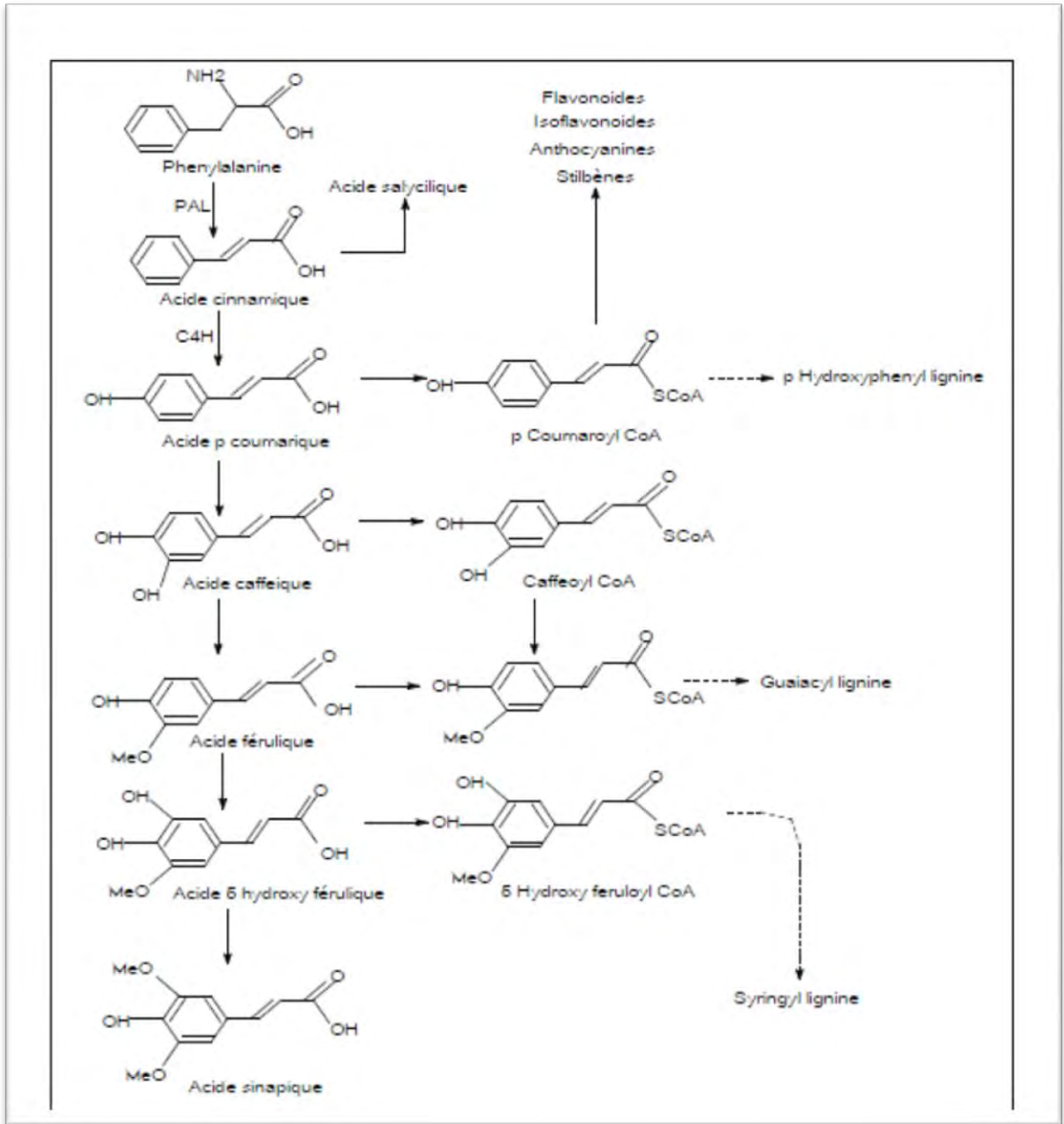


Figure 8 : Schéma général de la voie de phénylpropanoïde (Hoffmann *et al.*, 2004)

En plus de la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte : (les flavonoïdes) est considérablement accrue. (Martin *et al.*, 2002)

III.3.2. Principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par :

- La complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées)
- Le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, ...)
- Les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines ou autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques)

III.3.2.1. Les acides phénols

Les acides phénols (Figure 09) sont des dérivés de l'acide cinnamique, et l'acide benzoïque. Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires, anti radicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, Cholérétique, et immunostimulants (Bruneton, 1999).

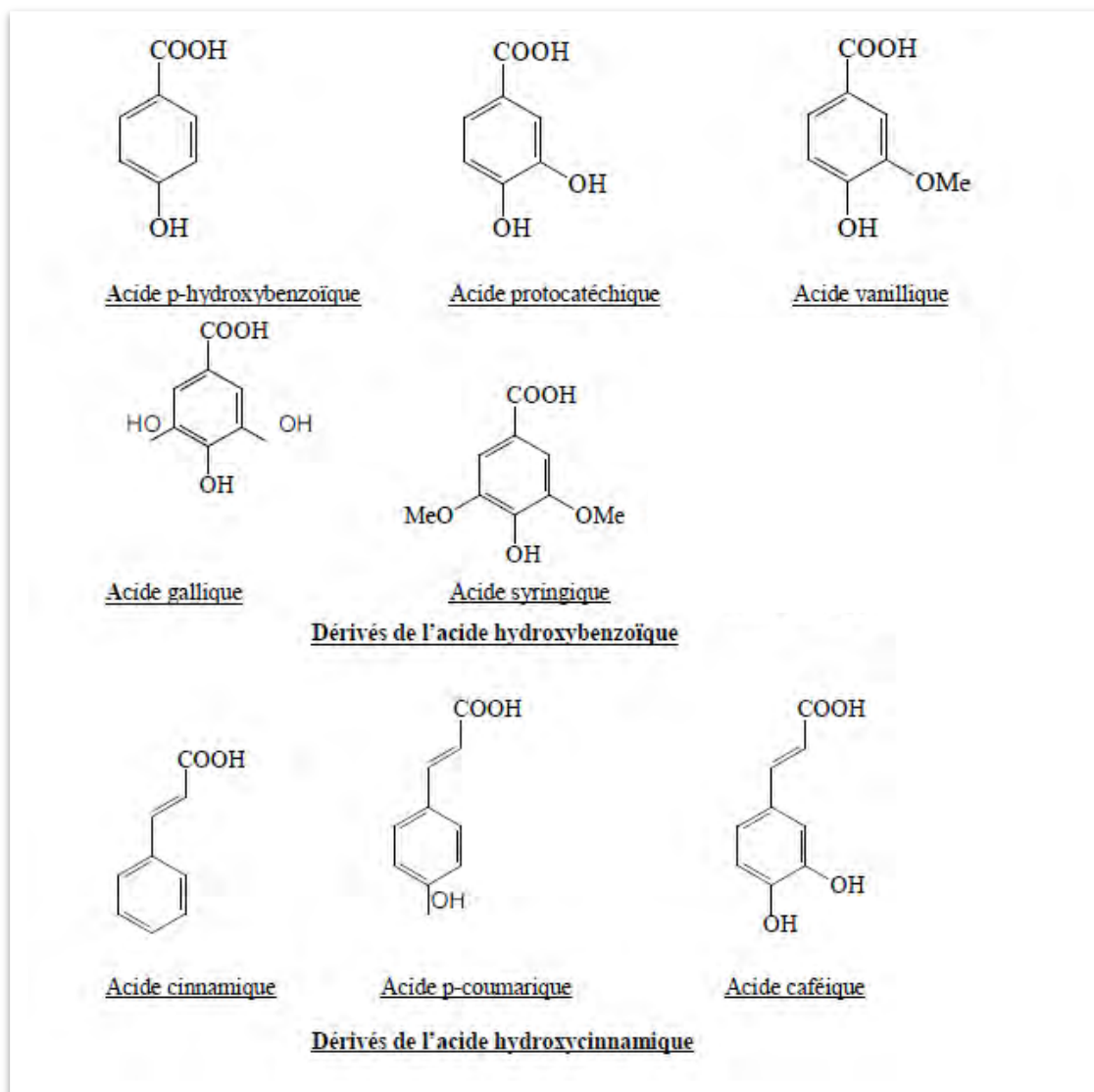


Figure 09 : Structures de quelques acides phénols (Gonzalez *et al.*, 1997)

III.3.2.2. Les coumarines

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique (Figure 10). Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Elles ont un spectre UV caractéristique.

Les coumarines (Tableau 02) présentent des effets cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives, elles sont aussi bénéfiques en cas de affections cutanées. (González-Gallego *et al.*, 2007).

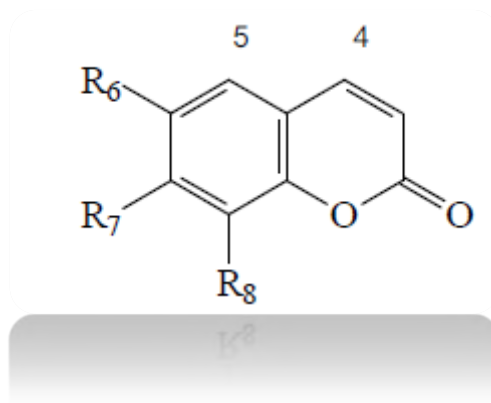


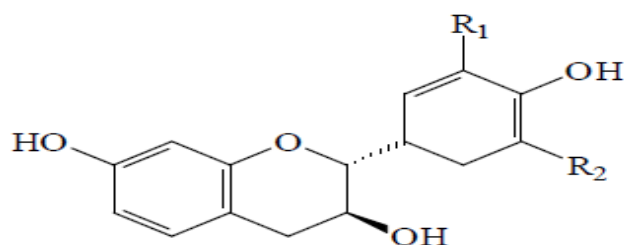
Figure 10 : structure de base des coumarines
(González-Gallego *et al.*, 2007)

Tableau 2: Quelques exemples de coumarines

Nom de coumarine	R ₆	R ₇	R ₈
Ombelliférone	H	OH	H
Herniarine	H	OCH ₃	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH ₃	OH	H
Scopanone	OCH ₃	OCH ₃	H
Fraxétol	OCH ₃	OCH ₃	OH

III.3.2.3. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux et surtout les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (Figure 11) (Hemingway, 1992). Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides. Ils sont abondants dans les organes végétaux jeunes. Deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins vrais (non hydrolysables). Certains tanins auraient des propriétés antioxydantes et bactériostatiques (Nacoulma, 1996).



$R_1 = R_2 = H$: Afzéléchol

$R_1 = OH$; $R_2 = H$: Catéchol

$R_1 = R_2 = OH$: Gallocatéchol

Figure 11 : Structure de base de quelques tanins.

III.3.2.3.1 Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters du glucose et d'acides phénols que sont l'acide gallique (tanins galliques) et l'acide éllagique (tanins éllagiques). Leurs polymères sont appelés des tannoïdes. Ils sont caractéristiques des Angiospermes dicotylédones. (Nacoulma, 1996).

III.3.2.3.2. Les tanins non hydrolysables

Les tanins vrais, non hydrolysables sont des polymères de flavonols (catéchols) et de proanthocyanidols qui donnent par ébullition avec les acides minéraux dilués des composés insolubles amorphes et de couleurs rouges appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (Nacoulma, 1996).

III.3.2.4. Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme « flavedo », désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008). Cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (Karaali *et al.*, 2004 ; Malešev *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes (Figure 12) ont été isolés par le scientifique Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances

appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al.*, 2001). Ce sont des pigments hydrosolubles fréquents chez les végétaux et responsables de certaines colorations des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils ont une origine biosynthétique commune. Les flavonoïdes sont connus principalement pour leur activité antioxydante (Bruneton, 1999).

Ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzler *et al.*, 1998) Ils se présentent sous forme de génine ou d'hétéroside, plus la molécule est hydroxylée, et plus le pH est élevé, plus la couleur est accentuée. Il existe un grand nombre de flavonoïdes. On les différencie par le nombre, la position et la nature des fonctions phénols et des fonctions méthoxyles substituées sur le noyau, ainsi que par la position des sucres chez les hétérosides. (Anton *et al.*, 2003).

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollen (Verhoeven *et al.*, 2002).

Ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (exemple: trèfle) (Urquiaga *et al.*, 2000).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (Piquemal, 2008).

La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Boudet, 2000).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes, et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes, tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Lahouel, 2005 ; Piquemal, 2008).

III.3.2.4.1. Biosynthèse

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A

synthétisé à partir de la phénylalanine (Bruneton, 1999). La voie biosynthétique de ces Polyphénols est présentée dans la figure 13.

III.3.4.2.2 Structure chimique :

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone (Milane, 2004) à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Dacosta, 2003), portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides . On signale que le noyau flavone est lui même un dérivé du noyau flavane de base (figure12).

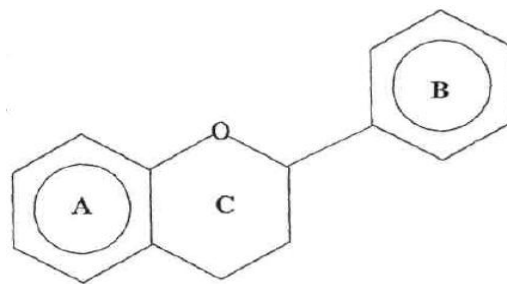


Figure 12 :schéma simplifié des flavonoïdes (Milane, 2004)

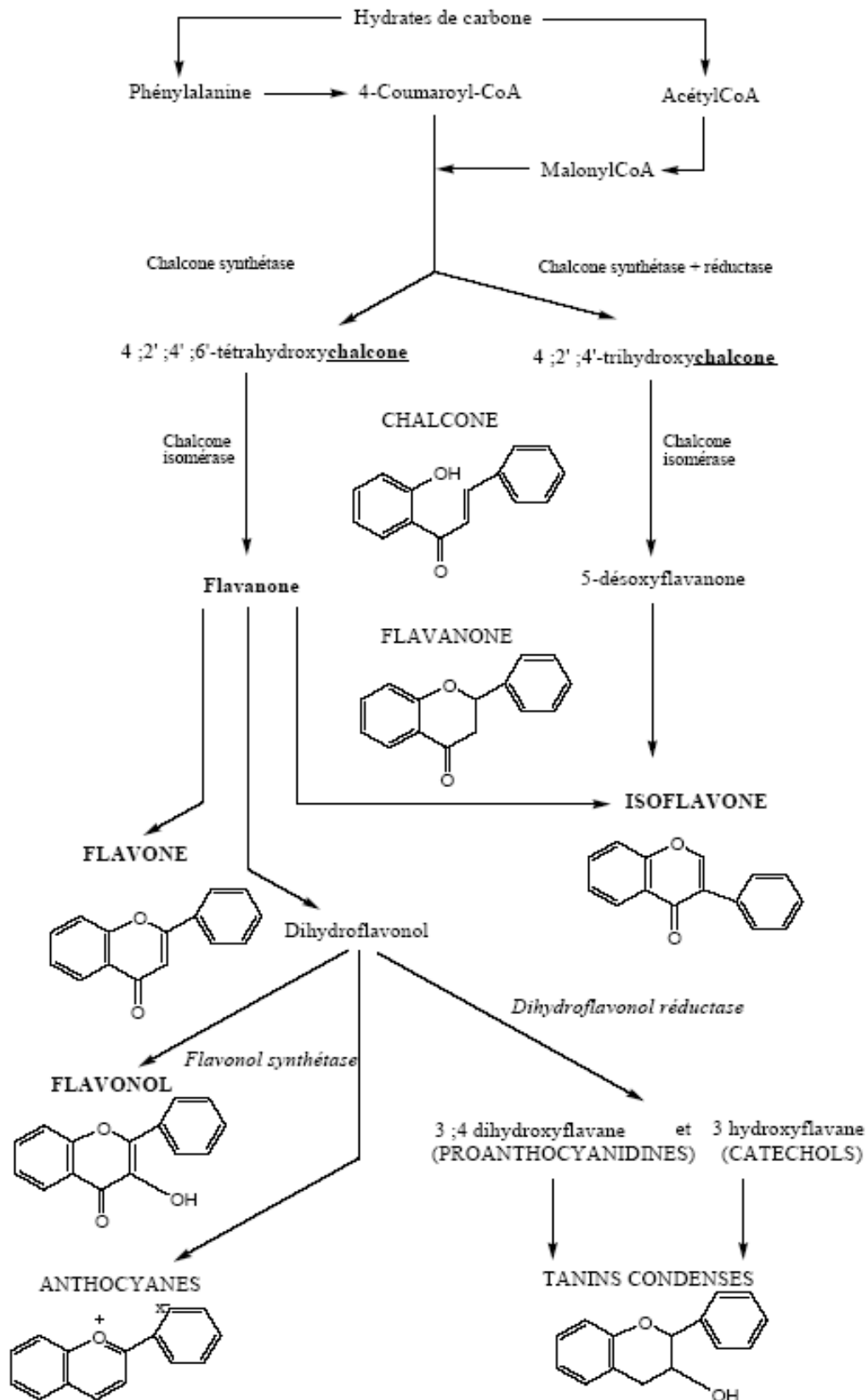


Figure 13 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Milane, 2004).

Enfin, la famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Figure 14).

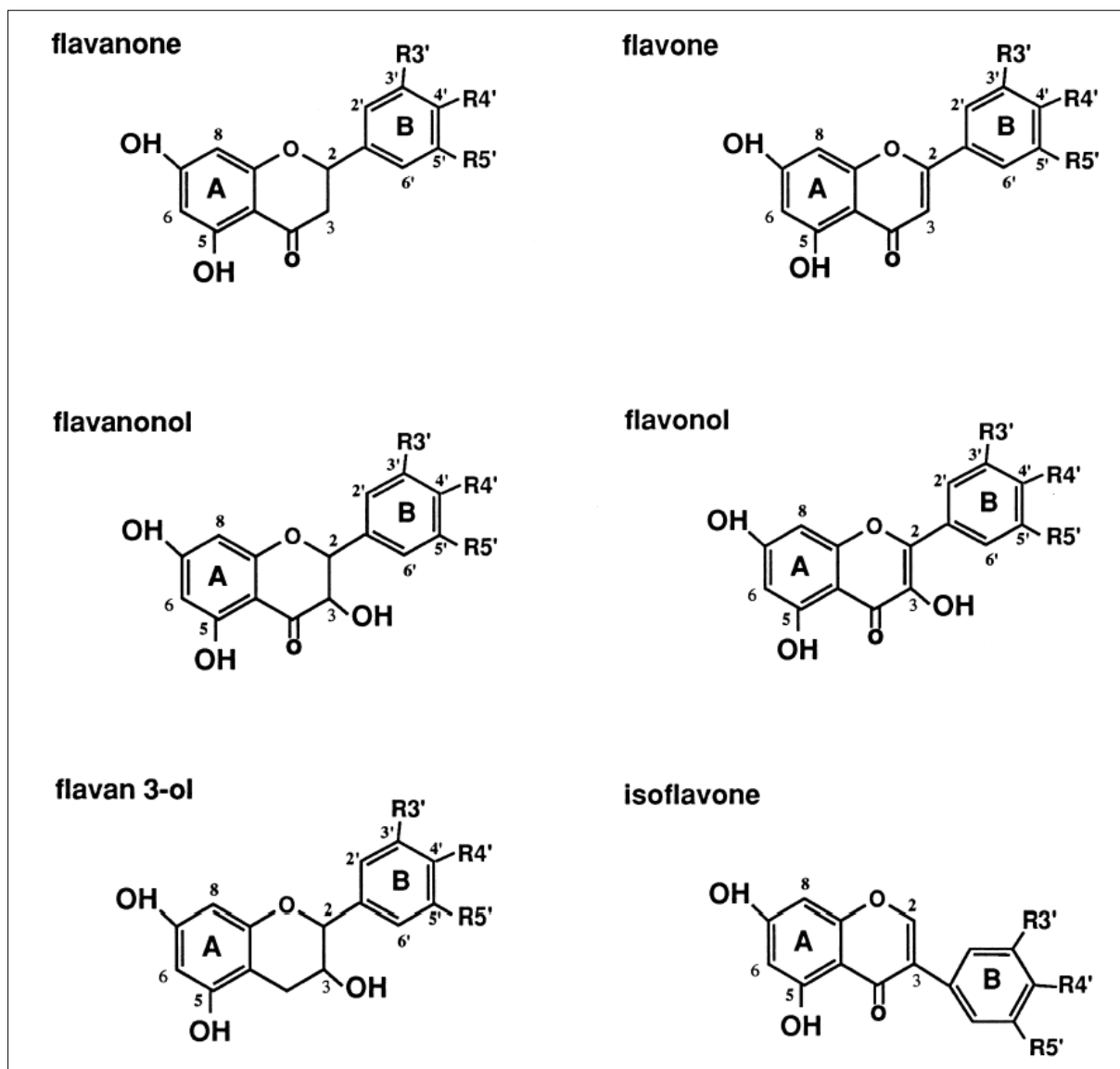


Figure 14 : Structure de quelques classes des flavonoïdes
(Gamet-Payraastre *et al.*, 1999).

III.3.2.4.3 Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'oeil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou

bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle. Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (Figure 15) (Bessas *et al.*, 2007).

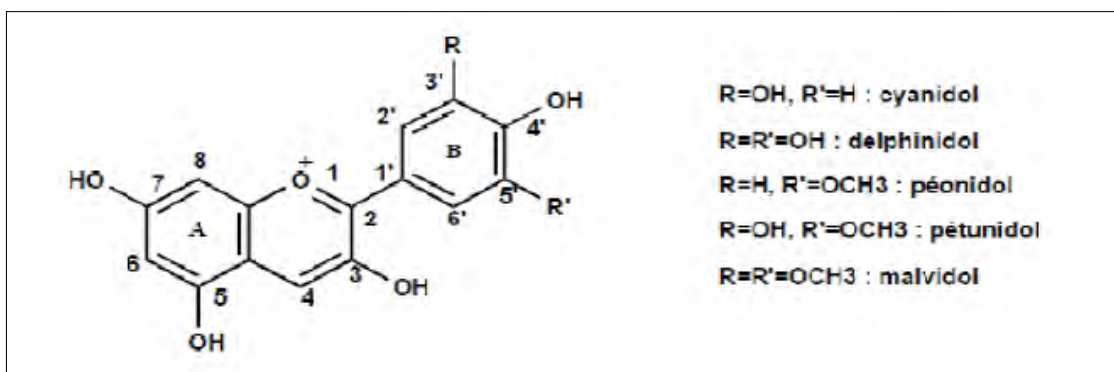


Figure 15: Structure générale des anthocyanes (Le cation flavylum) (El kalamouni, 2010)

III.3.2.4.4. Les flavonones et les flavonols

Ils représentent environ 80% des flavonoïdes connus. La principale activité attribuée à ces flavonoïdes est une propriété vitaminique P veino-active. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. Souvent anti-inflammatoires, les flavonones et les flavonols peuvent être antiallergiques, hépato-protecteurs, antispasmodiques, diurétiques, antibactériens, antiviraux (Bruneton, 1999)

III.3.2.4.5. Les isoflavones

Leur distribution est restreinte et sont presque spécifiques des Fabaceae, de certaines Mimosaceae et des Combretaceae (Bruneton, 1999).

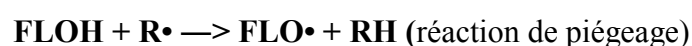
Les plus représentés sont des isoflavonones, des isoflavènes, des isoflavanes. Ce sont des phytoalexines (substances produites par la plante en réponse à une infection par un agent pathogène ; champignon par exemple). Ce sont donc des produits de défense naturelle, de

puissants oestrogènes, insecticides, antitumoraux, réducteurs des manifestations de la ménopause (bouffée de chaleur).

III.3.2.4.6. Propriétés des flavonoïdes

III.3.2.4.6.1. Propriétés anti radicalaire

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO[•]), ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R[•]; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactif (Figure 16).

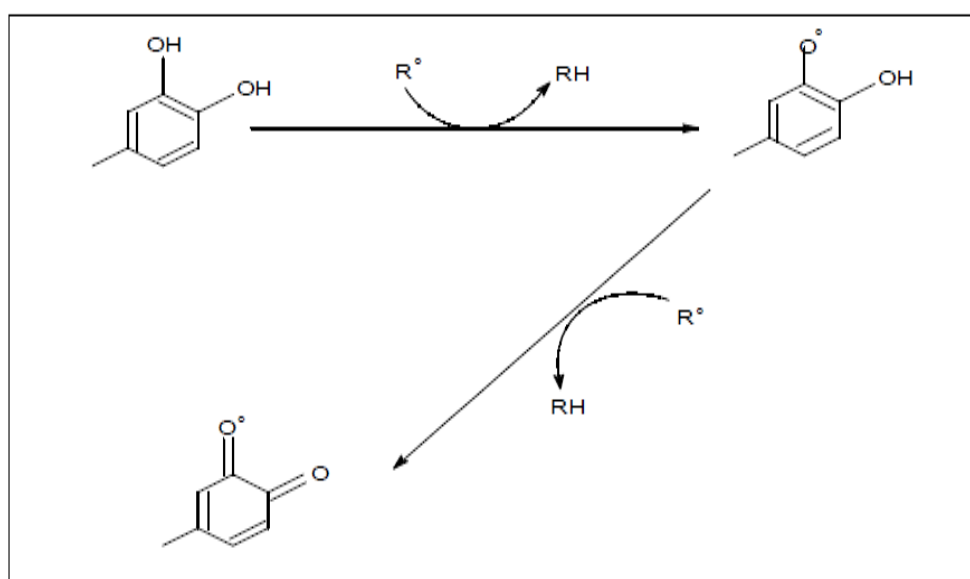
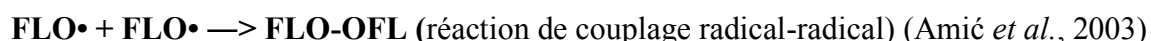
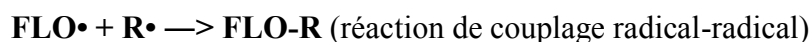


Figure 16 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R[•]) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001).

III.3.2.4.6.2. Propriétés chélatrices des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{+2} est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs. (Malešev *et al.*, 2007).

III.3.2.4.6.3. Inhibition enzymatique

En règle générale, les flavonoïdes sont *in vitro*, des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine; l'élastase; l'hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proantho-cyanidols; la phosphodiésterase de l'AMPc; l'aldosereductase par le quercétiroside, ainsi que par des méthoxyflavones; la protéine-kinase, notamment par le lutéolol; plusieurs flavonoïdes (cirsiolol, hypolaetine, etc.) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Quant à (lutéolol, apigénol, chrysine, etc.) inhibent la cyclooxygénase (Bruneton, 1999).

Quelques flavonoïdes sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse des prostaglandines. Cet effet est dû à l'inhibition de certaines enzymes (lipoxygénase, phospholipase, cyclo-oxygénase) impliquées dans leur biosynthèse. L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes (pinostrobine, quercétine, morine, myricétine) est attribuée à leur efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II. (Hodek *et al.*, 2002).

Beaucoup d'efforts ont été fait pour la recherche des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase, l'enzyme clef dans la biosynthèse de la mélanine. Les flavonoïdes présentent le groupe le plus étudié des polyphénols. Les résultats des travaux de Gao, et ses collaborateurs (Gao *et al.*, 2007), ont montré que les 5, 6,7-trihydroxy-flavones sont utiles en tant qu'agents de dépigmentation. Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase (Bruneton, 1999).

III.3.2.4.6.4. Propriétés anticancéreuses

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus

récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996). La plupart des flavonoïdes sont *in vitro*, antimutagènes ; *a contrario*, quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anticancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales *in vitro* (Bruneton, 1999).

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, et la taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. Les travaux réalisés par Mahmoud *et al* (2000) in (Depeint *et al.*, 2002), montraient que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement. Ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toutefois, Caltagirone *et al* (2000) in (Depeint *et al.*, 2002) signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs

Mécanismes tel que : piégeage des radicaux libres, inhibition de la biosynthèse de l'acide arachidonique, inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses soit par arrêt du cycle cellulaire, induction de l'apoptose, et la formation d'un complexe inactif avec le carcinogène.....etc.

III.3.2.4.6.5. Activité anti inflammatoire

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego *et al.*, 2007).

III.3.2.4.6.6. Effets cardiovasculaires

Récemment, beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoïdes. Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une

incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (Xu *et al.*, 2007).

Parmi les 17 flavonoïdes examinés par Xu *et al.*, (2007), les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et la génisteine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire.

III.3.2.4.6.7. Propriétés antibactériennes

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire. (Cowan, 1999)

III.3.2.4.6.8. Propriétés antivirales

Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (Tapas *et al.*, 2008)

III.3.2.4.6.9. Propriétés antiallergiques

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique la phosphodiésterase, et l'ATPase Ca^{2+} dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Marfek, 2003)

III.3.2.4.6.10. Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques

Le terme nutraceutique a été intervenu en 1979 par Steph De Felice (Lin *et al.*, 2006), il s'agit d'une appellation commerciale élaborée par les industriels qui résulte de la contraction

de "Nutrition" et de "Pharmaceutique" (Bietrix, 2004). Les nutraceutiques sont des composés qui n'ont pas une valeur calorique mais qui ont un rôle fondamental pour ce qui concerne la prévention de certaines pathologies (Teissedre *et al.*, 2007).

Le rôle nutraceutique des polyphénols s'inscrit dans le cadre de ce que l'on appelle la nouvelle pharmacie qui consiste à faire un traitement préventif et non curatif, il vaut mieux que le médicament soit déjà présent dans l'organisme prêt à la défense apporté sous forme des aliments fonctionnels capables de procurer des bienfaits physiologiques démontrés ou de réduire les risques des maladies chroniques, en plus de remplir leurs fonctions nutritionnelles de base dont la consommation des fruits et des légumes riches en composés bioactifs peut être une stratégie de prévention réaliste contre de nombreuses maladies majeures. Les produits nutraceutiques fondamentaux des plantes sont les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes en raison de leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine.

III.3.2.4.6.11. Activité antileishmanienne

En 2006, Tasdemir *et al.*, ont procédé à l'étude *in vitro* et *in vivo* de plus d'une centaine de flavonoïdes et composés dérivés. 21, d'entre eux sur les 105 étudiés, présentaient une IC₅₀ inférieure à 3 µg/ml sur les amastigotes axéniques de l'espèce *L. donovani*. Parmi ces composés, seule la quercétine a montré une activité *in vivo* sur les souris BALB/c, elle entraîne une diminution modérée de l'infection de 15,3 %. Deux glycosides de la quercétine (le 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl (1→2)- α -L-rhamnopyranoside de quercétine, et le 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside de quercétine ainsi que l'aglycone ont été isolés de *Kalanchoe pinnata* au Brésil (Muzitano *et al.*, 2006). Ces composés ont été évalués *in vivo* sur des souris BALB/c infectées par *L. amazonensis* (Muzitano *et al.*, 2009). La dose de flavonoïdes (per os) était de 16 mg/kg/jour. À cette dose, l'activité est équivalente à celle du PentostamR en terme de charge parasitaire et meilleure quant au diamètre des lésions. L'action de ces flavonoïdes (les deux premiers étant vraisemblablement métabolisés en aglycone active) se fait par inhibition de la topoisomérase II parasitaire. Les résultats contradictoires obtenus par voie intrapéritonéale (Tasdemir *et al.*, 2006) ou voie orale (Muzitano *et al.*, 2009) sont révélateurs des difficultés rencontrées lors de l'évaluation pharmacologique. Le tableau ci-dessous montre quelques exemples des composés phénoliques et quelques flavonoïdes isolés à partir des produits naturels ou des plantes qui présentent une activité antileishmanienne testés sur les deux formes parasitaires promastigote et amastigote de diverses espèces de *leishmania sp*, ces données sont collectées à partir des études antérieures.

Tableau 03 : Quelques polyphénols et flavonoïdes antileishmaniens.

Polyphénols	Nature du polyphénol	Espèce leishmanienne	Référence
Amentoflavone	Flavonoïdes	<i>L. donovani</i>	Chan-Bacab and Pena-Rodriguez (2001)
Betuletol	flavonoïdes	<i>Leishmania sp.</i>	Morales et al. (2000)
Brachycoumarinone, 2-cyclo epoxide	Coumarine	<i>L. major</i>	Oketch-Rabah et al. (1998)
Brachycoumarinone, 2-epicyclo epoxid	Coumarine	<i>L. major</i>	Oketch-Rabah et al. (1997)
Bracteïne	Flavonoïde	<i>L. donovani</i>	Kayser et al. (1999)
Chalcone, 20,60-dihydroxy-40-methoxy	Flavonoïde	<i>L. amazonensis</i>	Torres-Santos et al. (1999)
Coumarine	Coumarine	<i>L. amazonensis</i>	Bravo et al. (1999)
Licochalcone A	Flavonoïde	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i>	Chen et al. (1993) (1994) (1995)
Lutéoline	Flavonoïde	<i>L. donovani</i>	Mittra et al. (2000)
Podocarpusflavone A	Flavonoïde	<i>L. donovani</i>	Chan-Bacab and Pena-Rodriguez (2001)
Podocarpusflavone B	Flavonoïde	<i>L. donovani</i>	Chan-Bacab and Pena-Rodriguez (2001)
Quercétine	Flavonoïde	<i>L. donovani</i>	Mittra et al. (2000)
Sulfuretine	Flavonoïde	<i>L. donovani</i>	Kayser et al. (1999)
La 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxychalcone (DMC)	Flavonoïde	<i>L. amazonensis</i>	Torres-Santos et al., 1999

III.4. Méthodes d'analyse des substances naturelles

La chromatographie sur papier (ou chromatographie sur couche mince) est la méthode la moins coûteuse et la plus utilisée en matière d'analyse des substances naturelles. Par ailleurs, il faut noter qu'il existe des méthodes plus pointues et plus perfectionnées telles que les méthodes HPLC (chromatographie liquide à haute performance) (Kansole, 2009).

III.4.1. Extraction, isolement, identification des métabolites secondaires

Une étude phytochimique d'une plante passe impérativement par les étapes suivantes :

- Récolte de la plante
- Extraction
- Séparation et purification
- Identification structurale des produits isolés

III.4.1.1. Récolte des plantes

Les espèces sélectionnées sont collectées dans leur habitat naturel. La détermination botanique des espèces est réalisée par des taxonomistes, le matériel végétal collecté sera séché dans un endroit sec à l'abri de la lumière directe du soleil, après séchage le matériel végétal est broyé, des tests préliminaires chromatographiques ou chimiques sont nécessaires pour avoir une idée sur des produits que la plante accumule.

III.4.1.2. Extraction

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction, notamment les flavonoïdes (Bruneton, 1999). Selon le schéma présenté par Lebreton *et al.*, (1967) l'extraction se fait comme suit :

- Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol à 70%), la macération peut se faire soit à la température ambiante ou par chauffage.
- Les solutions obtenues après chaque macération hydro-alcoolique sont concentrées ou séchées, puis traitées avec de l'eau bouillante.

On procède à des extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : l'hexane, et l'éther diéthylique pour dégraisser l'extrait obtenu, puis le chloroforme ou l'acétate d'éthyle pour les aglycones et monoglycosides, enfin le n-butanol pour les glycosides, les extraits obtenus sont évaporés à

sec, pesés et sont prêts pour des séparations chromatographiques. La figure, ci-dessous, résume les différentes étapes précédentes :

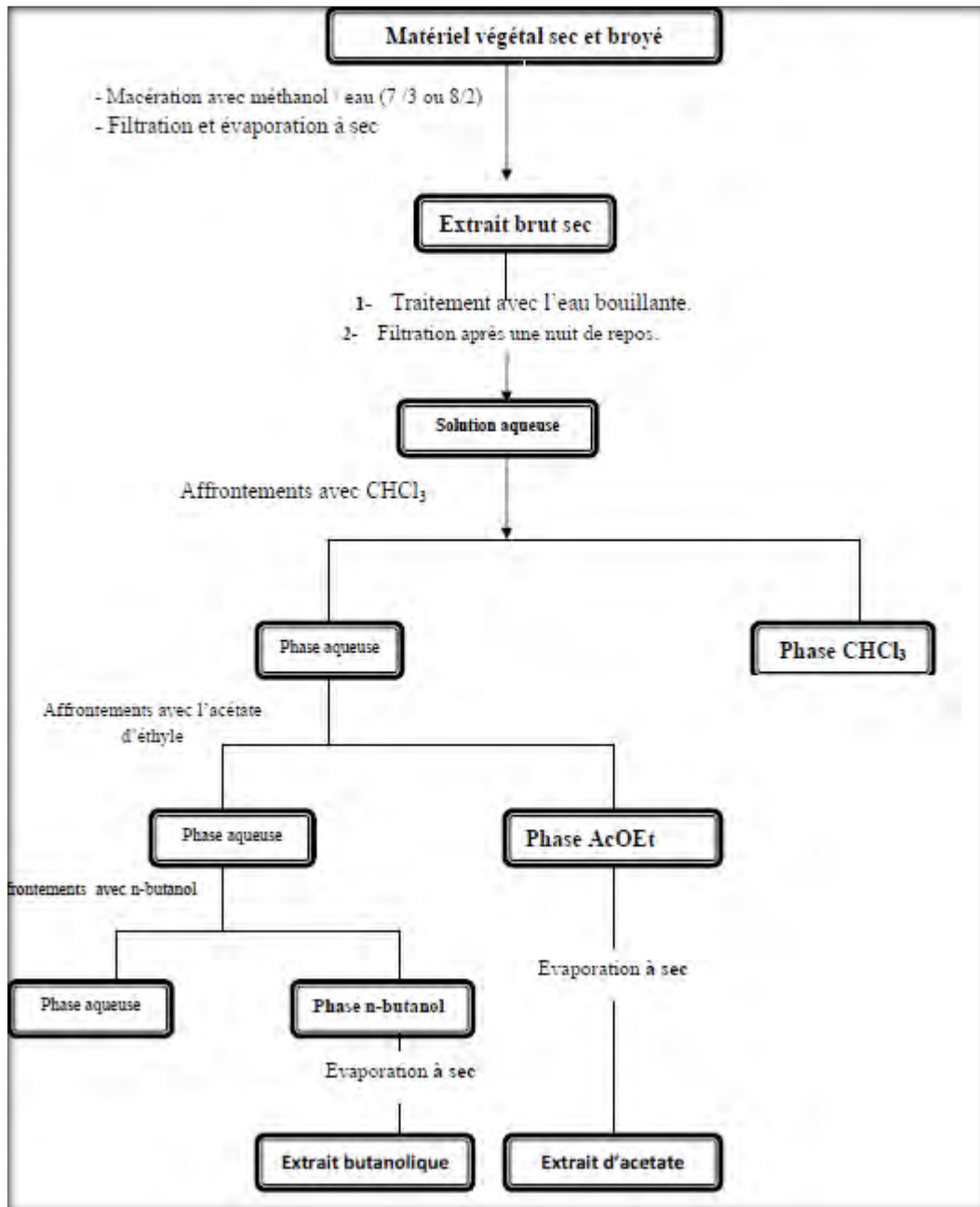


Figure 17: Protocole générale d'extraction (Lebreton *et al.*, 1967).

Chapitre IV : Etude des plantes médicinales investiguées

IV.1. Aperçu bibliographique sur les plantes médicinales ayant une activité antileishmanienne

Le traitement de la leishmaniose est très difficile à cause de la localisation intramacrophagique de la forme infectieuse de la maladie. Les victimes de cette maladie, présentant généralement une immunodéficience, sont incapables d'éliminer le parasite à travers un mécanisme naturel de défense. En outre la mauvaise nutrition est associée dans certains cas avec la leishmaniose (Carvalho *et al.*, 2000; Torres-Santos *et al.*, 1999).

Dans l'absence d'un vaccin, il y a un besoin urgent d'avoir recours à des drogues pour remplacer et/ou compléter ceux qui sont utilisés pour traiter la maladie. La majorité des drogues utilisées cliniquement pour le traitement de la leishmaniose se basent sur les molécules de l'antimoine pentavalent qui ont été développés avant 1959. La toxicité de ces agents et la persistance des effets secondaires (malgré la modification des doses et la durée de traitement) présentent des inconvénients sévères. Les alternatives qui ont été découverts après, tel que l'Amphotéricine B et la pentamidine ont aussi donné des effets secondaires indésirables pour les malades (Balana *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2000). Par ailleurs, les extraits des plantes ou les molécules dérivées des plantes semblent être une source de valeur pour l'élaboration des nouveaux agents médicaux ainsi que pour la recherche de nouveaux mécanismes d'action (Carvalho *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2001., Hoet *et al* 2004). Le besoin urgent de traitements alternatifs a conduit à un programme de screening des produits naturels à usage potentiel dans la thérapie de la leishmaniose (Tahir *et al.*, 1998; Weniger *et al.*, 2001; Bhadra,1993).

Notre recherche bibliographique nous a permis d'établir une liste des produits naturels évalués pour leur activité antileishmanienne présentés dans le tableau 04. Ce dernier met en exergue les familles des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle et les espèces leishmaniennes ciblées par l'effet antileishmanien des extraits ou des produits bioactifs.

Tableau 04 : Quelques plantes antileishmaniennes.

Famille	Espèce	Fraction /molécule	Espèce leishmanienne	Référence
Agavaceae	<i>Yucca filamentosa</i> L.	Ethanol extract	<i>L. amazonensis</i>	Plock <i>et al.</i> ,(2001)
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	Non connu*	<i>L. amazonensis</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Pistacia atlantica</i>	Extraits phénoliques et lipidiques	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	Maamri,(2009)
Annonaceae	<i>Annona glabra</i> L.	Non connu	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Garcia <i>et al.</i> , (2012).
	<i>Annona glauca</i> Thonn.	Extrait Dichloromethane		Waechter <i>et al.</i> (1998)
	<i>Annona muricata</i> L.	Extrait de l'acétate d'éthyle	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	Jaramillo <i>et al.</i> ,(2000)
	<i>Annona senegalensis</i> Pers.	Extrait dichlorométhane	<i>Leishmania sp.</i>	Sahpaz <i>et al.</i> , (1996)
	<i>Annona aff. spraguei</i> Saff.	Extrait chloroformique	<i>L. braziliensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. panamensis</i>	Saez <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schldl.	Fraction alcaloide	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani.</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
	<i>Duguetia spixiana</i> Mart.			
	<i>Guatteria foliosa</i> Benth.			
	<i>Guatteria schoburgkiana</i> Mart.			
	<i>Oxandra espintana</i> (Spruce) Baillon.			
<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.				
<i>Guatteria foliosa</i> Benth.				

Apiaceae	<i>Apium graveolens</i> L.	Coumarine et l'extrait dichlorométhane	<i>L. amazonensis</i>	Brenzane <i>et al.</i> , (2007).
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i> L.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002).
	<i>Alstonia scholaris</i> R. Br.	Extrait éthanolique	<i>L. donovani</i> .	Singha <i>et al.</i> , (1992)
	<i>Holarrhena curtisii</i>	Extrait éthanolique	<i>L. donovani</i>	Kam <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Picralima nitida</i> Th. & H. Dur.	Extrait éthanolique	<i>L. donovani</i>	Iwu <i>et al.</i> , (1992)
Araliaceae	<i>Hedera helix</i> L.	Extrait éthanolique	<i>L. amazonensis</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
	<i>Oreopanax species</i>	Extrait éthanolique	<i>L. braziliensis</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
Asclepiadaceae	<i>Gongronema latifolia</i> Benth.	Extrait méthanolique	<i>L. donovani</i>	Iwu <i>et al.</i> (1992)
	<i>Periploca graeca</i> L.	Extrait méthanolique	<i>L. major</i>	Demirci <i>et al.</i> , (1998)
Asteraceae	<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Extrait aqueux et l'huile essentielle	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	Hatimi <i>et al.</i> , (2000)
	<i>Pentacalia desiderabilis</i>	jacaranone	<i>L. amazonensis</i>	Morais <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Calea montana</i> Klatt .	Chromanones		
	<i>Munnozia hastifolia</i> Poepp.	sesquiterpènes lactone		
	<i>Launea arborescens</i> L.	Non connu		
	<i>Anthemis stiparum</i> <i>Inula viscosa</i>	Non connu Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.			
	<i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC.	Extrait dichlorométhane	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> . <i>L. mexicana mexicana</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994) Bero <i>et al.</i> , (2011)

<i>Ageratina pentlandiana</i> (DC.) K. & R.				
<i>Cnicothamnus lorentzii</i> Griseb.				Fournet <i>et al.</i> , (1994)
<i>Inula montana</i> L.				. Lockman <i>et al.</i> , (1991)
<i>Echinacea purpurea</i> Moench	Extrait méthanol		<i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i> <i>L. braziliensis</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
<i>Jasonia glutinosa</i> DC.	Sap		<i>L. infantum</i>	Martin <i>et al.</i> , (1998)
<i>Neurolaena lobata</i> R. Br.	Extrait acétonique		<i>Lishmania sp</i>	Parnham, (1996)
<i>Ophryosporus piquerioides</i> (DC.) Benth	Extrait éthanol		<i>L. donovani</i>	Villaescusa <i>et al.</i> , (1996)
<i>Perezia multiflora</i> Less. H. & B.			<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i>	Berger <i>et al.</i> , (2001)
<i>Pterocaulon alopecuroideum</i> (Lam.) DC.			<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
<i>Senecio clivicolus</i> Wedd.				
<i>Stevia yaconensis</i> Hieron.				
<i>Vernonia squamulosa</i> Hook. & Arn.				

	<i>Werneria nubigena</i> H.B.K. <i>Xanthium catharticum</i> L.			
Bambusinae	<i>Bambusa vulgaris</i>	Extrait éthanolique	<i>L.chagasi</i>	da Rocha <i>et al.</i> , (2009).
Berberidaceae	<i>Berberis boliviana</i> Lechl. <i>Berberis bumeliaefolia</i> Schum. <i>Berberis cf. laurina</i> Epl. <i>Berberis aff. paucidentata</i> Rusby	Fraction alcaloïde	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L.donovani.</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
Bignoniaceae	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don. <i>Begonia parviflora</i> <i>Kigelia pinnata</i> DC.	triterpènes et des dérivés de quinone Jacaranone et dérivés Non connu	<i>L. mexicana amazonensis</i> <i>L. major</i>	Sauvain, (1989) Estevez, (2009) Moideen <i>et al.</i> ,(1997)
Brassicaceae	<i>Lepidium sativum</i> L.	Non connu	<i>L.major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Caricaceae	<i>Crotalaria retusa</i>	Non connu	<i>Leishmania sp</i>	Estevez, (2009)
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum lechleri</i> Solms.	sesquiterpènes lactone	<i>Leishmania sp</i>	Estevez, (2009)
Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i> <i>Marila laxiflora</i> Rusby.	Non connu Extrait de chlorure de méthylène	<i>L.amazonensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Garcia <i>et al.</i> , (2012). Weniger <i>et al.</i> , (2001)
Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i> Kurz.	Extrait aqueux	<i>L. amazonensis</i>	Da Silva <i>et al.</i> , (1995)
Cupressaceae	<i>Juniperus oxycedrus</i> L . <i>Juniperus Thurifera</i> L.	Non connu	<i>L.major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Dilleniaceae	<i>Doliocarpus</i>	Extrait	<i>L. mexicana</i>	Sauvain <i>et al.</i> ,

	<i>dentatus</i> Kubitzki.	chloroformique	<i>L. amazonensis</i>	(1996)
Euphorbiacées	<i>Pera benensis</i>	Non connu	<i>L.braziliensis</i>	Sauvain, (1989)
	<i>Jatropha isabellii</i>	Non connu	<i>Leishmania sp</i>	
	<i>Hura crepitans</i>	Non connu	<i>L.amazonensis</i>	Garcia <i>et al.</i> , (2012).
Fabaceae	<i>Crotalaria barbata</i> R. Grah. .	Extrait éthanolique	<i>L.donovani</i>	Singha <i>et al.</i> , (1992)
	<i>Desmodium gangeticum</i> L.	Extrait méthanolique		Iwu <i>et al.</i> , (1992)
	<i>Periandra mediterranea</i> Taub.	Fraction de saponine		Santo <i>et al.</i> , (1997)
Fagaceae	<i>Quercus rotundifolia</i> Lamk	Non connu	<i>L.major</i> <i>L.tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Gentianaceae	<i>Swertia chirata</i> Buch. Ham. Ex Wall.	Extrait éthanolique	<i>L. donovani</i>	Singha <i>et al.</i> , (1992)
Geraniaceae	<i>Pelargonium odoratissimum</i> L.	Non connu	<i>L.major</i> <i>L.tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Lamiaceae	<i>Salvia cilicica</i>	7-hydroxy-12-methoxy-20-norabieta-1,5(10),7,9,12-pentaene-6,14-dione abieta-8,12-dien-11,14-dione oleanolic acid ursolic acid ferruginol inuroyoleanol cryptanol non connu	<i>Lesihmania sp</i>	Tan <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Salvia clandestina</i> Batt.		<i>L.major</i> <i>L.tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)

	<p><i>Ajuga reptans</i> L. Schreb</p> <p><i>Lavandula multifida</i> L.</p> <p><i>Marrubium vulgare</i> L.</p> <p><i>Mentha pulegium</i> L.</p> <p><i>Ocimum basilicum</i> L.</p> <p><i>Oreganum compactum</i> Benth.</p> <p><i>Rosmarinus officinalis</i> L.</p> <p><i>Thymus satureioides</i></p> <p><i>Hyptis lacustris</i> A.</p>			
				Estevez, (2009)
Lauraceae	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Liliaceae	<i>Allium sativum</i> L.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002).
	<i>Allium cepa</i> L.			
	<i>Allium sativum</i> L.	Non connu	<i>L. major</i>	Ghazanfari <i>et al.</i> , (2000)
Lythraceae	<i>Lawsonia inermis</i> L.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Loranthaceae	<i>Piper hispidum</i> var. <i>hispidum</i> Sw	Non connu	<i>Leishmania sp</i>	Estevez, (2009)
	<i>Piper strigosum</i> Trel.	Non connu		
	<i>Piper sp1.</i>	Non connu		
	<i>Piper dennisii</i> Trel.	Non connu		
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	Extrait méthanolique	<i>L. major</i>	Tahir <i>et al.</i> , (1998)

	A. Juss. <i>Guarea polymera</i> Little. <i>Khaya senegalensis</i> A. Juss.	Chlorure de Méthylène	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani.</i>	Weniger <i>et al.</i> , (2001) Abreu <i>et al.</i> ,(1999)
Menispermaceae	<i>Abuta pahni</i> Mart. <i>Abuta rufescens</i> Aublet <i>Anomospermum bolivianum</i> Kruk. & Mold. <i>Tinospora cordifolia</i> (Willd.) Hook.f. & Thoms.	Fraction alcaloïde Extrait éthanoloïque	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994) Singha <i>et al.</i> , (1992)
Myrsinaceae	<i>Myrsine pellucida</i> Spreng.	Extrait éthanoloïque	<i>L. braziliensis</i>	Lavaud <i>et al.</i> , (1994)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus Sp</i> <i>Myrtus communis</i> L. <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	Non connu Non connu Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Oleaceae	<i>Olea europea</i> L.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Papaveraceae	<i>Bocconia integrifolia</i> H and B. <i>Bocconia pearcei</i> Hutch.	Fraction alcaloïde	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Fournet <i>et al.</i> , (1994)
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca dodecandra</i> L'Herit.	Extrait butanolique	<i>L. enriettii</i>	Lemma <i>et al.</i> , (1972)

Piperaceae	<i>Cestrum racemosum</i>	chalcone, amide	<i>Leishmania sp</i>	Estevez, (2009)
	<i>Solanum peruvianum</i> L.	chalcone, amide		
	<i>Capsicum annuum</i> L.	chalcone, amide		
	<i>Capsicum frutescens</i> L.	chalcone, amide		
	<i>Peperomia galioides</i> H. B. & K.	Extrait éthanolique Extrait éther de pétrole	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	Mahiou <i>et al.</i> , (1995)
<i>Piper aduncum</i> L.	Extrait éther de pétrole	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Torres-Santos <i>et al.</i> , (1999)	
Plantaginaceae	<i>Plantago amplexicaulis</i> Cav.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Punicaceae	<i>Punica granatum</i> L.	Non connu	<i>L. amazonensis</i>	Garcia <i>et al.</i> , (2012).
Rannunculaceae	<i>Nigella sativa</i> L.	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
Rosaceae	<i>Malus communis</i> (D.C.)	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Rosa Sp</i>			
Rubiaceae	<i>Faramea guianensis</i>	Fractions acétate d'éthyle et chlorure de méthylène	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	Sauvain, (1989)
Rutacées	<i>Galipea longiflora</i>	Non connu	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i>	Sauvain, (1989)
	<i>Citrus aurantium</i> L	Non connu	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Citrus limon</i> L.	Non connu		

Scrophulariaceae	<i>Conohea scoparioides</i> Cham. & Schldl.Benth.	Extrait de chlorure de méthylène	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Weniger <i>et al.</i> , (2001)
	<i>Picrorhiza kurroa</i> Royle, ex Benth.	Extrait éthanolique	<i>L. donovani</i>	Mittal <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Scrophularia scorodonia</i> L.	Extrait méthanolique		Martin <i>et al.</i> , (1998)
Simaroubaceae	<i>Simarouba glauca</i>	Non connu	<i>L.amazonensis</i>	Garcia <i>et al.</i> , (2012).
Sterculiaceae	<i>Cola attiensis</i> Aubrev. & Pellegr.	Extrait chloroformique	<i>L. donovani</i>	Iwu <i>et al.</i> , (1992)
Ulmacées	<i>Ampelocera edentula</i> Kuhl	Non connu	<i>L.braziliensis</i>	Fournet <i>et al.</i> ,(1994)
Verbenaceae	<i>Hedychium coronarium</i> J. König .	Non connu	<i>Leishmania sp</i>	Estevez, (2009)
	<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas	Non connu	<i>L.major</i> <i>L .tropica</i>	El Rhaffari <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Renealmia thyrsoides</i>	Non connu		
	<i>Nyctanthes arbortristis</i>	Extrait éthanolique	<i>L.. donovani</i>	Rathore <i>et al.</i> , (1989)
	<i>Vitex heterophylla</i> Miq.	Extrait éthanolique	<i>L.. donovani</i>	Bhakuni <i>et al.</i> , (1988)
Zingiberaceae	<i>Carica papaya</i> L.	Aryle-heptanoide Aryle-heptanoide aryle-heptanoide	<i>Leishmania sp</i>	Estevez, (2009)

IV.2. Généralités sur les Lamiaceae

La famille des Lamiaceae ou Labiae (Jussieu) est une famille de plantes herbacées à buissonnantes (rarement arbustives : *Hyptis*). Elle contient plus de 250 genres et près de 7000 espèces (Cantino, 1999) qui se répartissent sur tout le globe, mais principalement du bassin méditerranéen à l'Asie Centrale. Cette famille est connue depuis longtemps à cause des propriétés médicinales, aromatiques des plantes qu'elle renferme. Riches en plantes aromatiques, les Lamiaceae ne comptent que peu de tubercules (*Solenostemon rotundifolius* (Poir.) J. K. Morton, ...).

Les Lamiaceae fructifient en donnant des tétrakènes (4 graines regroupées au fond du calice). Les tiges (jeunes) ont une section carrée (sauf quelques rares cas). Sur les nœuds apparents, les feuilles sont opposées (parfois verticillées) souvent décussées, et quasiment toujours entières. Elles ne possèdent jamais de stipules et elles sont souvent odorantes et couvertes de poils sécréteurs (monocellulaires). La formule florale des Lamiaceae est : $5(S) + 5(P) + 4(E) + 2(C)$; (S: sépales ; P : pétales ; E : étamines, C : carpelles).

La place des Lamiacées dans la classification systématique botanique APGII (*Angiosperm phylogeny group*) est la suivante (APGII, 2002; Guignard, 2001; Bray 2005) :

- Ordre	Lamiales (17800 espèces regroupées en vingt familles)
- Embranchement	Spermatophytae
- Sous-embranchement	Angiospermae
- Classe	Dicotyledonae
- Sous Classe	Asteropsidae
- Groupe	Euasterideae
- Super-ordre	Lamianeae
- Ordre	Lamiale
- Famille	Lamiaceae

La famille des Lamiaceae est une famille de plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, par exemple les Thyms, les Lavandes, les Romarins elles sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes (Moreau, 1960).

La sous famille des Lamioides est un groupe monophylétique, établi par la constatation de similitudes dans les caractères de l'ADN de différents genres tels que *Lamium*, *Stachys*, *Galeopsis* (Judd, 2002).

IV. 2. 1. Présentation du genre *Salvia*

Le genre *Salvia* (**sauge**) de la famille des Lamiacées comprend environ 900 espèces et qui manifeste des variations morphologiques et génétiques selon leurs origines géographiques (Mirjalili *et al.*, 2006). Quelques plantes de ce genre sont importantes en économie puisqu'elles sont utilisées comme des épices, des saveurs, en cosmétiques et parfumerie comme en pharmacie industrielle (Glisic *et al.*, 2009).

IV.2. 1. 1. Description botanique

Les plantes du genre *Salvia* sont des arbustes ou plantes herbacées. Avec un calice bilabié, variable, à lèvre supérieure tridentée, l'inférieure bidentée. La corolle est bilabiée. Deux étamines, à filet court surmonté d'un long connectif à deux branches inégales l'une portant une loge de l'anthere et l'autre, le plus court, une écaille, ou bien terminé en pointe. Les plantes de ce genre sont annuelles, ou vivaces à tiges herbacées. (Quezel *et al.*, 1963).

IV.2. 1. 2. Habitat

Le genre *Salvia* est répandu largement dans le monde entier. Son habitat type est les pelouses basophiles mésoméditerranéennes, mésoxérophiles. On la retrouve dans toutes les zones tempérées, sur des sols bien drainés et les sites doivent être bien ensoleillés

IV. 2. 1. 3. Principes actifs

Les plantes de ce genre sont une source très riche en polyphénols, flavonoïdes, et les acides phénoliques, flavones, et flavonols, leurs glycosides constituent la majorité des flavonoïdes répertoriés dans ce genre. Les anthocyanes malonylés sont abondants chez les espèces de *Salvia* à fleurs rouges et bleues. La présence des tannins condensés (proanthocyanidines) dans le genre *Salvia* n'a pas été démontré les acides phénoliques sont exclusivement basé sur la présence de l'acide caféique (Y.rong *et al.*, 2001). Elles contiennent aussi des terpenoïdes particulièrement les diterpènes du type abietane (Gonzalez *et al.*, 1989).

IV.2. 1. 4. Propriétés pharmacologiques

Plusieurs extraits des espèces de genre *Salvia* ont été examinés pour un nombre d'activités biologiques notamment les activités antimicrobiennes, anti inflammatoires, anti cancéreuse (Johnson, 2011) , antioxydante, spasmolytique, cholinergique, et citoprotection. et aussi pour le traitement du cancer, la malaria, perte de mémoire, et antipaludique, analgésique, antipyrétique. Antioxydant (Cuvelier *et al.*, 1994 ; Lima *et al.*, 2007). Anti hyperglycemique (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002). anti-Helicobacter pylori (Cwikla *et al.*, 2010).

IV.2. 1. 5. Présentation de l'espèce *Salvia aurasiaca*

Caractérisées par des fleurs blanches ou rosées, les tiges et les inflorescences sont visqueuses et très ramifiées et étalées, les bractées florales sont très variables, le calice à dents courtement épineuses. Cette plante est abondante dans les hauts plateaux algériens.

La Classification de l'espèce *S. aurasiaca* est la suivante (Judd 2002; Guignard, 2001).

- Embranchement	Spermatophytae (Plantes à graines).
- Sous-embranchement	Angiospermae (graines protégées) ou plantes à fleurs
- Classe	Dicotyledonae (<i>Eudicots</i>) ou dicotylédones vrais
- Sous Classe	Asteropsidae
- Groupe	Euasterideae
- Super-ordre	Lamianeae
- Ordre	Lamiale
- Famille	Lamiaceae
- Genre	<i>Salvia</i>
- Espèces	<i>Salvia argentae</i> , <i>Salvia aurasiaca</i>

IV.2 .2. Présentation du genre *Stachys* L

Le genre *Stachys* (Epiaire), est l'un des plus grands genres de Lamiaceae, contenant près de 270 espèces à travers le monde. (Rechinger *et al.*, 1982). Ce genre représente 14 espèces de plantes vivaces répandues dans l'Algérie, 4 d'entre elles sont endémiques.

IV. 2. 2. 1. Aspect botanique

Plantes annuelles à racines grêles, dépourvues de rejets stériles. Plantes vivaces à souche épaisse émettant en général des rejets stériles (Quezel *et al.*, 1963).

IV. 2. 2. 2. Habitat

Le genre *Stachys* est répandu dans une grande partie du globe, diversifié dans les régions tempérées chaudes de la Méditerranée et Asie Sud Ouest et des centres secondaires dans le nord et l'Amérique du Sud et en Afrique centrale. (Rechinger *et al.*, 1982).

IV. 2. 2. 3. Principes actifs

La recherche bibliographique réalisée sur le genre *Stachys* montre sa richesse en composés phénoliques de type flavonique, les terpène, et phénylétanoïdes (Laggoune, 2011).

La plupart des flavonoïdes isolés du genre *Stachys* sont des flavonoïdes glycosylés (contiennent des hétérosides). 87 composés au total sont répertoriés, toutes ces molécules sont glycosylées: 59 flavones, 04 flavonols glycosylés et un biflavonoïde. Concernant les aglycones, nous avons recensé 12 flavones et 09 flavonols. Seulement deux flavanones sont répertoriées : La naringénine a été isolée de l'espèce *S. aegyptiaca* L. et l'eriodictyol qui a été isolé de l'espèce *S. swainsonii* subsp. *Swainsonii* et subsp. *Argolica*. (Laggoune, 2011).

IV. 2. 2. 4. Propriétés pharmacologiques

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Stachys* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique :

- Les plantes de ce genre ont longtemps été appliquées dans la médecine populaire pour traiter des tumeurs des organes génitaux, des tumeurs inflammatoires, des ulcères et la toux (Duke, 1986).
- Des études pharmacologiques ont confirmé que les extraits de plantes ou de composants appartenant au genre *Stachys* exercent diverses activités : anti-inflammatoire et antinéphrétique (Hayashi *et al.*, 1994, Skaltsa *et al.*, 2000), effet sur la hyaluronidase (Takeda *et al.*, 1985), hypotensive (Takeda *et al.*, 1997), antibactérienne (Skaltsa *et al.*, 1999), anti-

inflammatoire, antitoxique (Zinchenko *et al.*, 1981), antihépatique (Savchenko *et al.*, 1978) et anti-anoxie (Yamahara *et al.*, 1990).

IV. 2. 2. 5. Présentation de l'espèce *Stachys guyoniana*

C'est une plante qui appartient au genre *Stachys*, et qui se trouve exclusivement en Algérie. Elle présente des akènes grisâtres, fortement rugueux, à tiges prostrées flexueuses. Feuilles longues au plus de 3-4 cm. Calices fructifères régulièrement campanulacées cette plante annuelle pousse sur les roches calcaires. Elle se trouve surtout dans la région de l'Aurès et les montagnes du Hodna (Quezel *et al.*, 1963). Sa classification est la suivante (Judd, 2002; guignard, 2001) :

- Embranchement	Spermatophytae
- Sous-embranchement	Angiospermae
- Classe	Dicotyledonae
- Sous Classe	Asteropsidae
- Groupe	Euasterideae
- Super-ordre	Lamianeae
- Ordre	Lamiale
- Famille	Lamiaceae
- Genre	<i>Stachys</i>
- Espèce	<i>Stachys guyoniana</i> Noé

La répartition géographique des plantes investiguées est illustrée par la figure 18.

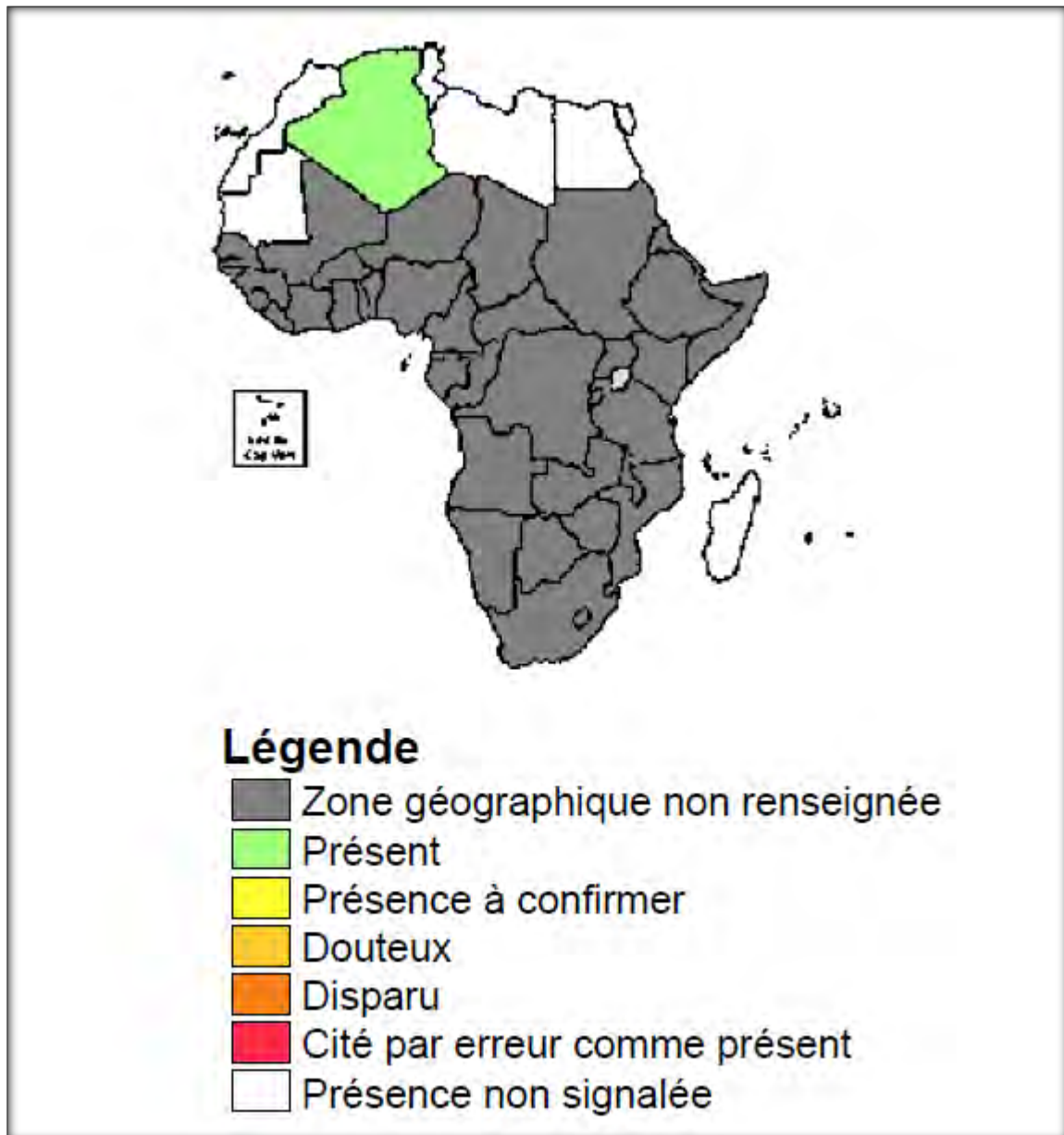


Figure 18: La distribution géographique des deux espèces *S.guyoniana* et *S.aurasiaca* (<http://www.gwannon.com/species/Stachys-guyoniana>).

Matériel et méthodes

Chapitre I: Etude phytochimique des espèces *S. aursiaca* et *St. guyoniana*

I.1. Récolte du matériel végétal

I.1.1. La plante *Salvia aursiaca*

La plante a été récoltée de la région d'Ain El Bey Constantine au mois de mai 2008. Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux, et broyées grossièrement dans un moulin électrique, puis pesées.

I.1.2. La plante *Stachys guyoniana*

La plante a été récoltée de la région des hauts plateaux d'El Mansoura Constantine au mois de juin 2011. Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux, et broyées grossièrement dans un moulin électrique, puis pesées.

I.2. L'extraction

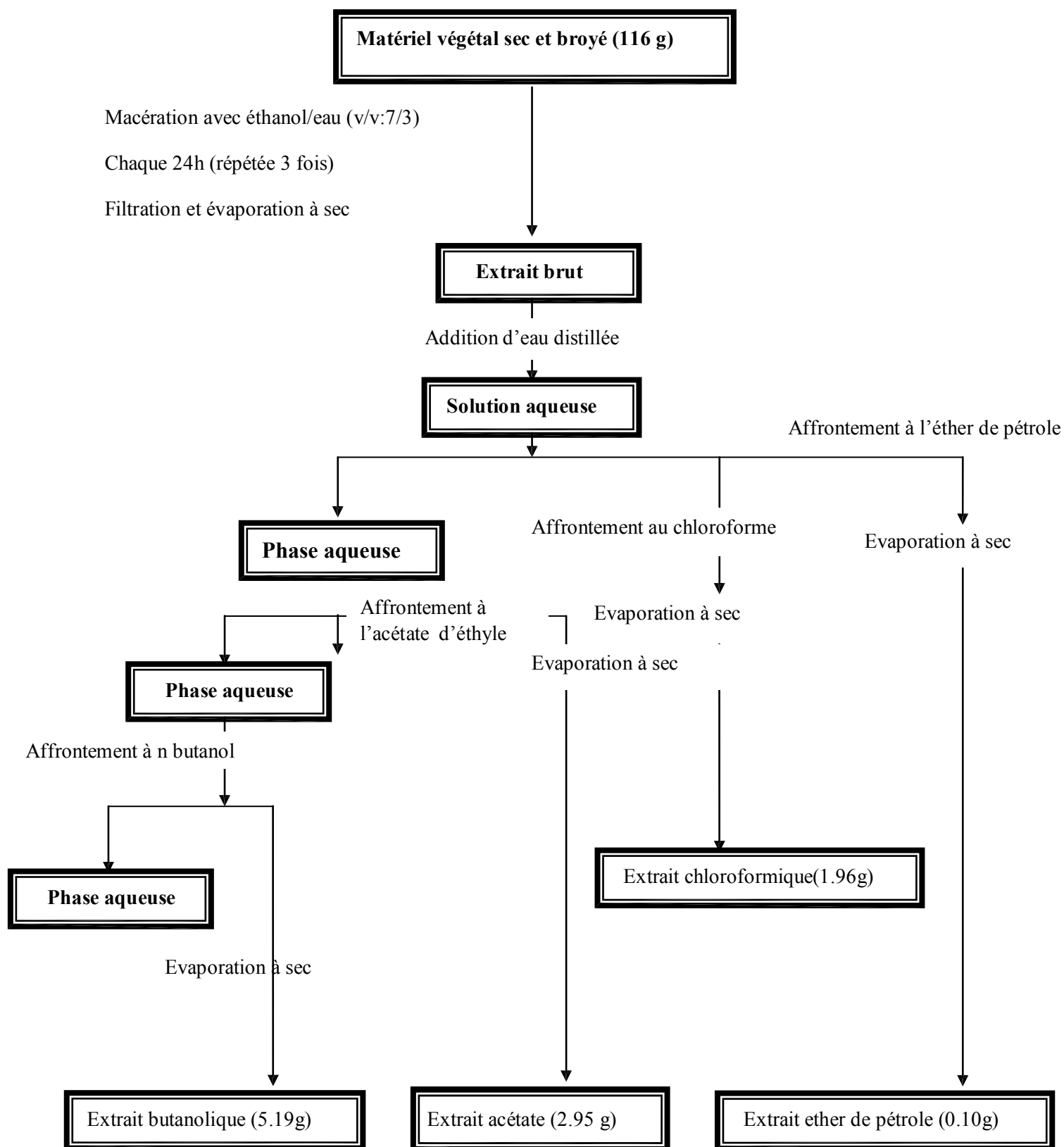
116g de la matière végétale subit une macération dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O: 7/3, v/v), pendant 72 heures, répétés chaque 24 le premier extrait récupéré filtré puis concentré sous pression réduite. La macération est répétée (3x 24 heures) avec renouvellement du solvant. Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés à sec. L'extrait brut est traité avec une quantité d'eau bouillante, pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation, la solution obtenue est laissée au repos pendant une nuit pour décantation. Celle-ci permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, des résines, etc..... après filtration, on obtient une solution aqueuse.

A l'aide d'une ampoule à décanter de 1L, nous avons procédé à des extractions successives de type liquide-liquide, par affrontement à des solvants organiques de polarité croissante :

- L'éther de pétrole qui permet d'éliminer les matières grasses, les chlorophylles, et les impuretés.
- Le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés

- L'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés et partiellement les diglycosylés
- et dernièrement le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.

La phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément. Les 4 phases organiques récupérés sont évaporées sous pression réduite, et pesées, puis reprises par 10 ml du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.

Figure 19: Schéma de l'extraction de l'espèce *Salvia aursiaca*.

Les extraits butanoliques et acétate d'éthyle des deux plantes étudiés ont été choisis pour être étudiés sur le plan chimique, et biologique, à cause des solvants d'extraction utilisés et qui assurent la solubilisation de différentes classes des flavonoïdes.

- Phase acétate d'éthyle de *Stachys guyoniana* : EASG
- Phase butanolique de *Stachys guyoniana* : EBSG
- Phase acétate d'éthyle de *Salvia aurasica* : EASA
- Phase butanolique de *Salvia aurasica* : EBSA

I.3. Dosages des polyphénols totaux des extraits

Le dosage des polyphénols totaux de nos extraits a été effectué selon la méthode du réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu (Kujala *et al.*, 2000).

Pour effectuer les mesures, nous avons suivi le protocole décrit dans la Pharmacopée Européenne (2001). Cette méthode de mesure va nous permettre d'évaluer la quantité de polyphénols totaux, contenus dans les extraits étudiés. Le taux de ces composés est déterminé par rapport à une solution témoin de pyrogallol. La solution mère de chaque extrait est préparée à partir de 4mg de l'extrait brut diluée dans un mélange hydroalcoolique (H₂O/Et OH : v/v : 13/2).

➤ **Principe :**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée avec des techniques colorimétriques, avec le spectrophotomètre UV-Vis, en utilisant l'essai de Folin-Denis, ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

➤ **Expression des résultats**

La lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à 760nm. Le taux des polyphénols totaux est calculé à partir de la relation suivante

$$\text{Polyphenols totaux(\%)} = \frac{62.5 \times \text{DO}_{\text{ext}} \times m_{\text{pyr}}}{\text{DO}_{\text{pyr}} \times m_{\text{ext}}}$$

DO_{ext} : absorbance de l'extrait.

DO_{pyr} : absorbance de pyrogallol.

m_{ext} : masse de l'extrait.

m_{pyr} : masse de pyrogallol

Polyphénols totaux (%) = g/100g d'extrait équivalent pyrogallol.

La masse des extraits (m_{ext}) est calculée à partir de la relation suivante :

$$m_{\text{ext}} = (m_p \times 25 \times 50) / 15 \quad / m_p : \text{masse pesée.}$$

Les résultats sont exprimés en grammes d'équivalent de pyrogallol par 100 gramme d'extrait : (g /100g) équiv.Pyrogallol.

I.4. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes contenus dans les extraits butanoliques et acétates, sont estimés par la méthode) d' $AlCl_3$ (Ayoola *et al.*, 2008).

➤ *Principe*

La méthode de chlorure d'aluminium est basée sur la formation d'un complexe Flavonoïdes-aluminium, ce dernier a un maximum d'absorption 420nm.

➤ *Expression des résultats*

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe de régression linéaire d'étalonnage ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (0.78-50 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

Chapitre II : Etude in vitro de l'activité anti leishmanienne

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1. Parasites

➤ Les promastigotes

Les souches faisant l'objet de notre étude, ont été obtenues à partir du service écoépidémiologie parasitaire, de l'institut Pasteur d'Algérie. Les deux souches en question sont les suivantes :

- La LIPA 32/06 : souche de référence de *leishmania major*.
- La LIPA 284 /11 : souche de référence de *leishmania infantum*.

II.1.1.2. Cellules Thp-1

Se sont des monocytes cancéreux des lignées humaines, commerciales.

II.1.1.3. Milieux de culture

➤ **Culture sur milieu NNN** : La culture sur milieu NNN biphasique NNN (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). Les deux souches sont cultivés sur milieu NNN à pH 7,2 à 25°C. la prolifération sur milieu NNN nécessite 5 à 7 jours d'incubation, pour cela les promastigotes sont repiqués chaque 5 jours sur le même milieu après vérifications des cultures par examen directe de la suspension parasitaire.

➤ **Culture sur milieu RPMI** : Pour augmenter la densité de l'inoculum, les promastigotes sont repiqués sur Milieu RPMI (Roswell Park Memorial Park Institut), additionné de sérum veau foetal (SVF) 10% et des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) La culture est préparés dans des flacons de 25 cm³ stériles est incubé à 25°C et renouvelé chaque 5 jours après vérification de cultures par examen directe de la suspension parasitaire.

Ces deux cultures permettront aussi, de disposer de promastigotes qui pourront se transformer en amastigotes avant infection intramacrophagique.

II.1.2. Activité leishmanicide

I.1.2.1. Sur la forme promastigote

Le protocole a été optimisé par l'unité de culture cellulaire de service éco-épidémiologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Alger.

Pour étudier la sensibilité des leishmanies sous leur forme promastigotes aux extraits testés, l'inoculum primaire des deux souches cultivées sur milieu RPMI enrichi de 10% de sérum veau fœtal est préparé dans des tubes coniques de 15 ml, puis ajusté à une concentration finale de 2.10^6 leishmanies/ml dans le même milieu. L'inoculum est ensuite réparti dans les puits de plaques de culture cellulaire (96 puits par plaque) en présence des dilutions à 1: 2 des extraits butanoliques et acétate d'éthyle des deux plantes étudiés : EASA, EASG, EBSA, EBSG, à différentes concentrations en ordre décroissant : 200 μ g, 100 μ g, 50 μ g pour les deux souches étudiées, et 25 μ g, 12.5 μ g, 6.25 μ g, 3.125 μ g, 1.5625 μ g pour la souche *L.major*. Les dilutions des extraits ayant été préparées dans l'éthanol dilué à 1/100.

Des études antérieures établies par (Hatimi *et al.*, 2000), ont montré que l'éthanol, à une concentration de 0.1%, semble être sans aucun effet leishmanicide sur les leishmanies. C'est la raison pour laquelle il a été utilisé, comme diluant des extraits des plantes. La molécule de référence, utilisée comme témoin positif, est l'amphotéricine B à une concentration de 2 μ g/ml. Il est à noter que la préparation des dilutions, des milieux de culture, des plaques, de l'inoculum, du matériel s'opère dans des conditions aseptiques, à cause de la sensibilité de la culture des leishmanies vis-à-vis des contaminations.

Les tests ont été réalisés en sextuplés pour chaque concentration, des différents extraits, pour chaque souche. Concernant le comptage des promastigotes vivants, ce dernier a été effectué simultanément, par deux techniques différentes :

- le test colorimétrique par MTT (bromure de 3(4.5-diMéthylThiazol-2-yl)-2.5-diphényl Tétrazolium),
- comptage sur cellule de Thomas.

La lecture se fait après 48 heures d'incubation pour *L.major* et 72 heures pour *L. infantum* à 25°C.

II.1.2.2. Test colorimétrique à la MTT

➤ *Principe*

L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale parasitaire permet de réduire le MTT en formazan, transformant le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus dosables par spectrophotométrie. Les DO observées sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes par puits (Sereno *et al.*, 1997).

➤ *Expression des résultats*

A la fin d'incubation, du MTT est rajouté (10 µl de MTT, 10 mg/ml) dans chaque puit durant une période de 4 h. La réaction est arrêtée par ajout de 200 µl de DMSO, Les densités optiques (DO) sont lues après 30 minutes d'incubation à température ambiante sur un lecteur de microplaques-ELISA à 550nm.

La viabilité de cellules est calculée après conversion des DO en pourcentage de viabilité puis comparés par la viabilité de la souche sans ajout des extraits.

➤ *Calcul de l'IC₅₀*

L'IC₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) est déterminée en fonction du pourcentage d'inhibition de la viabilité de la cellule aux concentrations de composés donnés.

$$\frac{\text{DO contrôle} - \text{DO extraits}}{\text{DO contrôle}} \times 100 = \% \text{ d'inhibition}$$

II.1.2.3. Test de cytotoxicité

Il s'agit de déterminer la cytotoxicité des composés sur des cellules Thp-1 (lignée monocyttaire humaine).

➤ *Principe*

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits sur des lignées cellulaires nous renseigne sur la capacité de ces extraits à bloquer les mécanismes de réplifications de ces cellules (Estevez, 2009). On ajuste la culture monocyttaire (Thp-1) à 5x10⁵ cell/ml, le phorbol myristate acétate (PMA) est ajouté pour assurer la différenciation des monocytes en macrophages.

Les cellules Thp-1 différenciées, préalablement adhérents dans les puits d'une plaque de culture cellulaire de 96 puits, sont mises en présence des extraits à tester à 37°C et 5% (CO₂) après deux

lavages avec milieu RPMI1640. Les différentes concentrations des extraits (200, 100,50 et 25 µg/ml) dilués dans du Milieu RPMI 1640 complet, sont mis en contact durant 48 h avec les cellules Thp-1. Les macrophages non traités ont été utilisés comme contrôle négatif. La plaque est incubée à 37°C à 5% de CO₂ pendant 5 jours avec renouvellement du milieu chaque 48heures.

➤ ***Expression des résultats***

Les résultats sont révélés par le test colorimétrique MTT décrit ci-dessus.

La viabilité de cellules est calculée après conversion des DO en pourcentage de viabilité puis comparés par la viabilité de la souche sans ajout des extraits.

Résultats et discussion

Chapitre I : Etude phytochimique des espèces *S.aursiaca* et *St.guyoniana*

I.1. L'extraction

L'extraction des parties aériennes de *S.aursiaca* par macération dans le mélange (EtOH/H₂O: 7/3, v/v) et la partition entre les différents solvants nous ont permis d'obtenir les quantités (g) récupérées de chaque phase, et leurs rendements comme indiqué dans le tableau ci-dessous

Tableau 05 : Quantités et rendement des extraits organiques de l'espèce *Salvia aursiaca*.

Extrait	Poids (g)	Rendement (%)
Extrait aqueuse	12,27	10.57
Extrait ether de pétrole	0,12	0.10
Extrait chloroformique	1,96	1.69
Extrait acétate d'éthyle	2,95	2.54
Extrait butanolique	5,49	4.73

Il est à noter que les extraits de l'espèce *St.guyoniana* ont été extraits de la même méthode au laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) de la faculté des sciences exactes de l'université Constantine1.

I.2. Dosage des polyphénols totaux

La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisée dans les laboratoires et donne des résultats fiables et reproductibles. Les résultats sont exprimés dans les tableaux 08 et 09 pour chacune des espèces et la comparaison entre les résultats des deux extraits chez les deux espèces dans la figure 21.

Une formule (indiquée précédemment) prend en compte la masse des extraits de plantes étudiées ainsi que la masse et les caractéristiques physico-chimiques du pyrogallol nous a permis de calculer directement le taux des polyphénols de chacun des extraits étudiés.

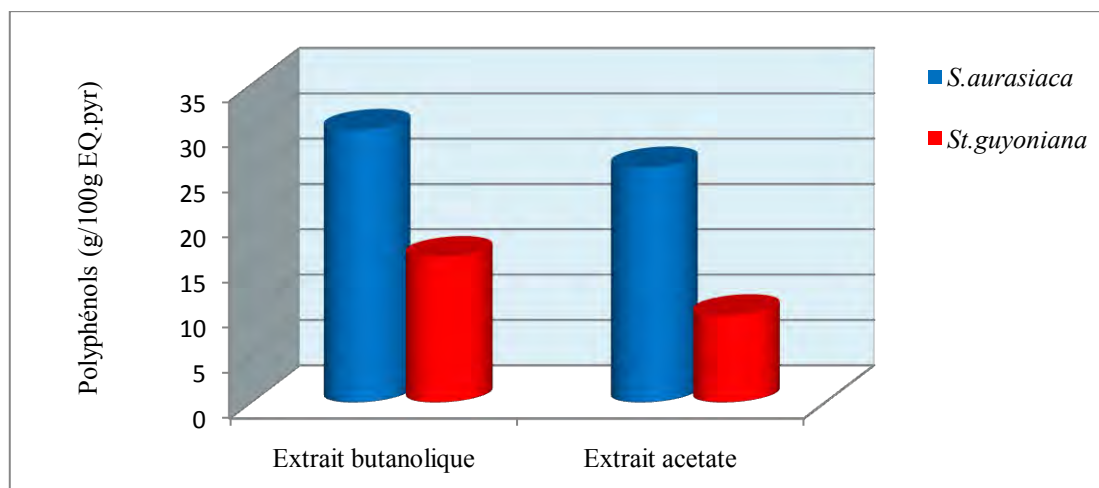
Tableau 06 : Résultats de dosage des polyphénols totaux de l'espèce *S. aurasiaca*.

L'extrait	DO		Le taux des polyphénols totaux (g/100g équiv.Pyrogallol)
EASA	1.965	1.641	25.91±0.38
EBSA	1.918	1.923	30.09±0.59
Pyrogallol	0.606	0.711	

Les résultats de mesure de l'absorbance du pyrogallol ont été utilisés aussi bien pour les calculs de taux des polyphénols des extraits EASA et EBSA de la plante *S.aurasiaca* que pour les extraits EASG et EBSG de la plante *St.guyoniana*. Les mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions opératoires pour les différents essais sur les extraits de chaque espèce.

Tableau 07: Résultats de dosage des polyphénols totaux de l'espèce *St. guyoniana*.

L'extrait	DO		Le taux des polyphénols totaux (g/100g équiv.Pyrogallol).
EASG	0.557	0.627	9.612 ± 0.968
EBSG	1.022	1.095	16.021 ± 0.493
Pyrogallol	0.606	0.711	

Figure 20 : Comparaison entre le contenu polyphénolique des phases des espèces *S. aurasiaca* et *St. guyoniana*.

D'après les résultats obtenus, on peut déduire que les deux plantes possèdent des teneurs en polyphénols importantes. Généralement, toutes les plantes de la famille des Lamiaceae sont connues pour leurs richesses en composés phénoliques (Gortzi *et al.*, 2007, Fecka *et al.*, 2008).

L'extrait EBSA présente la valeur la plus élevée avec une teneur 30.09 ± 0.59 g/100g équivalent Pyrogallol, tandis que l'extrait EASA vient en seconde position avec une teneur de 25.91 ± 0.38 g/100g équivalent Pyrogallol.

L'extrait EASG présente une valeur de 9.612 ± 0.968 g/100g équivalent Pyrogallol, alors que l'extrait EBSG présente 16.02 ± 0.493 g/100g équivalent Pyrogallol. Ces dernières sont proches des résultats de Laggoune, (2011), qui indique que les extraits butanoliques des espèces *St. circinata* et *St. mialhesi*, présentent des teneurs de 14.5 ± 0.1 et 17.9 ± 0.1 g/100g équivalent Pyrogallol respectivement. Les résultats obtenus pour *St. guyoniana* paraissent faibles en comparant avec les extraits phénoliques de l'espèce *S. aurasiaca*, cette dernière présente des teneurs en polyphénols élevées (Figure 21).

Les études de (Y.rong Lu *et al.*, 2001), indiquent que le genre *Salvia* est une source très riche des polyphénols avec un nombre plus de 160 polyphénols identifiés et isolés de différentes espèces de ce genre.

Par ailleurs, la recherche bibliographique réalisée sur le genre *Stachys* montre la diversité du contenu phénolique de type flavonique, ce qui est en corrélation avec les travaux de certains auteurs (Marin *et al.*, 2004 ; Skaltsa *et al.*, 2006 ; Ahmed *et al.*, 2005 ; Bishara *et al.*, 1976 ; Kostyuchenko *et al.*, 1982 ; El-Ansari *et al.*, 1991 ; Lenherr *et al.*, 1984) qui indiquent que le genre *Stachys* présente une grande variété des classes polyphénoliques isolées et identifiées.

La teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008 ; Podsedek, 2007). La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques rudes (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008).

I.3. Dosage des flavonoïdes

La raison principale pour laquelle on a choisi ces métabolites, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant comme standard la quercétine (Figure 22), les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EQ/g d'extrait. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 10 et la comparaison entre les résultats obtenus pour les phases des deux espèces et représentée dans la figure 23.

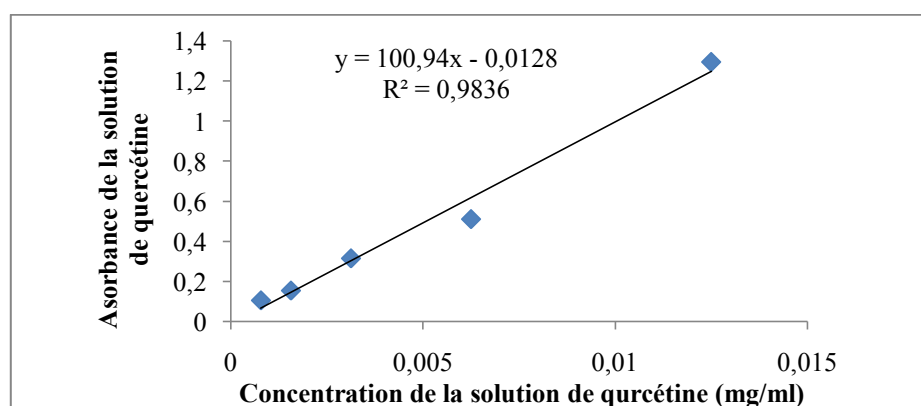


Figure 21 : courbe d'étalonnage de la quercétine.

Tableau 08 : teneur en flavonoïdes des extraits butanolique et acétate de *S.aurasiaca* et *St. guyoniana*.

Extrait	Teneurs en flavonoïdes (mg EQ/g) d'extrait.
EASA	65,0875 ± 14,72
EBSA	46.07±2.53
EASG	42.0625 ± 0,79
EBSG	66.6875 ± 5,17

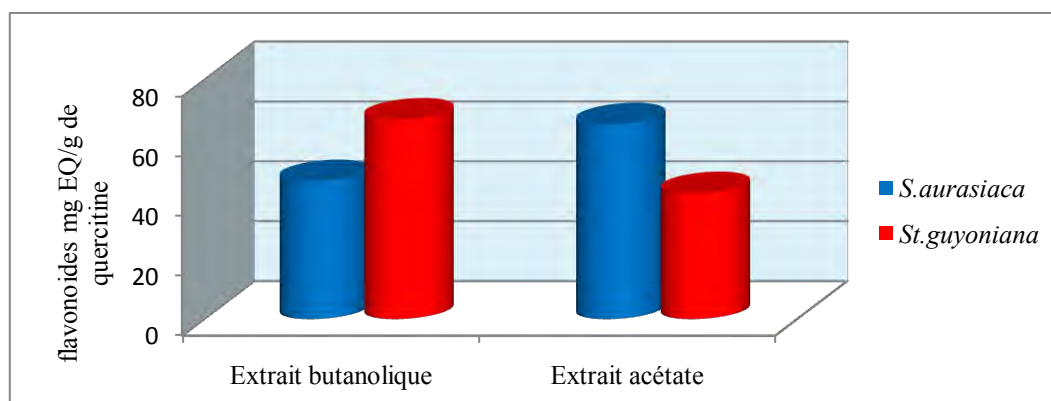


Figure 22 : Comparaison du contenu en flavonoïdes des extraits des espèces *S. aurasica* et *St. guyoniana*.

Les extraits EBSG et EASA présentent les teneurs les plus importantes en flavonoïdes, avec $66.68 \pm 5,179$ et $65,0875 \pm 14,72$ mg /g d'extrait en terme de quercétine équivalent respectivement. Alors que les teneurs des extraits EBSA et EASG sont proches et moins importantes que les deux extraits précédents avec des valeurs de 46.07 ± 2.53 et $42.06 \pm 0,79$ mg /g d'extrait en terme de quercétine équivalent respectivement. On remarque aussi que les deux extraits pour chaque espèce (extrait butanolique et extrait acétate) présentent des teneurs différents, l'extrait EASA est plus riche que l'extrait EBSA et vis-versa pour l'espèce *St. guyoniana*.

Selon les travaux antérieurs rapportés par la littérature (Marin *et al.*, 2004 ; Skaltsa *et al.*, 2006 ; Ahmed *et al.*, 2005 ; Bishara *et al.*, 1976 ; Kostyuchenko *et al.*, 1982 ; El-Ansari *et al.*, 1991 ; Lenherr *et al.*, 1984 ; Nazemiyeh *et al.*, 2006 ; Kotsos *et al.*, 2007 ; Derkach *et al.*, 1980) le genre *Salvia* est riche en flavonoïdes. Ces derniers sont largement distribués chez les espèces de ce genre (Sagdullaeva *et al.*, 1972; Smirnova *et al.*, 1974; Adzet *et al.*, 1987; Ulubelen *et al.*, 1990). Par ailleurs selon Elâgoun, (2003), l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C-glycosides. En tenant compte de la sélectivité de chaque solvant utilisé pour le fractionnement, on admet que l'espèce *S. aurasica* est riche en aglycones et faiblement riche en flavonoïdes glycosylés. Nous pouvons donc dire que nos résultats viennent corroborer les travaux de Lu *et al.*, (2002) qui indiquent que les phénols glycosylés sont pas très abondants chez le genre *Salvia* et que la majorité se sont des aglycones. Ce qui n'est pas le cas pour l'espèce *St. guyoniana* qui semble moins riche en aglycones, est plus riche en flavonoïdes glycosylés (Figure 23).

Chapitre II : Etude des activités biologiques

II. 1. Activité antileishmanienne

II.1.1. Effet leishmanicide des extraits phénoliques sur la forme promastigote de *L. major*

La recherche des principes actifs extraits de plantes est guidée entièrement par les résultats des tests biologiques spécifiquement choisis. Des tests sur cultures cellulaires de parasites sont disponibles pour évaluer l'effet des extraits ajoutés à la culture en phase exponentielle après 48 heures de leur adjonction. Les résultats sont exprimés par la concentration inhibitrice de 50% de la croissance parasitaire. L'IC₅₀ (µg/ml) est déterminée à l'aide des pourcentages d'inhibition de différentes concentrations grâce au logiciel Excel (Tableau 10). La sensibilité du parasite vis-à-vis des extraits testés a été comparée par sa sensibilité par rapport à l'Amphotéricine B. Les résultats de l'effet leishmanicide de la première série de dilutions 200, 100, 50 µg/ml pour les quatre extraits EASA, EBSA, EASG, EBSG sont représentés par les figures 29, 30, 31, 32, 33.

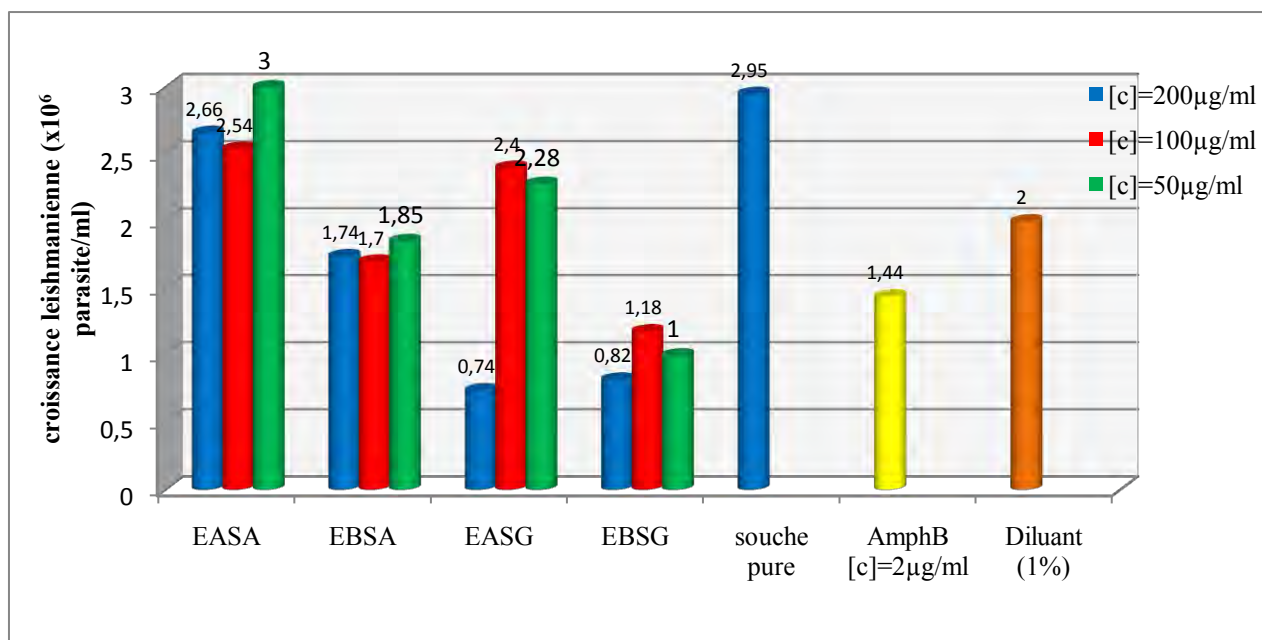


Figure 23 : Effet leishmanicide des extraits en fonction des différentes concentrations sur l'espèce *L. major*

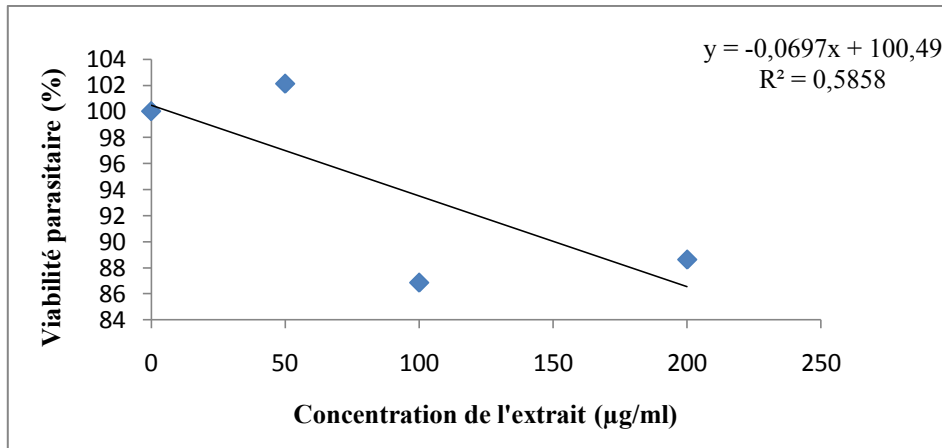


Figure 24 : Effet leishmanicide de l'extrait EASA en fonction de différentes concentrations sur *L.major*.

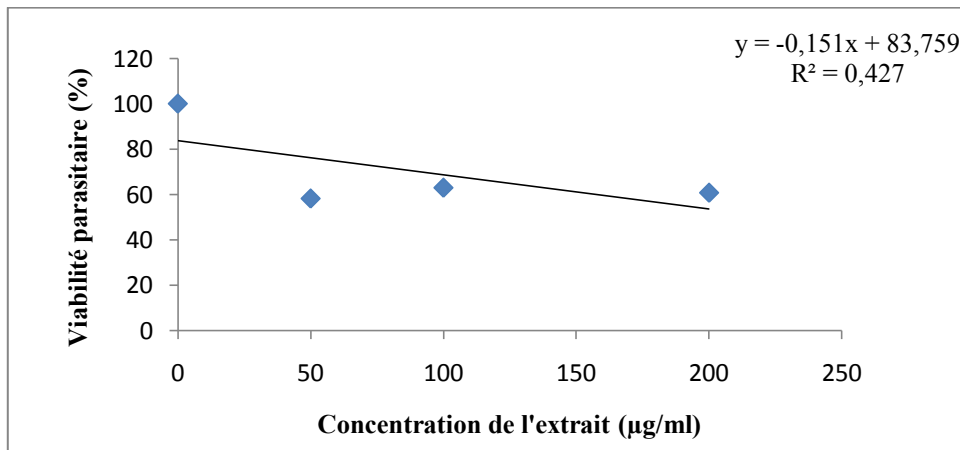


Figure 25 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSA en fonction de différentes concentrations sur *L.major*.

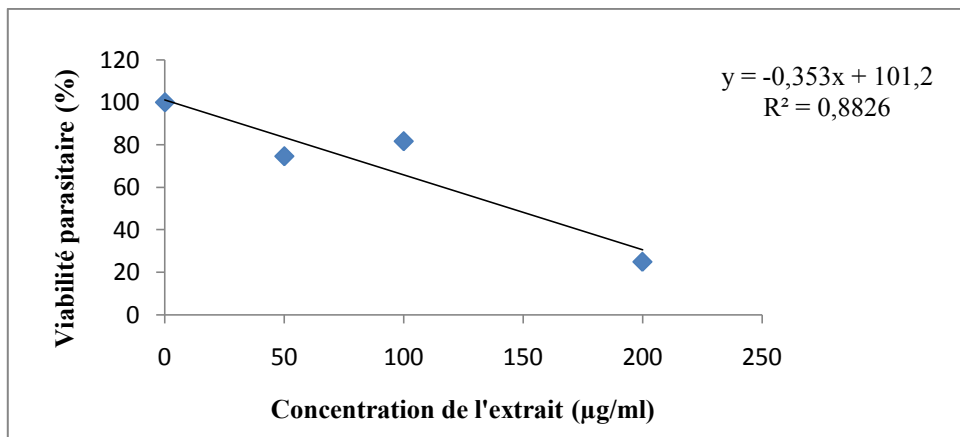


Figure 26 : Effet leishmanicide de l'extrait EASG en fonction de différentes concentrations sur *L.major*.

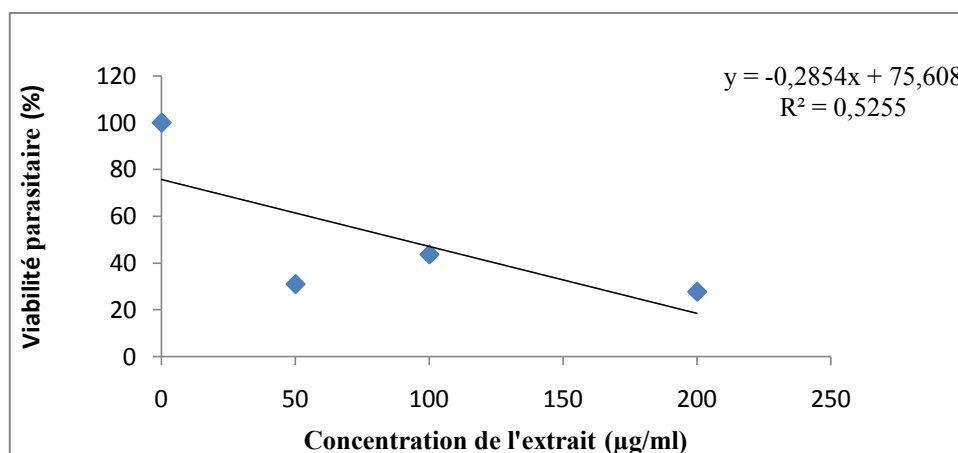


Figure 27 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSG en fonction de différentes concentrations sur *L. major*.

II.1.1.1. Calcul d'IC₅₀ des extraits testés sur *L. major*

Les IC₅₀ calculées à partir des courbes linéaires précédentes qui représentent le pourcentage de viabilité parasitaire sont illustrées dans le tableau 10.

Tableau 09 : calculs de l'IC₅₀ leishmanienne des différents extraits.

Extrait	IC ₅₀ de la croissance leishmanienne (µg/ml)
EASA	381.9
EBSA	>400
EASG	<u>139.8</u>
<u>EBSG</u>	<u>62.58</u>

La première série des dilutions a révélé que les extraits EASA et EBSA ne semblent avoir aucun effet sur la forme promastigote de sur l'espèce *L. major* avec des valeurs des IC₅₀ élevées 381.9 µg/ml et >400 µg/ml respectivement tandis que la croissance parasitaire en présence des différentes concentrations de ces deux extraits varie de 1.85 x10⁶ jusqu'à 3x10⁶ parasite/ml et qui est presque identique à la croissance de la souche pure avec une valeur de

2.95×10^6 parasite/ml. L'extrait EBSA exprime une légère activité leishmanicide avec des taux de croissance qui varie entre 1.75 à 1.85×10^6 parasite/ml, ce qui n'est pas significatif. Ces résultats permettent de déduire que la plante *Salvia aurasiaca* ne semble pas présenter une activité leishmanicide sur l'espèce *L.major*.

Quant aux extraits de la plante *Stachys guyoniana*, ces derniers ont montré une activité leishmanicide sur l'espèce *L.major* à partir de la première série des dilutions avec une IC_{50} de $62.58 \mu\text{g/ml}$ et $139.8 \mu\text{g/ml}$ respectivement pour les extraits EBSG et EASG.

La croissance parasitaire en présence de l'Amphotéricine B à 1.44×10^6 parasite /ml est plus importante que celle en présence de l'extrait EBSG avec des valeurs entre 0.8 et 1×10^6 parasite/ml. On peut donc déduire que cet extrait semble être plus actif que l'Amphotéricine B sur la souche *L.major*. Par ailleurs l'éthanol qui est utilisé comme diluant montre un effet leishmanicide léger avec une croissance parasitaire de 2×10^6 parasite/ml, ce qui est loin d'être significatif.

Les résultats obtenus nous ont conduit à préparer une deuxième série de dilutions sur les extraits EASG et EBSG de l'espèce *Stachys guyoniana* à cause de leur valeurs des IC_{50} plus ou moins faibles et pour une meilleure évaluation de leur activité anti-leishmanienne. Les dilutions effectuées sont les suivantes : 25 ; 12.5 ; 6.25 ; 3.125 et $1.5625 \mu\text{g/ml}$. Les résultats ont été obtenus suite aux comptages à l'aide de la méthode MTT (figure 34, 35), et les IC_{50} calculés sont présentés dans le tableau 11.

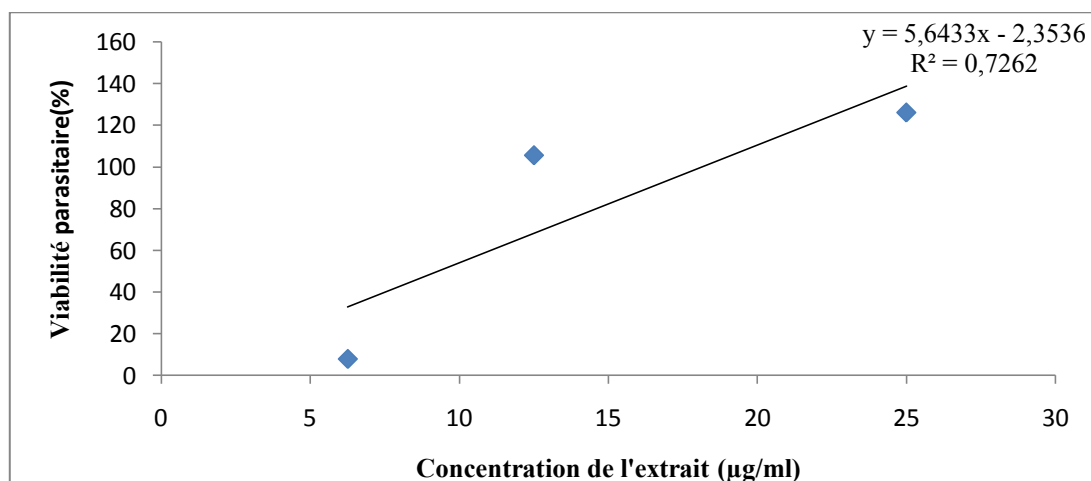


Figure 28: Effet leishmanicide de l'extrait EASG en fonction de concentration sur *L. major*

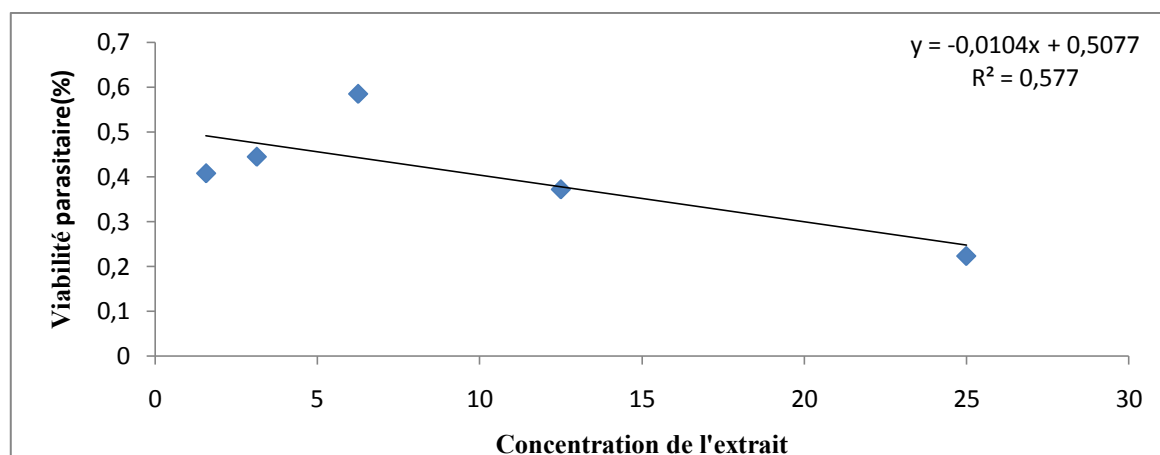


Figure 29 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSG en fonction de concentration sur *L. major*

Tableau 10 : Calculs de l'IC₅₀ leishmanienne des extraits EASG et EBSG

Extrait	IC ₅₀ (μg/ml)
EASG	<u>10,46</u>
EBSG	<u>19,10</u>

Dans la deuxième série des dilutions Les extraits EASG et EBSG ont prouvé leur activité antileishmanienne vis-à-vis de l'espèce *Leishmania major*. L'extrait EASG a montré une importante activité vis-à-vis de la souche avec une IC₅₀ de 10,46 μg/ml. L'extrait EBSG a révélé une activité antileishmanienne pour la même souche avec une IC₅₀ de 19.10 μg/ml sur la forme promastigote après comptage par test MTT ce qui confirme les résultats de la première série de dilutions.

A partir de ces résultats on peut déduire que les extraits phénoliques de la plante *Stachys guyoniana* (extrait butanolique et extrait acétate) présentent une activité leishmanicide contre l'espèce *L.major* espèce incriminée dans la leishmaniose cutanée en Algérie.

La différence entre les IC₅₀ des deux séries de dilutions pourrait probablement être due à l'utilisation des deux techniques de comptage différentes (cellule de Thoma et test MTT) dans les deux séries de dilution, et aux erreurs lors de manipulation.

Bien que notre espèce, *S.aurasiaca*, n'exerce aucune activité antileishmanienne détectable, cependant il a été démontré par Tan *et al.*, (2002) que des espèces du même genre, telle que *S.cilicica*, contenaient des molécules bioactives leishmanicides. Par ailleurs, une étude ethnobotanique effectuée par El Rhaffari *et al.*, (2002) au Maroc, a montré l'utilisation de l'espèce *S.clandestina* Batt, du même genre *Salvia*, dans le traitement traditionnelle de la leishmaniose ainsi que d'autres espèces. Ces dernières ont été utilisées après décoction pour le rinçage, le nettoyage, l'éloignement des anophèles, maturation des boutons et pour l'inhibition des surinfections.

Il est à noter que parmi la flore végétale maghrébine, la plante *Artemesia herba- alba* Asso de la famille des Asteraceae est très utilisée dans la médecine traditionnelle et a montré une activité leishmanicide vis-à-vis de deux espèces de *Leishmania* (*L. tropica* et *L. major*) avec des IC₅₀ de 2µg/ml et 4µg/ml (Hatimi *et al.*, 2000). Ces résultats sont proches de ceux obtenus dans notre étude, d'autant qu'ils concernent les espèces rencontrées dans notre pays avec une moindre incidence pour la souche *L. tropica*. Par ailleurs, d'autres espèces d'Asteraceae (*Pentacalia desiderabilis*) ont révélé une activité contre les promastigotes de *Leishmania* (*L.*)*chagasi*, *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* et *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* avec des IC₅₀ de 17.22 ; 12.93 ; et 11.86 µg/ml (Morais *et al.*, 2012). Ce qui met en exergue la grande importance de la phytothérapie par les plantes en général, et par des molécules bioactives en particulier, dans le traitement, la prévention et la lutte contre la maladie de leishmaniose causé par les différentes espèces de leishmania.

Dans le même contexte, d'autres travaux ont été réalisés pour mettre en évidence l'activité leishmanicide des plantes, notamment, ceux de Grenand *et al* (2004) sur la plante *Hyptis lacustris* A qui a montré que cette dernière avait une valeur d'IC₅₀ de 10 ±7.2 µg/ml. Cette espèce appartenant à la famille des Lamiaceae et dont le genre est généralement connu pour soigner des problèmes cutanés liés à des infections fongiques ou à des dermatoses.

Dans d'autres parties du monde, plusieurs familles, telles que les Rutacées et les Ulmacées se sont avérés actifs contre les formes promastigotes des différentes espèces de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* et *L.donovani*) à des concentrations allant de 25 à 100 µg/ml (Fournet *et al.*, 1992 ; Fournet *et al.*, 1994 ; Mishra *et al.* 2009).

II.1.2. Effet leishmanicide des extraits phénoliques sur la forme promastigote de *L. infantum*

Par le même modèle expérimental et dans les mêmes conditions opératoires nous avons évalué l'activité antileishmanienne des extraits étudiés pour leur cytotoxicité parasitaire vis-à-vis de l'espèce *L.infantum*. La culture de cette espèce demande une incubation plus longue que celle de *L.major* (72 heures). La souche choisie étant sensible à l'Amphotéricine B. Les résultats obtenus sont exprimés en IC₅₀ calculées à partir des courbes linéaires (Figures 36, 37, 38, 39, et 40) et illustrées dans le tableau 15. Il est à noter que suite aux contaminations des plaques de microtitration, seule le comptage par la méthode MTT a été pris en considération.

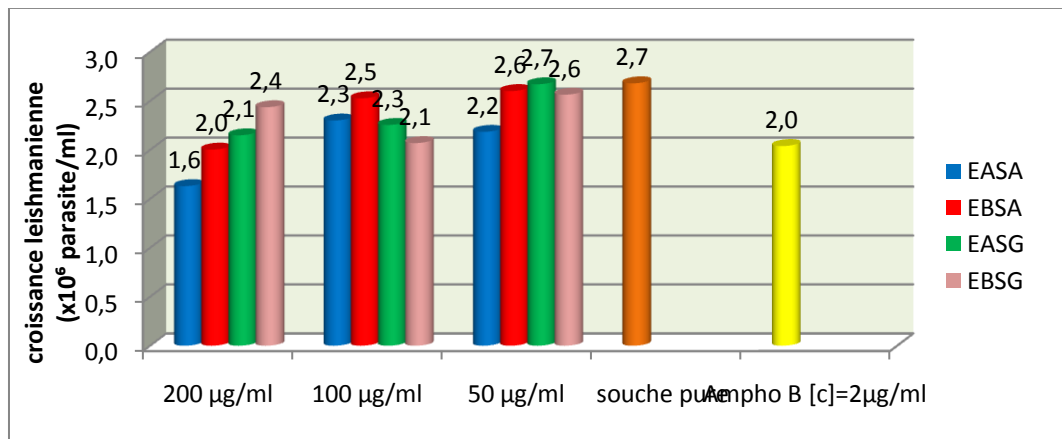


Figure 30 : effet leishmanicide des extraits en fonction de différentes concentrations sur *L.infantum*

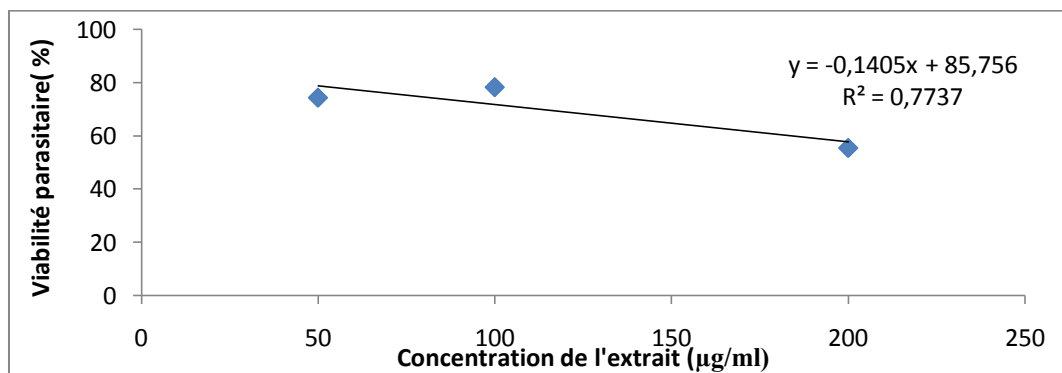


Figure 31 : Effet leishmanicide de l'extrait EASA en fonction de la concentration sur *L.infantum*.

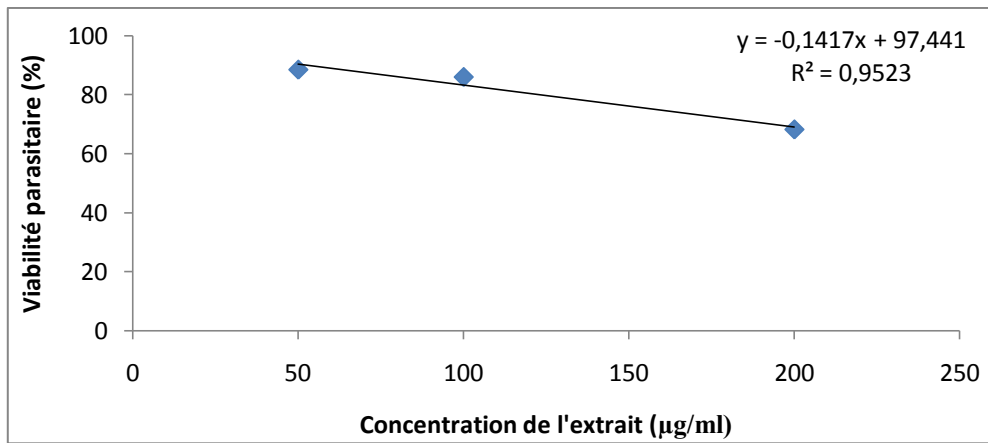


Figure 32 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSA en fonction de la concentration sur *L. infantum*

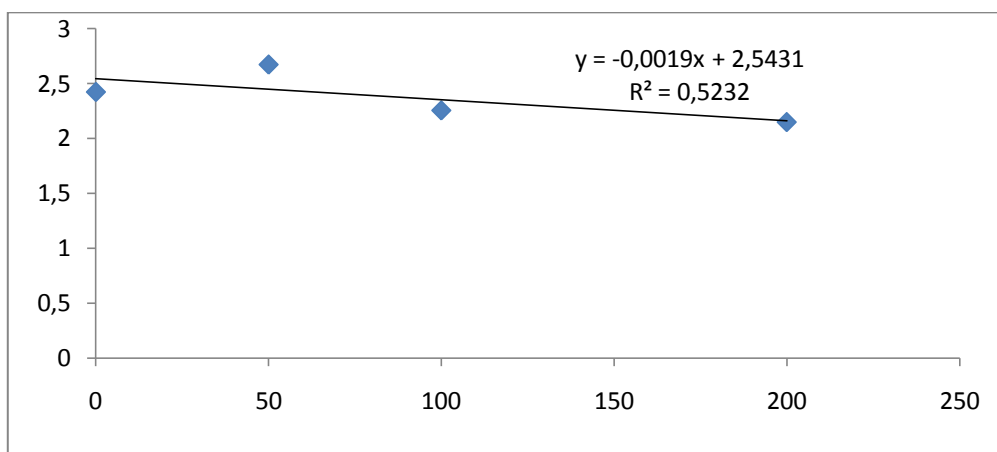


Figure 33 : Effet leishmanicide de l'extrait EASG en fonction de la concentration sur *L. infantum*

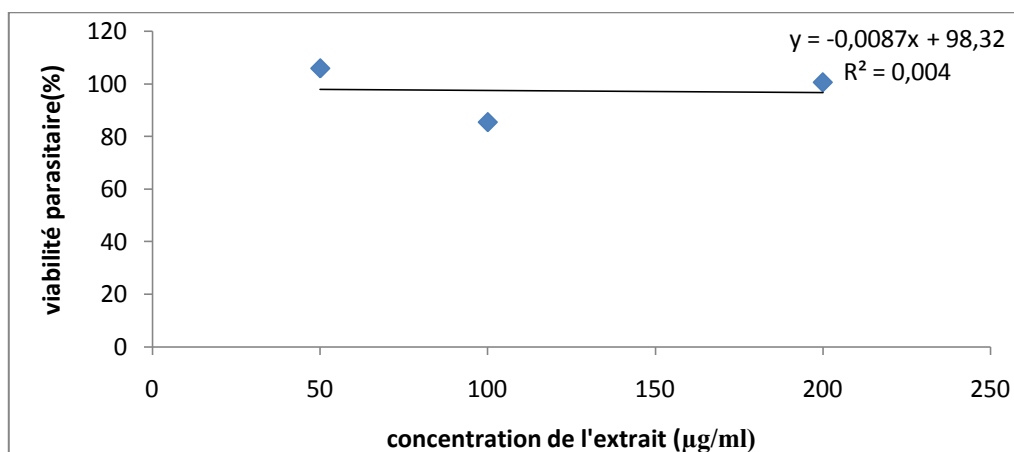


Figure 34 : Effet leishmanicide de l'extrait EBSG en fonction de la concentration sur *L. infantum*.

Tableau 12 : calculs des IC₅₀ leishmanienne des extraits pour *L. infantum*

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
EASA	223,35
EBSA	324,31
EASG	392,36
EBSG	138,11

La croissance parasitaire de l'espèce *L. infantum* en présence des extraits avec différentes concentrations et presque identique à celle de la souche pure (en absence des extraits) avec des valeurs qui varient de 1.6 jusqu'à 2.7 x10⁶ parasite/ml pour les extraits et une valeur de 2.7 x10⁶ parasite/ml pour la souche. Par ailleurs, les quatre extraits EASA, EBSA, EASG, EBSG présentent des valeurs d'IC₅₀ élevées (respectivement : 223, 324, 392, 138 µg/ml), ce qui n'est pas significatif. Ces résultats reflètent le fait que les extraits testés n'exercent aucun effet leishmanicide détectable sur l'espèce *L. infantum*. Ce qui nous permet de déduire que les deux plantes étudiées n'ont aucune activité leishmanicide apparente sur l'espèce *L. infantum*.

Etant donné que la sensibilité des deux espèces, *L. major* et *L. infantum*, vis-à-vis des extraits phénoliques de *Saurasiaca* et *St. guyoniana* n'est pas la même, on peut émettre l'hypothèse que cette sensibilité s'expliquerait par le fait qu'il pourrait exister des différences au niveau des patrimoines génétiques respectifs des souches leishmaniennes étudiées. Les génomes des espèces de leishmania n'étant pas identique, par conséquent, elles n'expriment pas les mêmes gènes. Ces différences génétiques pouvant être mises en évidence par des techniques modernes, tel que le typage moléculaire.

II.1.3. Test de cytotoxicité des extraits EASG et EBSG

La cytotoxicité des extraits étudiés sur des cellules des lignées humaines (des cellules Thp1), a été testée pour évaluer leur utilité comme produits bioactives à effet leishmanicide avec une cytotoxicité sélective. Les résultats sont présentés dans l’histogramme et le tableau 13 et la figure 41.

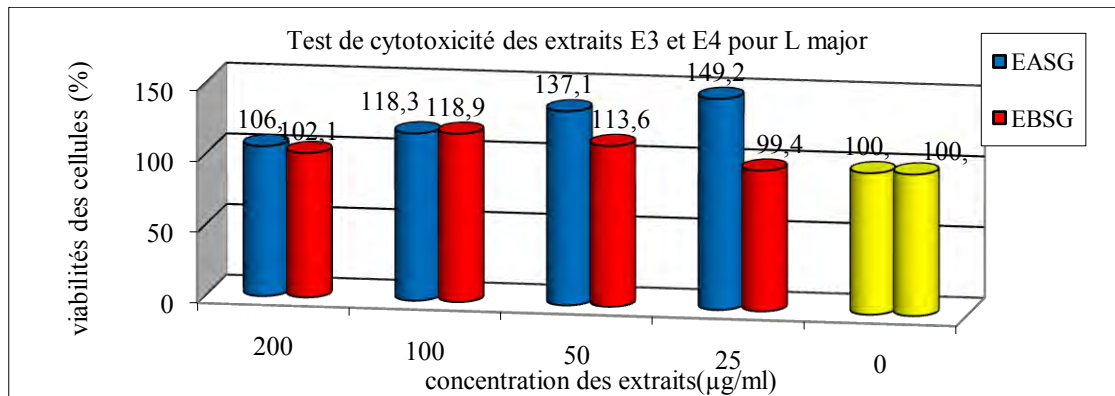


Figure 35 : Test de cytotoxicité des extraits EASG et EBSG sur les cellules Thp1.

Tableau 12 : Effet toxique des extraits EASG et EBSG (%) sur les cellules Thp1.

Concentration de l'extrait (µg/ml)	Effet de l'extrait EASG (x10 ⁶ parasite/ml)	Effet de l'extrait EBSG (x10 ⁶ parasite/ml)	% de viabilité EASG	% de viabilité EBSG
200	1,58	1,53	106,01	102,11
100	1,77	1,78	118,31	118,95
50	2,05	1,69	137,17	113,61
25	2,23	1,49	149,26	99,39
0	1,49	1,49	100	100

Nous avons testé la cytotoxicité de deux extraits d'intérêt EASG et EBSG sur des macrophages différenciés à partir des cellules ThP1. La viabilité des cellules en présence des concentrations de deux extraits EASG et EBSG qui augmentent de 0 jusqu'à 200µg/ml varient de 100% jusqu'à 149.26% et de 99% jusqu'à 118.95%, respectivement pour EASG et EBSG. À partir de ces résultats, on peut déduire que les deux extraits montrent très peu de cytotoxicité sur les THP1 et que leur action est plus spécifique sur le parasite, donc une utilisation prometteuse en thérapeutique antileishmanienne.

Des études sur la cytotoxicité des produits naturels ont montré l'intérêt des cellules Thp-1 dans l'évaluation de l'activité antileishmanienne (Gebre-Hiwot *et al.*, 1992 ; Ogunkolade *et al.*, 1990). Les tests de cytotoxicité sont très importants avec les produits naturels à cause de l'intérêt de ces derniers et leur utilisation comme un traitement thérapeutique alternatif à partir des plantes médicinales. L'utilisation répandue de médecine traditionnelle n'est pas prouvée comme étant sans danger pour les gens qui n'ont pas un accès au médicament pharmacologiquement actifs. Dans ce contexte, l'investigation de l'efficacité de produits naturelles est nécessaire (Edzard, 1998).

Conclusion

Les Leishmanioses représentent un problème de santé publique aux conséquences socio-économiques graves. Cette maladie est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde. Les traitements disponibles requièrent, pour la plupart, des administrations parentérales dont l'application est lourde sur le plan clinique et coûteux sur le plan financier. La nécessité de trouver de nouvelles molécules leishmanicides reste une priorité de santé publique pour les pays du tiers monde où sévit cette maladie.

Ce travail multidisciplinaire, se proposait de participer à mettre l'accent sur une alternative thérapeutique, de la leishmaniose en Algérie, par l'utilisation de la phytochimie. En effet, par cette étude, nous nous proposons de révéler la considérable diversité de substances naturelles issues des plantes *Stachys guyoniana* et *Salvia aursiaca* et ce, à travers leur teneurs en composés phénolique et en flavonoïdes, puis à mettre en évidence l'activité antioxydante et l'activité antileishmanienne de ces composés.

Les résultats obtenus dans l'analyse quantitative des composés phénoliques nous ont permis de déduire que ces deux plantes sont une source prometteuse et riche de polyphénols. La distribution de la teneur en polyphénols totaux entre les différentes phases phénoliques chez la même espèce, et aussi entre les deux plantes des deux genres, est importante et légèrement différente d'un extrait à l'autre. Parallèlement, la teneur en flavonoïdes est presque identique à celle des polyphénols existants dans ces extraits étudiés. En conséquence, la quantité des composés phénoliques présente dans les deux espèces constitue un index sur lequel nous pouvons nous appuyer pour l'étude phytochimique de chaque plante des deux genres *Stachys* et genre *Salvia*.

Enfin, l'étude de l'activité antileishmanienne a révélé que les extraits phénoliques de l'espèce *Stachys guyoniana* ont montré leur effet leishmanicide vis-à-vis de la souche *L.major* différemment à l'espèce *Salvia aursiaca*, tandis que les deux plantes n'exercent aucun effet antileishmanien, pour l'espèce *L.infantum*. En outre les extraits de la plante *St.guyoniana* possèdent une cytotoxicité sélective pour l'espèce *L.major*

En conclusion générale, nous pouvons dire que cette étude est la première réalisée sur l'activité antileishmanienne, *in vitro*, des extraits des plantes *St.guyoniana* et *S.aurasiaca*. Nous pouvons considérer la plante *St. Guyoniana*, à côté d'autres plantes, comme étant une source naturelle prometteuse pour des études plus approfondies tant sur le plan pharmacologique que chimique afin d'isoler des molécules bioactives antileishmaniennes. Ces plantes locales, étant peu ou pas étudiées, possèdent une vraie potentialité et une source riche de molécules bioactives d'où la nécessité de les investiguer par des études chimiques plus approfondies en utilisant des techniques performantes telle que la HPLC pour élucider leur composition quantitativement et qualitativement. L'aspect moléculaire devra compléter cette étude.

D'autres perspectives peuvent être envisagées telles que :

- Faire d'autres types d'extractions afin d'obtenir des molécules qui n'ont pas encore été identifiées et qui permettent d'ouvrir la porte à d'autres études des activités biologiques considérées comme nécessaire complémentaires.
- Elargir les essais *in vitro* sur le modèle amastigote et réaliser des tests *in vivo* sur des animaux de laboratoire afin d'assurer une étude complète de ces plantes suspectées d'avoir un effet leishmanicide.

*Références
bibliographiques*

- breu P.M., Martins E.S., Kayser O., Bindseil K.U., Siems K., Seemann A., Frevet J. (1999) Antimicrobial, antitumor and antileishmanial screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine* **6**:187–195.
- Adzet T., Canigueral S., Iglesias J. (1987) A chromatographic survey of polyphenols from *Salvia* species. *Biochemical Systematics and Ecology* **16**:29–32.
- Ahmad V.U., Arshad S., Bader S., Iqbal S., Tareen R.B. (2005) *Stachys floroside* E: A new acylated flavone glycoside from *Stachys parviflora*. *Polish Journal of Chemistry* **79**(8):1295-1300.
- Akendengue B., Ngou-Milama E., Hocquemiller R. (1999) Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* **6**:3-8.
- Alarcon-Aguilar F.J., Roman-Ramos R., Flores-Saenz J.L., Aguirre-Garcia F. (2002) Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research* **16**: 430- 431 432 ; 383–386.
- A.L. Catapano. (1997) *Angiology* **48**:39–44.
- Anton R. (2003) Plantes médicinales traditionnelles: suppléments alimentaires et (ou) médicaments. *Des sources du savoir aux médicaments du future* , IRD Editions.
- Anton R., Wichtl M. (2003) Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science thérapeutique. Cachan : 2ème Edition: Technique et Documentation.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) (2002) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of Linn Society* **141**:399-436.
- Arnal-Schnebelen B. (2004) *La place de la phytothérapie dans l'arsenal des traitements mis en œuvre par les médecins généralistes*. Paris : Pierre Fabre.
- Audier H. (1966) Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. *Bulletin de la Société Chimique de France* **9**: 2892-2899.
- Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B., Odugbemi T. O. (2008) Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International journal of health research* ; **1** (2):81-93.
- Bachi F. (2001) Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en ALGERIE. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger.
- Bahorun T. (1997) Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food and Agricultural Research Council, Réduit*, Mauritius ,83.
- Bailleul F. (2009) *Cours de pharmacognosie*. Lille: Faculté de pharmacie,.
- Baiocco P. (2009) Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of Medicine and Chemistry* **52**(8) :2603-12.

- Balana F.R., Reguera R., Cubria J.C., Ordonez D. (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *Genetic and Pharmacology* **30**:435–443.
- Banuls A. L., Hide M., Prugnolle F. (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* **64**:2-109.
- Barassi N., Benavides F., Ceccarelli A. (1996) Ethics in the use of experimental animals. *Medicina (B Aires)* **56**(5 Pt 1):531-2
- Basselin M. (2002) Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **46**(12): 3731-8.
- Belazzoug S. (1983) Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie). Infestation naturelle de « *Psammomys obesus* » (rongeur, gerbillidé). *Bulletin de la société de Pathologie Exotique* **76**:146.
- Belazzoug S. (1985) Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : Etude des réservoirs. Analyse chimiotaxonomique des parasites. Thèse de Doctorat en Sciences médicales.
- Belazzoug S. (1986) Découverte d'un *Merinos shawi* (rongeur, Gerbillide) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **79**:630-633.
- Berger I., Passreiter C.M., Ca'ceres A., Kubelka W. (2001) Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research* **15**:327–330.
- Berthillier A. (1972) La chromatographie et ses application ; Dunod Paris.
- Berman J. (2005) Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. *Expert Opinion Investigational Drugs* **14**(11):1337-46.
- Bero J., Hannaert V., Chataignea G., Hérenta M.F., Quetin-Leclercq J. (2001) In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *Journal of Ethnopharmacology* **137**: 998– 1002.
- Bessas A., Benmoussa L., Kerarma M. (2007) Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.
- Bhadra R. (1993) Antileishmanial agents. *Drugs Future* **18**: 451–463.
- Bhakuni D.S., Goel A.K., Jain S., Mehrotra B.N., Patnaik G.K., Prakash V. (1988) Screening of Indian plants for biological activity. Part XIII. *Indian Journal of Experimental. Biology* **26**:883–904.
- Bietrix J. (2004) Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l'arthrose du cheval. Thèse de docteur vétérinaire de l'université Claude-Bernard de Lyon, p51.
- Bigo C. (2011) La phytothérapie utilisée dans l'érythisme cardiaque .Thèse de doctorat en pharmacie.

- Bishara S.A.R., Zinchenko T.V., Nikonov G.K., Borzuno E.E. (1976) New acylated flavonoid from marsh betony. Borzunov, E. E. Ukr. Khim. Zh. *Russian Edition* **42**(3): 284-288.
- Bogdan C., Donhauser N., Doring R., Rollinghoff M., Diefenbach A., Rittig M. G. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* **191**(12): 2121-2129.
- Boudet A. M. (2000) L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France. p 116.
- Bors W., Michel C., Stettmaier K. (2001) Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods in Enzymology* **335**:166-180.
- Bravo L. (1998) *Nutrition Review*. **56**:317-333.
- Bray L. (2005) Phylogénie des Angiospermes. <http://www.botanique.org> consulté le 21/10/05.
- Bussièras J., Chermette R. (1992) *Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie, p 186.
- Cantino. (1999) Caryopteris (Lamiaceae) and the conflict between phylogenetic and pragmatic considerations in botanical nomenclature - Systematic botany *quarterly journal of the American Society of Plant Taxonomists*, **23**:369-386.
- Catapano A.L. (1997) *Angiology* **48**: p 39-44.//J.A.
- Carr G. (2004) Vascular Plant Family Access Page <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/pfamilies.htm>. Site du département de botanique de l'Université de Hawaii, consulté le 27/06/05.
- Carvalho P.B., Arribas M.A.G., Ferreira E.I. (2000) Leishmaniasis What do we know about its chemotherapy? *The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **36**(Suppl. 1):69-96.
- Carvalho P.B., Ferreira E.I., (2001) Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease review. *Fitoterapia* **72**:599-618.
- Cavalier S.T. (1981) Eukaryote kingdoms: Seven or nine ?. *Biosystems* **14**:461-481.
- Cavin A. (1999) Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p 241.
- Cowan M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* ; **12** (4): 564-570.
- Croft S.L., G.H. Coombs. (2003) Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitology* **19**(11) :502-8.
- Cuvelier ME., Berset C., Richard H. (1994) Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **42**: 665-9.
- Cwikla C., Schmidt K., Matthias A., Bone K.M., Lehmann R., Tiralongo E. (2010) Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against Heli-452 *Campylobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research* **24**:649-656. 453.

- Dacosta E. (2003) Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, p 317.
- Da Silva S.A.G., Costa S.S., Mendonc A. S.C.F., Silva E.M., Moraes V.L.G., Rossi-Bergmann B.(1995) Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica* **60** :201–210.
- Decaux I. (2002) Phytothérapie: mode d'emploi. Ed Le Bien Public :p 6-7.
- Decloitre F. (1993) Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de diététique* **28** (2):85-95.
- Dedet J.P. (2001) Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* **8**:506-510.
- Deineka V. I., Ermkov A. M. A.M., Tret'yakov, M.Yu. (2004) HPLC Investigation of triglycérides from plants and the lamiaceae family. *Chemistry of Natural Compounds* **5**(40): 413
- Del Giudice P., Marty P., Lacour J.P., Perrin P., Pratlong F. & Haas H. (1998).Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*, case report and review. *Arch Dermatol*; 134 : 193-198.
- Del Giudice P., Marty P., Lacour J.P.H. (2001) Leishmaniose cutanée autochtone en France métropolitaine. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie* **128**:1057-1062.
- Demirci F., Demirci B., Ali S.A., Shoudary M.I., Baser K.H.C. (1998) Bioassays on *Periploca graeca* L. (*Silk Vine*). *Acta Pharmaceutica Turcica* **40**:145–149.
- Depeint F., Gee J. M., Williamson G., Johson I. T. (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the Nutrition Society* **61**:97-103.
- Dereure J. (1999) In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris: Ellipses, p109-130.
- Derkach A.I., Komissarenko N.F., Gordienko V.G., Sheremet I.P., Kovalem I.P., Pakaln D.A. (1980) Flavonoids from *Stachys. spectabil Khimiya Prirodnikh Soedinenii* **2**:172–174.
- Desjeux P., Piot B., O'Neill K., Meert J.P. (2001) Co-infection a *Leishmania*/VIH dans le sud de l'Europe. *Médecine Tropicale* **61**:187-193.
- Duke A. J. (1986) Handbook of Medicinal Herbs, *CRC Press, Boca Raton*, p. 457.
- Duriez F. (2000) Dictionnaire des médicaments naturels. Paris : Seuil Pratique.
- Edzard E. (1998) Harmless herbs? A review of the recent literarure. *American Journal Medecine* **104**:170–178.
- El-Ansari M.A., Barron D., Abdalla M.F., Saleh N.A.M., Le Quere J.L. (1991) Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry* **30**:1169–1173.
- El kalamouni. (2010) Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.Thèse de doctorat.
- El rahafariL., Hammani K., Benlyas M., Zaid A.(2002) Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet. *Biologie & Santé* **4**(1) :46-51.

- 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.
- Euzeby J. (2008) Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris : Lavoisier, p818.
- Farnsworth NR., Soejarto DD. (1991) Global importance of medicinal plants. The conservation of medicinal plants. V. H. a. H. S. O. Akerele, *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Fecka I., Turek S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry* **108**:1039-1053.
- Flores N. (2008) *Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. Journal of Natural Products* **71**(9):1538-43.
- Floss H.G. (1997) Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports* **14**:433-434.
- Fouché J.G., A. Marquet., Hambuckers A. (2000) les plantes médicinales de la plante aux médicaments, Exposition temporaire du 19.09 au 30.06.2000.
- Fournet A., Angelo A, Munoz V, Roblot F, Hocquemiller R., Cavé A. (1992) Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* **37**:159-164.
- Fournet A., Barrios A.A., Munoz .V. (1994) Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **41**(1-2):19-37.
- Gao H., Nishida J., Saito S., Kawabata J. (2007) Inhibitory Effects of 5, 6, 7- Trihydroxyflavones on Tyrosinase. *Molecules* **12**:86-97.
- Gamet-Payraastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H., Payraastre B.(1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology* **32**:279-286.
- García M., Monzote L, Scull R., Herrera P. (2012) Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. *International Scholarly Research Network* .p5.
- Ghazanfari T., Hassan Z.M., Ebtakar M., Ahmadiani A., Naderi G., Azar A. (2000) Garlic induces a shift in cytokine in *Leishmania major*—infected balb/mice. *Scandinavian Journal. Of immunology* **52** :491–495.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**:1220-1234.
- Gonzalez A. G., Abad T., Jimenez I. A., Ravelo A. G., Luis J. G., Aguiar Z., Andres L.S., Plasencia M., Herrera J.R., Moujir L. (1989) *Biochemistry and Systematic Ecology* **17**: 293.

- González A.G., Rodriguez Pérez E.M., Padrón C.H., Bermejo, J. (1997) Phytochemical Investigation of Canary Island lichens. *Virtual activity and Pharmacology* p 49-60.
- González-Gallego J., Sánchez-Campos S., Tuñón M.J. (2007) Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrition hospitalaria* **22**(3):287-293.
- Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.I., Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M., Lopez-Munoz F.J. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* **111**:476-48.
- Gortzi O., Lalas S., Chinou I., Tsaknis J. (2007) Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum dictamnus* Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. *Molecules*. **12**:932-945.
- Grenand P. (2004) Pharmacopées traditionnelles en Guyane. *Créoles, Palikur, Wayãpi*, édition. IRD. Paris. p 816.
- Grogl M., T.N. Thomason., E.D. Franke. (1992) Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *American journal of tropical medicine and hygiene*, **47**(1):117-26.
- Glisic S., Jasna Ivanovica., Mihajlo R.B., Dejan Skalaa. (2009) Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids* **52**:62–70.
- Guingard J. (1996) Biochimie végétale, Ed. Lavoisier, Paris, p 175-192. UE PHR.
- Guignard J.L. (2001) Botanique systématique moléculaire. Masson, Paris.
- Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **27**:1-93.
- Handman E. (2001) Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews* **14**(2):229-243.
- Harrat Z., Pralong f., Belazzoug S., Dereure J.M., Deniau J.A., Rioux M., Bioelkaid., Dedet J.P. (1996) *Leishmania infantum* and *Leishmania major* in Algeria. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **90**(6):625-629.
- Harrat Z., Hamrioui B., Belkaïd M., Tabet-Derraz O. (1995) Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **88**:180-184.
- Hatimi M., Boudouma M., Bichichi N., Chaib., Idrissi N.G. (2000) Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso S. *Thérapeutique* Manuscrit n° 2162.
- Hayashi K., Nagamatsu T., Ito M., Hattori T., Suzuki Y. (1994) Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (1): effect of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. Japanese. *Journal of Pharmacology* **65**(2) :143-51.
- Hemingway R.W. (1992) Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpantpolyphenols: synthesis, properties, significance. *Laks P.E, Hemingway R.W* New York.

- Hertog M. G. (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society* **55** (1B):385-397.
- Hodek P., Trefil P., Stiborova M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes *P450*. *Chemico-Biological Interactions* **139**:1-21.
- Hoet S., Stevigny C., Block S., Opperdoes F., Colson P., Baldeyrou B., Lansiaux A., Bailly C., Quetin-Leclercq J. (2004) Alkaloids from *Cassipouira filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica* **70** :407–413.
- Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenthaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B., Legrand M. (2004) Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant cell* **16** (4):1446-1465.
- Hollman P. C. H. (2001) Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture* **81**: 825-842.
- Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T.P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G., Schnitzler J. P. (1998) Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany* **49**(323):953-965.
- INS. (2000) *Módulos Técnicos series de Documentos Monográfico. Ministerio de Salud Oficina General de Epidemiología*. Lima, p1-80.
- Iserin (2001) *Encyclopédie des plantes médicinales* ; Ed. Larousse-Bordas, Paris. 14.
- Iwu M.M., Jackson J.E., Tally J.D., Klayman D.L. (1992) Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). *Planta Medica* **58**:436–441.
- Iwu MM., Jackson JE., SCHUSTER BG. (1994) Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology today* **10**:65-68.
- Jaramillo M.C., Arango G.J., González M.C., Robledo S.M., Velez I.D. (2000) Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata pericarp*. *Fitoterapia* **71**:183–186.
- J.A Vinson., Y Hao., X Su., L Zubik J. (1998) *Agriculture and Food Chemistry* **46**:3630–3634.
- Johnson J.J (2011) Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters* **305**: p1–7. p474.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P. (2002) *Botanique systématique - une perspective phylogénétique*. De Boeck Université, Paris et Bruxelles.
- Kabouche A., Kabouche Z., Seguin E., Tillequin F., Bruneau C. (2005) A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) Lamiaceae. *Biochemical Systematic & Ecology* **33**:813-816.
- Kam T.S., Sim K.M., Koyano T., Toyoshima M., Hayashi M., Komyiama K. (1998) Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *Journal of natural product* **61**:1332–1336.

- Kansole M. (2009) Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de *leucas Martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia Opposita* Vahl et *ORTHOSIPHON PALLIDUS* Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies.
- Karaali A., Boyacioğlu D., Günez G., Özçelik B. (2004) Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. *European commission's the 6th framework program for research*. Istanbul technical university.
- Kaufmann M., Wink M. (1994) Molecular systematics of the Nepetoideae (family Labiatae): phylogenetic implications from rbcL gene sequences. *A Journal of Biosciences* **49**: 635-645.
- Kaye P. M., Curry A. J., Blackwell J. M. (1991) Differential production of Th1 and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled vaccine induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* **146**:2763-2770.
- Kening Y., Vincenzo D. L., Normand B. (1995) Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell* **7**:1787-1799.
- Kayser O., Kiderlen A.F., Bertels S., Siems K. (2001) Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrobiology and Agents Chemotherapy* **45**: 288–292.
- Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S. (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* **96** (3):229-245.
- Killicki-Kendrick R., Killicki-Kendrick M. (1999) Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *Canine leishmaniasis an update*. p26-32.
- Kolak U., Hacibekiroğlu I., Öztürk M., Özgökçe F., Topçu G., Ulubelen A. (2009) Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocalata*. *Turkish Journal of Chemistry* **33**:813 – 823.
- Kostyuchenko O.I., Komissarenko., N.F., Kovalev I.P., Derkach A.I., Gordienko V.G. (1982) Acetylspectabiflaside from *Stachys atherocalyx*. *Spectabil. Khimiya Prirodnikh Soedinenii* **97**(2):187–189.
- Kotsos M.P., Aligiannis N., Mitakou S. (2007) A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (Lamiaceae). *Biochemistry Systematic Ecology* **35**: 381-385.
- Kujala T. S., Lopenen J. M., Klika K. D., Pihlaja K. (2000) Phenolic and betacyanins in red beet root (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of totalphenolics and three individual compounds. *Food Chemistry* **48**:5338-5342.
- Lahouel M. (2005) Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.

- Lavaud C., Massiot G., Vasquez C., Moretti C., Sauvain M., Balderrama L. (1995) 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry* **40**:317–320.
- Lebham. (2005) Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- Lebreton P., Jay M., Voirin B. (1967) Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chimie Analytique France* **49**(7):375-383.
- Le Fichoux Y., Marty P., Kubar J. (1999) Diagnostic des leishmanioses. In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : Ellipses, p190-203.
- Lemma A., Maxwell A., Brody G. (1972) Antimicrobial and anthelmintic activities of endod (*Phytolacca dodecandra*). Research Report No. 12, Institut of Pathobiology, Addis Ababa University. pp. 6–10.
- Lenherr A., Meier B., Sticher O. (1984) Modern HPLC as a tool for chemotaxonomical investigations: iridoid glucosides and acetylated flavonoids in the group of *Stachys recta*. *Planta Medica* **50**(5):403–409.
- Lima CF., Valentao PC., Andrade PB., Seabra RM., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. (2007) Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemo Biological Interaction* **167**(2):107–115.
- Lu Y, L Yeap .(2002) Polyphenolics of *Salvia*. *Food Phytochemistry* **59**:117–140.
- Lin J. K. et Weng M. S. (2006) The science of flavonoïds: Flavonoïds as nutraceuticals. Ed Springer. p 213.
- Lockman Y., Vardy D., Ohayon D., El-On J. (1991) The failure of traditionally used desert plants to act against cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Annual of Tropical Medicine and Parasitology* **85**:499–501.
- Mahiou V., Roblot F., Hocquemiller R., Cave´ A., Barrios A.A., Fournet A., Ducrot P.H. (1995) Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *Journal of natural products* **58**:324–328.
- Malešev D., Kuntić V. (2007) Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society* **72** (10):921-939.
- Marfek A. (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.
- Marignac G., Lebastard M., Fall G., Nicolas L., Milon G. (2003) Exploration de la dissémination de *Leishmania*, un parasite dérivé et prélevé par le phlébotome au niveau du derme de l'hôte vertébré. *Bulletin Académique de Vétérinaire de France* **157** 2:41-45.

Marin P.D., Grayer R.J., Grujic-Jovanovic S., Kite G.C., Veitch N.C. (2004) Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus. *Betonica. Phytochemistry* **65**(9):1247–1253.

Markham K.R., Mabry T.J. (1968) *Phytochemistry* **7**:1197.

Martin S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* **51**: p304-315.

Martin T., Villaescusa L., Gasquet M., Delma F., Bartolome C., Diaz-Lanza A.M., Ollivier E., Balansard G. (1998) Screening for protozoocidal activity of Spanish plants. *Pharmaceutical Biology* **36**:56–62.

Marty P., Rosenthal E. (2002) Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. *Expert Opinion Pharmacotherapy* **3**(8):1101-1108.

Maurice N. (1997) De l'herbostérie d'anant à la phytothérapie moléculaires du XXI^e siècle. Ed : Lavoisier, Paris, p12-14.

Medic Sanic M., Jasprica I., Smolcic Bubalo A., Mornar A. (2004) Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoides and phenolic acids, *Croatica Chemica Acta*, p361-366.

Mihoubi I. (2006) Etude des Leishmanioses Diagnostiquées au centre hospitalo universitaire Ben Baddis De Constantine. Thèse de doctorat de l'université de Mentouri Constantine.

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* **166**:39-41.

Milane H. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.

Ming H. (2007) Commentary : bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *molecular pharmaceutics* **4**(6) :803-806.

Mirjalili M.H., Peyman S., Sonboli A., Vala M.M. (2006) Essential oil of variation *Salvia officinalis* Aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds* **42**(1).

Mishra B., Kale R., Singh R. K., Tiwari, V. K. (2009) Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* **80**(2):81-90.

Morais R.T., Romoff.P., Fàvero O.A., Reimão J.Q., Walkyria C. Lorenço., André G. Tempone., Angelica D., Hristov J.H., Silvia M. D S., Henrique G. L., Lago G., Sartorelli.P., Marcelo J., Ferreira. (2012) Anti-malarial, anti-trypanosomal, and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). *Parasitology Research* **110**:95–101.

Mittal N., Gupta N., Saksena S., Goyal N., Roy U., Rastogi A.K. (1998) Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Science* **63**:1823–1834.

Moreau F. (1960) "*Botanique : Procaryotes (cyanophytes et bactéries). Eucaryotes (algues, champignons et végétaux supérieurs).* La plante dans ses rapports avec le milieu." Ed. Paris, Gallimard.

Mossalayi M. D., Appriou M. (1999) Intérêt du monoxyde d'azote dans la defense anti-parasitaire. des macrophages humains. *Bulletin de la Societe de Pharmacie de Bordeaux* **138**: 7-17.

Mukherjee A. (2006) Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular Biochemistry and Parasitology* **145**(1): 1-10.

Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**:1561-1577.

Muzitano M. F., Tinoco L. W., Guette C., Kaiser C. R., Rossi-Bergmann B., Costa, S. S.(2009) The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*.*Phytochemistry* **67**:2071-2077.

Nacoulama-Ouedraogo O. G. (1996) Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso, cas du plateau central, Tome I et II Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Ouagadougou.

Nazemiyeh H., Shoeb M., Movahhedine N., Kumarasamy Y., Talebpour A-H., Delazar A., Nahar L., Sarker S-D. (2006) Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtschegleevii* (Lamiaceae). *Biochemic Systematic and Ecology* **34**:721-723.

Nicolas L., Sidjanski S., Colle J.H., Milon G. (2000) *Leishmania major* reaches distant Cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: A study with laboratory mice. *Infection and Immunity* **68**(12): 6561-6566.

Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens ,P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. M. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition* **74**:418-425.

Osman O.F., Kager P.A., Oskam L. (2000) Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Tropical Medecine and International Health* **5**(8): 553-562.

Palomo N. (2011) La gestion des plantes médicinales chez les communautés autochtones Nahuas de la Huasteca Potosina, Mexique . Université de Montréal Nadja Palomo Contreras.

Paris R.R., Moysse H. (1965) Précis de matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Ed Paris.

Park H. J., Cha H. C. (2003) Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society* 7:327-330.

Parnham, M.J. (1996) Benefit–risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. *Phytotherapy* 3:95–102.

Pimenta P.F.P., Saraiva E.B.B ., Sacks D.L. (1991) the comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental parasitology* 72: 191-204.

Piquemal G. (2008) Les flavonoïdes (en ligne): http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215'.

Plock A., Sokolowska-Koehler W., Presber W. (2001) Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania spp.* *Experience in Parasitology* 97:141–153.

Podsedek A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT* 40:1-11.

Portet B., Fabre N., Roumy V. (2007) Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* 68(9):1312-20.

Pratlong F., Lambert M., Bastien P. & Dedet J.P. (1997) Leishmaniose et immunodépression : Aspects biochimiques actuels. *Revue Française Lab* 291: 161-168.

Quezel P., Santa S. (1963) La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris, 360-361.

- Rathore, A., Juneja, R.K., Tandon, J.S. (1989) An iridoid glucoside from *Nyctanthes arbortristis*. *Phytochemistry* **28**:1913–1917.
- Reithinger R. (2007) Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases* **7**(9):581-96.
- Rechinger KH., Hedge IC. (1982) Flora Iranica. *Akademische Druck Verlagsanstalt, GrazAustria* 360-361.
- Rocha L.G., Aragão C.F.S., Loiola M.I. B., Bezerril R.A., Paiva N. R.F., Holanda C.M.C.X., Brito M.E.F. (2009) Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **19**(1A): 51-56.
- Sacks D., Kamhawi S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* **55**:453-483.
- Sacks D., Noben-Trauth N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews – Immunology* **2**:845-858.
- Saez J., Granados H., Torres B., Velez I.D., Munoz D. (1998) Leishmanicidal activity of *Annona aff. spraguei* seeds. *Fitoterapia* **69**:478–479.
- Sagdullaeva N. Z., Khazanovich R.L. (1972) Flavone substances of some *Salvia* species growing in Uzbekistan. *Meditinskii Zhurnal Uzbekistana* 17–19 (*Chemical Abstracts* 78, 94820c).
- Sahpaz S., Gonazalez M.C., Hocquemiller R., Zafra-Polo M.C., Cortes D. (1996) Annosenegalin and annogalene: two cytotoxic mono-tetrahydrofuran acetonins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. *Phytochemistry* **42**:103–107.
- Santo W.R., Bernardo R.R., Pecanha L.M.T., Palatnik M.,Parente J.P., Sousa C.B.P. (1997) Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the fml antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine* **15**:1024–1029.
- Sau K., Mamnbula S.S., Latz E., Henneks P. (2003) The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll like receptor- and CD14-dependent mechanism. *Journal of Biology and Chemistry* **278**(39): 37561-37568.

Sauvain M. (1989) Etude de plantes antiparasitaires du plateau des guyanes en amazonie : antipaludiques et antileishmaniens. Thèse de doctorat. Université de sud Paris.

Sauvain M., Kunesch N., Poisson J., Gantier J.C., Gayral P., Dedet J.P. (1996) Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae) *Phytotherapy Research* **10**:1–4.

Savchenko V.M., Khvorostinka V.M. (1978) Effects of a preparation from *Stachys inflata* on the course of experimental hepatitis in rats. *Farmatsevtivhnii zhurnal Kiev* **33**(4) :50–53.

Sereno D., Lemesre J.L. (1997) Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitology Research* **83**(4): 401-403.

Sharma U., Singh S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases* **45**: 255–272.

Sheng-Ji P. (2001) "Ethnobotanical Approches of Traditional Medicine Studies: Some Experiences from Asia." *Pharmaceutical Biology* **39**: 74-79.

Sine J. P. (2003) Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses editions marketing S A, p99-101.

Singha U.K., Guru P.Y., Sen A.B., Tandon J.S. (1992) Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *International Journal of Pharmacognosy* **30**: 289–295.

Skaltsa H.D., Lazari D.M., Chinou I.B., Loukis A.E. (1999) Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from southern Greece [letter]. *Planta Medica* **65**(3) :255–256.

Skaltsa H., Bermejo P., Lazari D., Silvan A.-M., Skaltsounis A.-L., Sanz A., Abad M.J. (2000) Inhibition of prostaglandin E2 and leukotriene C4 in mouse peritoneal macrophages and thromboxane B2 production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. *Biol. Pharm. Bull* **23**(1):47–53.

Slappendel R.J., Ferrer L. (1998) Leishmaniasis. *In*: GREENE CE, editor. Infectious diseases of the dog and the cat. 2nd ed. Philadelphia : WB Saunders, p450-456.

Smirnova L.P., Glyzin V.I., Patudin A.V., Bankovskii A.I. (1974) Flavones from some *Salvia* species. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* **10**:668–669. (Chemical Abstracts 82, 83016b).

Stewart P. (1974) Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Le Bulletin de la Société d'histoire naturelle d'Afrique du Nord* **65**: 239-252.

Strang C. (2006) Larousse medical. Ed Larousse.

Subsamanian S., Stacey G., Yu O. (2007) Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science* **12**(7):282-283.

Sundar S., Murray H. W. (1997) Immunotherapy using interferon gamma in Indian kala azar. *Acta Parasitologica. Turc.* **21**(S1) :78.

Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillon S.S. (2003) Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology* **88**:19-44.

Tahir A.E., Ibrahim A.M., Satti G.M.H., Theander T.G., Kharazmi A., Khslid A.S. (1998) The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytotherapy Research* **12**:576–579.

Takeda, Y., Fujita, T., Satoh, T., Kakegawa, H. 1985. On the glucosidic constituents of *Stachys sieboldii* Miq. and their effects on hyaluronidase activity. *Yakugaku Zasshi*, 105(10), 955–959.

Takeda Y., Zhang H., Masuda T., Honda G., Otsuka H., Sezik E., Yesilada E., Sun H. (1997) Megastigmane Glucosides From *Stachys Byzantina*. *Phytochemistry* **44**(7):1335-1337.

Tan N., Kaloga M., Adtke O. A., Kiderlen A. F., Öksüz S., Ulubelen A., Kolodziej H. (2002) Abietane diterpenoids and triterpenic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry* **61**:881.

Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. (2008) Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research* **7**(3):1089-1099.

Tasdemir D., Kaiser M., Brun R., Yardley V., Schmidt T. J., Tosun F., Ruedi, P. (2006) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(4):1352-1364.

Teissedre P. L., Vizzini M. I., Di Mago D., La Neve I., Giammanco S., La Guardia M., Ginmanco M. (2007) Composition de vins rouges siliciens et leurs propriétés nutraceutiques. 8th international enology symposium. June 25, 26 and 27. Bordeaux.

Tieppo J., Vercelino R., Dias A.S., Silva Vaz M.F., Silveira T.R., Marroni C.A., Marroni N.P., Henriques J.A.P., Picada J.N. (2007) Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology* **45**:1140- 1146.

Tiwari A. K. (2001) Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science* **81**(9): 1179-1181.

Torres-Santos E.C.S., Moreira D.L., Kaplan A.M.C., Meirelles M.N., Rossi-Bergmann B. (1999) Selective effect of 20,60-dihydroxy-40-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobiology Agents and Chemotherapy*. **43**:1234–1241.

Ulubelen A., Tuzlaci E. (1990) Flavonoids and triterpenoids from *Salvia euphratica* and *S. longipedicellata*. *Fitoterapia* **61**: 185.

Urquiaga I., Leighton F. (2000) Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research* **33**(2):55-64.

Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R., Colliver S. (2002) Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany* **53**(377):209-210.

Vernex-Lozet C. (2011) Les possibilités de la phytothérapie en Geriatrie canine. Thèse de doctorat Université de Lyon.

Villaescusa L., Diaz-Lanza A.M., Martin T., Gasquet M., Delmas F., Balansard G. (1996) Preliminary screening of antiprotozoal activity of *Jasonia glutinosa* aerial parts. *International Journal of Pharmacognosy* **34**: 303–304.

Vuorela S. (2005) Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

W.H.O. (2007) Lutte contre la leishmaniose. in *Soixanteième Asssemblée Mondiale De La Santé*.

Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., Ho C.T. (1998) Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:4869-4873.

Waechter A.I., Yaluff G., Inchausti A., Arias A.R., Hocquemiller R., Cave' A., Fournet A. (1998) Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research* **12**:541–544.

Weniger B., Robledo S., Arango G.J., Deharo E., Aragon R., Munoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R. (2001) Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology* **78**:193–200.

Werry M. (1995) Protozoologie médicale. Edition De Boeck Université, 123-136.

Wikipédia. (2008) L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>.

Williamson E. M. (2001) Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* **8**:401-409.

Wilson R.G., Bowie J.H. et Williams D.H. (1986) *Tetrahedron* **24**:1407.

Winkel-Shirley B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**:485-493.

Wissemann H. (1999) The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phytoestrogens. *Proceeding and Nutrition Society* **58**:139-146.

Wollgast J., Anklam E. (2002) *Food Research. International* **33**:423–447.

Wynn S. (2001) Herbs in Small Animal Practice. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, August 8-11, 2001. Vancouver.

Xu Y.C., Leung S.W.S., Yeung D.K.Y., Hu L.H., Chen G.H., Che C.M., Man R.Y.K.(2007) Structure- activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* **68**:1179-1188.

Yang R.Y., Lin S., Kuo G. (2008) Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of Pacific Journal of Clinical Nutrition* **17**(S1):275-279.

Yamahara J., Kitani T., Kobayashi H., Kawahara Y. (1990) Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Antianoxic activity and active constituents. Kyoto Pharmacy University., Kyoto, Japan. *Yakugaku Zasshi*, 110(**12**) : 932-935.

Zinchenko T. V., Voitenko G. N., Lipkan G. N. (1981). Antiinflammatory, antitoxic and hypoazothemic effects of the drug stachyrene from *Stachys recta*. *Farmakologiyai Toksikologiya* (Moscow) 44(**2**) :191-194.

لشجيرة شض ظي هي رو ايكسبث اتمبث و اتمبث جدر بيف الفكظم الادوية فشفش و خزكن طويك
 لحن بب اذيفت اذيفت اسكيس بسبب سبت فتيه ل كيرت , دم ك م لاحت كن جزيات جني ذكيت ضشوسه م ح ف ي
 سيق ل م ح دات راجزوت لبي ج د لظن م ل ال ح , انقام فب ذرات صرقي ن سبتيين من كوي من اقب يث (Lamiaceae)
Salvia aursiaca و *Stachys guyoniana* . لثبج لبحس م كوي بدمك شف لخرى الاضري و فتيين بيوني لاث
 فوال في ذات م غ و ج د اذ اقبث ك يث ون كيت من م س خ ص لاش . فكي يث ض ذ لش جيه من س خ ص ث و فتيين صرن ف
St.guyoniana كهي ن اشك م promastigote ن صرن ف *L.major* ل م و ول كن لش جيه ل ج فتي في ل ج فاش ,
 نكتبشوي ج ذبم فتي افس لبي ج د لظن م ل ال ح .

الكهث ل فتمب ح : لش جيه - فكي يث ض ذ لش جيه - *Salvia aursiaca* . *Stachys guyoniana* - Lamiaceae

Abstract

Leishmaniasis is a parasitical disease with heavy social-economic consequences. Indeed the available treatments require for the most, parenteral administrations which are costful for the concerned populations. The research of new active molecules is then a necessity. To participate in the effort of the research of therapeutic alternatives, we are interested in studying two plant species from the Lamiaceae family, *Salvia aursiaca* and *Stachys guyoniana* in this case, with both phytochemical and biological study. The obtained results reveal the metabolic richness of these two species in polyphenols and flavonoids with quantitative and qualitative variations from an extract to another. The antileishmanial activity of *St.guyoniana*'s phenolic extracts on the promastigote form of the species *L.major*, which cause the cutaneous leishmaniasis in Algeria constitute a strong promising result as a therapeutic alternative headline.

Key words:

Leishmaniasis - antileishmanial activity - *Salvia aursiaca* - *Stachys guyoniana*- Lamiaceae

Nom: RAMLI

Prénom: IMENE

Magister en Biologie : Option Biologie Appliquée.

Thème

ETUDE, IN VITRO, DE L'ACTIVITE ANTI LEISHMANIENNE DE CERTAINES PLANTES MEDICINALES LOCALES : CAS DE LA FAMILLE DES LAMIACEES

Résumé

Les leishmanioses sont des parasitoses aux conséquences socio-économiques lourdes. En effet les traitements disponibles requièrent pour la plupart des administrations parentérales et sont coûteux pour les populations concernées. La recherche de nouvelles molécules actives est donc une nécessité. Pour contribuer à l'effort de recherche d'alternative thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de deux espèces de plantes de la famille des lamiacées, *Salvia aursiaca* et *Stachys guyoniana* en l'occurrence. Les résultats obtenus, révèlent la richesse métabolique de ces deux espèces en polyphénols et en flavonoïdes avec des variations quantitatives et qualitatives d'un extrait à l'autre.. L'activité antileishmanienne des extraits phénoliques de *St.guyoniana* sur la forme promastigote de l'espèce *L. major*, responsable de la leishmaniose cutanée en Algérie, constitue un résultat fort prometteur en terme d'alternative thérapeutique.

Mots-clés : Leishmaniose - Activité anti-leishmanienne - *Salvia aursiaca* - *Stachys guyoniana* – Lamiaceae