

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

MEMOIRE DE MAGISTER

En biologie
Spécialité : biotechnologie végétale

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE
MEDICINALE : FRÊNE DE KABYLIE « *Fraxinus angustifolia* Vahl. »
ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES**

Par

Yasmina FADLI

devant le jury composé de :

- Mme F. SAIDI	Professeur, U. S. D. Blida 1	Présidente
- Mme F. Z. KARA-TOUMI	Professeur, U. S. D. Blida 1	Examinatrice
- Mme N. SMAIL SAADOUN	Professeur, U. M. M. Tizi Ouzou	Examinatrice
- Mme G. TAIL-HALIL	Professeur, U. S. D. Blida 1	Promotrice

Blida, 2017-2018

ملخص

دراسة فيتو كيميائية للنبته الطبية: *Fraxinus angustifolia Vahl.* دراسة بعض خصائصها البيولوجية

تعد الدراسات المنجزة حول الصنف النباتي *Fraxinus angustifolia Vahl.* قليلة نسبيا فيما يتعلق بنشاطاتها البيولوجية ، وعلى هذا الأساس يهدف هذا العمل العلمي إلى المساهمة في البحث عن إمكانيات فرماكولوجية جديدة للنبته.

لاستهلال الدراسة، تم إخضاع الأوراق لثلاث تقنيات استخلاص: التقطير المائي البسيط، الإغلاء والاستخلاص بالاستنفاد عبر السوكسلت. بحيث تم الحصول بالتوالي على أربع مستخلصات خامة: زيت أساسي، مستخلص مائي وبالاعتماد على نفس التقنية مستخلصين ميتانولي وآخر اثيروبترولي. وقد تباين عائد الاستخلاص من 0,03 إلى 43,03 %. كشفت الاستقصاءات الفيتو كيميائية المجرات على هذه المستخلصات الخامة عبر تفاعلات التشخيص اللونية والترسيبية، وجود أصناف كيميائية متنوعة: العفصيات، فلافونويدات، صابونوزيدات، غليكوزيدات قلبية، مركبات مرجعة والهلام النباتي ما برر الاستخدامات المتعددة لهذه النبته في الطب التقليدي. تم التقدير الكمي للمركبات المتعددة الفينولات الكلية المحتواة في هذه المستخلصات الخامة عبر التفاعل اللوني بكاش *Folin - Ciocalteu*, بحيث تباينت الكمية من 28.85 إلى 133.14 مع معادل لحمض الغاليك/غ من المستخلص. وبعد، تمحورت الاستقصاءات البيولوجية حول التقييم المخبري الأول من نوعه، لنشاط المستخلصات المدروسة المضاد للطفيليات، كما تطرقت أيضا للتقييم المخبري لنشاطهم المضاد للأكسدة. أسفر الفحص ضد الليشمانيا من جهة، على إبراز الزيت الأساسي والمستخلص الخام الاثيروبترولي كمرشحين واعدين ضد أصناف الليشمانيا الخمسة المدروسة. تباينت تراكيزهما الموافقة للتنشيط النصفى من 52.49 إلى 119.6 ميكروغرام/ ملل. من جهة أخرى، سمح هذا الفحص بتقييم السمية الخلوية لهذين المستخلصين ضد خط خلايا وحيدات البشرية محددًا تراكيز الانسمام الخلوي النصفى للزيت الأساسي بتركيز يساوي 63,4 ميكروغرام/ ملل و للمستخلص الاثيروبترولي بتركيز أعلى من 250 ميكروغرام/ ملل و. التركيبة الكيميائية لهذه المستخلصات لم يتم وصفها سابقا في مصادر البحث العلمي، التحليل بتقنية الكروماتوغرافيا الغازية المتصلة بمطياف الكتلة أدى إلى التعرف على نسبة 68,77 % من التركيبة الإجمالية للزيت الأساسي وعلى % 64,79 من الجزء المحلل. من ناحية أخرى، تقدير الخصائص المضادة للأكسدة باستعمال اختبار تثبيط الجذر الحر، اظهر نتائج تباينت من 46,84 إلى 249,5 ميكروغرام/ ملل حيث ابانت تفوق المستخلص المائي و عدم فعالية الزيت الأساسي بتركيز مختبر قدره 2000 ميكروغرام/ ملل. في النهاية تبقى هناك حاجة لدراسات أوسع لاستغلال النتائج الأولية المتحصل عليها في هذه الدراسة.

الكلمات المفاتيح: *Fraxinus angustifolia Vahl.* , مستخلصات خامة، زيت أساسي، ضد الليشمانيا، مضاد للأكسدة.

ABSTRACT

Phytochemical study of a medicinal plant: *Fraxinus angustifolia* Vahl. Study of some biological activities

A relatively few studies have been accomplished on the pharmacological activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl specie. Accordingly, contributing to a new medicinal potentialities research of the study plant was the aim of this current work. To this end, the leaves were subjected to three different extraction methods : simple hydrodistillation, decoction, and exhausting extraction in a Soxhlet apparatus. As a result, essential oil, aqueous crude extract, and by the same process both crude methanolic and petroleum ether extracts were respectively obtained as the four extractable products used in this study. The extraction yield varies from 0,03 to 43,03 %. The phytochemical investigations done on the crude extracts by characterization reactions revealed the presence of tannins, flavonoids, saponosides, cardiotoxic glycosides, reducing compounds and mucilages, which justify the *Fraxinus angustifolia* Vahl. employment in traditional medicine. The crude extracts content of total polyphenolic compounds also was estimate, using the colorimetric determination according to the Folin-Ciocalteu method. The polyphenolic content varies from 28.85 to 133.14 mg EAG / g. Thereafter, biological investigations were carried out on the first *in vitro* evaluation of antiparasitic potential of these extractable products, as well as on the *in vitro* evaluation of their antioxidant potential. The antileishmanial activity assessment has identified the petroleum ether extract and the essential oil as the promising candidates against the five *Leishmania* strains tested among the different product evaluated, the Median Inhibitory Concentration (IC₅₀) varies from 52.49 to 119.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Besides, this assessment allowed evaluating the cytotoxic effect of essential oil and the petroleum ether extract towards human monocytic cell line THP-1, the result was expressed as the concentration inhibiting cell growth by 50% (CC₅₀), showing respectively a CC₅₀ = 63,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and a CC₅₀ value higher than 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The chemical profile of these active extractables has never been described in the scientific literature, their analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS) performed during this study led to identifying 68.77 % of the essential oil total composition and 64.79% of the petroleum ether crude extract's analyzed fraction. Moreover, the antioxidant properties of the extractable products was assayed via the 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals scavenging test, the value of IC₅₀ obtained varies from 46.84 to 249.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In which, the aqueous crude extract exhibited the best antioxidant behavior. Whereas the increase to a maximal essential oil concentration tested of 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ has not shown any antioxidant effect. However, further studies are required to exploit these preliminary results.

Keywords : *Fraxinus angustifolia* Vahl., crude extract, essential oil, antileishmanial, antioxidant.

REMERCIEMENTS

L'étude présentée dans ce projet de mémoire s'est inscrite dans la lignée des travaux de recherche tracé par le laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement et Santé (B.E.S.) affilié au Département de la Biologie et Physiologie Cellulaire de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie à l'université de Saad DAHLAB, Blida1. Cette étude a été rendue possible grâce à la contribution de nombreuses personnes de différentes institutions.

Je souhaiterais premièrement remercier mon encadreur Professeur **G. TAIL - HALIL** pour sa disponibilité pérenne, ses encouragements persévérants et sa confiance tout en m'offrant une part de liberté pour concrétiser ce travail. Ses conseils et son soutien inébranlable ont été particulièrement précieux.

Je voudrais ensuite exprimer mes remerciements et ma gratitude les plus profonds au Professeur **F. SAIDI**, pour m'avoir gracieusement soutenue tout au long de mon travail et pour avoir acceptée de faire partie de mon jury de thèse en tant que Présidente malgré ses multiples responsabilités. J'aimerais également remercier chacun des membres du jury, Pr. **F. Z. KARA-TOUMI** et Pr. **N. SMAIL SAADOUN** de me faire bénéficier de leur longue expérience en acceptant de juger ce travail.

Je fais part de mon infinie reconnaissance à l'ensemble du personnel de l'Institut National de Recherche Forestière (INRF) pour son amabilité exceptionnelle, je remercie notamment Monsieur **M. KHEMISSI** pour m'avoir si chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire d'extraction des huiles essentielle. Que Mademoiselle **G. RAHILI** soit particulièrement assurée de ma gratitude éternelle pour son soutien sans faille, bienveillance intangible et sa confiance Indéfectible en mettant à ma disposition tous les moyens technique nécessaires pour aborder la partie phytochimique de ce travail. Je tiens à remercier aussi Madame **S. BERKA**.

Je souhaiterais également témoigner toute ma reconnaissance au Pr. **Z. HARRAT** pour m'avoir permis de réaliser les essais d'évaluation biologique au sein de son laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA). J'aimerais aussi remercier Mme **N. EDDAIKRA**

REMERCIEMENTS

pour sa rigueur, son aide inestimable, son professionnalisme, et pour tous ses judicieux conseils techniques portant sur les essais antiparasitaires. Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire.

De plus, j'exprime mes sincères remerciements à toute l'équipe du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico - Chimique (CRAPC), parmi eux je remercie vivement, le Dr. **K. BACHARI**, Directeur du centre, Mme **N. TAIBI**, Directrice de la Division santé, Mr. **A. BOUMECHHOUR**, M^{lle} **S. BELMIRI** et Mr. **M. BOUHENNA** pour leur accueil bienveillant et leur générosité.

Mes remerciements les plus chaleureux vont ainsi à :

- Mme **M. F. KOREICH HAMANA** ainsi qu'à M^{lle} **R. BENSALÉM** du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche (MADRP) ;
- Dr. **K. MANSOURI** et Dr. **H. CHADER** du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP) ;
- M^{lle} **S. AZOUANI**, Directrice de Laboratoire Régional, Centre de l'Observatoire National de l'Environnement et du Développement Durable (ONEDD).
- Pr. **F. BENTAHAR**, Responsable de Laboratoire des Phénomènes de Transfert à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB).

Un merci bien spécial au Dr. **F. DERRAR**, responsable du Centre National de référence pour la grippe à l'IPA, pour son accueil admirable et son extrême affabilité.

Enfin, je suis immensément redevable à M^{lle} **T. DAHMANE** de l'Institut de Technologie Moyen Agricole Spécialisé (ITMAS) pour son aide inlassable et l'attention qu'elle m'a accordée. Et merci encore à Mr **Reda BEHLOULI**, M^{lle} **S. CHAABANE** et à tous mes collègues en poste de graduation, U. de Blida, pour leur aimable disponibilité. Je tiens à remercier vivement toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de cette étude et qui ont si généreusement offert leur aide et leur support, professionnel ou moral, pour mener à bien ce travail. Enfin, je remercie infiniment tous mes proches, en particulier mes parents, ma sœur, mon

REMERCIEMENTS

frère et tous mes **amis**, notamment Mr **N. HADJARA** et M^{lle} **S. OUSALEM**, qui m'ont encouragé et soutenu sans relâche en toutes circonstances.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
ملخص.....	2
ABSTRACT.....	3
REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....	15
GLOSSAIRE.....	17
INTRODUCTION GENERALE.....	19
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE.....	22
1.1. Potentiel thérapeutique des plantes médicinales.....	23
1.2. Généralités sur le <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.	24
1.2.1. Rappel botanique.....	24
1.2.1.1. Rappel sur la famille des Oléaceae.....	24
1.2.1.2. Synonymie, dénominations vernaculaires et position systématique.....	24
1.2.1.3. Description botanique.....	26
1.2.2. Données éco-géologiques.....	30
1.2.2.1. Répartition géographique de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl..	30
1.2.2.2. Autécologie.....	31
1.2.3. Utilisations ethnobotaniques	31
1.2.4. Posologie traditionnelle.....	32
1.2.5. Profil chimique et bioactivité.....	32
1.2.6. Pharmacovigilance et toxicité.....	35

TABLE DES MATIERES

1.3. Généralités sur le parasite de leishmania et la leishmaniose.....	36
1.3.1. Description générale et position systématique de <i>Leishmania</i> ..	36
1.3.2. Cycle évolutif et transmission du parasite.....	39
1.3.2.1. Dimorphisme de <i>Leishmania</i>	39
1.3.2.2. Transmission de <i>Leishmania</i>	39
1.3.3. Manifestations cliniques de la leishmaniose chez l'homme et sa répartition géographique.....	43
1.3.3.1. Leishmaniose asymptomatique.....	43
1.3.3.2. Leishmaniose Cutanée (LC).....	43
1.3.3.3. Leishmaniose Muco - Cutanée (LMC).....	44
1.3.3.4. Leishmaniose Viscérale (LV).....	45
1.3.3.5. Leishmaniose et immunodépression.....	46
1.3.4. Leishmaniose en Algérie.....	49
1.3.5. Traitement de la leishmaniose.....	50
1.4. Généralités sur les radicaux libres et les antioxydants.....	53
1.4.1. Radicaux libres et stress oxydatif radicalaire.....	53
1.4.2. Antioxydants et leur activité thérapeutique.....	55
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	58
2.1. Collecte, identification et séchage du matériel végétal.....	59
2.2. Extraction de substances bioactives.....	62
2.2.1. Détermination de la teneur en eau par la méthode gravimétrique.....	62
2.2.2. Extraction de l'huile essentielle entraînable à la vapeur.....	62

TABLE DES MATIERES

2.2.2.1. Extraction par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un extracteur de type clevenger.....	62
2.2.2.2. Détermination du rendement en l'huile essentielle.....	64
2.2.3. Extraction solide - liquide de principes bioactifs.....	64
2.2.3.1. Extraction continue par la méthode de décoction assistée par agitation magnétique.....	64
2.2.3.2. Extraction continue par la méthode de soxhlet assistée par agitation magnétique.....	64
2.2.3.3. Calcul des rendements en extrait brut.....	66
2.3. Criblage phytochimique des extraits bruts de	67
2.4. Détermination de la teneur en composés polyphénoliques.....	69
2.5. Criblage des activités biologiques de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	70
2.5.1. Criblage <i>in vitro</i> de l'activité antiparasitaire des produits extractibles.....	70
2.5.1.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la croissance leishmanienne.....	70
2.5.1.1.1. Culture <i>in vitro</i> de leishmanies au stade promastigote.....	70
2.5.1.1.2. Cinétique de croissance leishmanienne.....	71
2.5.1.1.3. Test d'évaluation de l'activité inhibitrice.....	71
2.5.1.2. Evaluation de l'activité cytotoxique sur les cellules THP-1.....	73
2.5.1.3. Analyses chromatographiques par GC/MS.....	73
2.5.1.3.1. Analyse de l'huile essentielle de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	73
2.5.1.3.2. Dérivation par estérification de l'extrait bioactif.....	75

TABLE DES MATIERES

2.5.1.3.3. Caractérisation des composés majoritaires de l'extrait bioactif estérifié.....	75
2.5.2. Criblage <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante par le test de réduction du DPPH.....	76
2.5.2.1. Test d'évaluation de l'activité antioxydante.....	76
2.5.2.2. Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques.....	77
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	79
3.1. Détermination de la teneur en eau et du rendement d'extraction.....	80
3.2. Criblage phytochimique préliminaire des extraits bruts.....	81
3.3. Détermination de la teneur en composés polyphénoliques totaux.....	82
3.4. Discussion.....	83
3.5. Résultat du criblage biologique de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	86
3.5.1. Criblage <i>in vitro</i> de l'activité antiparasitaire des produits extractibles.....	86
3.5.1.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la croissance des leishmanies.....	86
3.5.1.1.1. Résultats de la cinétique de croissance leishmanienne.....	86
3.5.1.1.2. Résultats du test d'évaluation de l'activité inhibitrice.....	89
3.5.1.2. Evaluation de l'activité cytotoxique sur les cellules THP-1.	95
3.5.1.3. Résultats des analyses chromatographiques par GC/MS..	97
3.5.1.3.1. Analyse chromatographique de l'huile essentielle.	97

TABLE DES MATIERES

3.5.1.3.2. Analyse chromatographique de l'extrait éthéropétrolique	98
3.5.1.4. Discussion.....	100
3.5.2. Criblage <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante par le test de réduction du DPPH.....	104
3.5.2.1. Résultats du test d'évaluation de l'activité antioxydante....	104
3.5.2.2. Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques.....	107
3.5.2.3. Discussion.....	107
DISCUSSION GENERALE.....	109
CONCLUSION ET PERCPECTIVES.....	114
LISTE DES APPENDICES.....	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	135

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1	Photographie d'arbre de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	27
Figure 1. 2	Photographie des bourgeons de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	28
Figure 1. 3	Photographie des feuilles de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	29
Figure 1. 4	Inflorescence portant des fleurs hermaphrodites et les pièces florales de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	30
Figure 1. 5	Photographie des samares de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	30
Figure 1. 6	Aire de répartition géographique de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	31
Figure 1. 7	Structures chimiques de quelques coumarines hétérosidiques de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	34
Figure 1. 8	Structures chimiques de quelques sécoiridoïdes hétérosidiques de l'espèce <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	35
Figure 1. 9	Cycle de vie du parasite <i>Leishmania</i>	43
Figure 1. 10	Diverses manifestations cliniques de la leishmaniose chez l'homme.....	48
Figure 1. 11	Aire de répartition géographique globale de différentes formes de la leishmaniose.....	49
Figure 2. 12	Situation géographique de la région de collecte.....	60
Figure 2. 13	Représentation photographiques des échantillons de la matériel végétal destiné à l'expérimentation.....	62
Figure 2. 14	Schéma de l'hydrodistillation par clewenger.....	64
Figure 2. 15	Schéma de l'extracteur type soxhlet.....	66
Figure 2. 16	Réaction d'estérification.....	76
Figure 2. 17	Valeurs seuils déterminant le type de corrélation.....	79
Figure 3. 18	Représentation graphique des rendements d'extraction....	81
Figure 3. 19	Représentation graphique de la courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique.....	83
Figure 3. 20	Représentation graphique des teneurs en composés polyphénoliques obtenues pour les extraits bruts de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	83

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 3. 21	Représentations graphiques de l'évolution de la cinétique de croissance des cinq souches leishmaniennes.....	88
Figure 3. 22	Représentation graphique montrant l'effet inhibiteur des produits extractifs de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl. sur les souches leishmaniennes testées.....	91
Figure 3. 23	Représentations graphiques du pourcentage d'inhibition parasitaire des souches étudiées en fonction de la concentration de l'extrait éthéropétrolique testées.....	94
Figure 3. 24	Représentations graphiques du pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et de l'Amphotéricine B sur les souches étudiées en fonction la concentration testée.....	95
Figure 3. 25	Représentations graphiques de l'effet cytotoxique de l'extrait éthéropétrolique et l'huile essentielle de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl. testés sur la lignée cellulaire THP-1.....	96
Figure 3. 26	Représentation graphique de la droite de calibration du DPPH.....	105
Figure 3. 27	Représentations graphiques de l'effet antiradicalaire des extraits testés.....	106
Figure 3. 28	Représentation graphique de l'analyse du lien entre les deux variables étudiées par SPSS.....	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1.	Classification simplifiée du genre <i>Leishmania</i>	39
Tableau 1. 2.	Principaux médicaments utilisés contre la leishmaniose..	53
Tableau 2.	Données météorologiques relatives à la période de 1996	
3.	à 2008 de Tizi Ouzou.....	61
Tableau 3.	Rendement en produits extractifs et leurs	
4.	caractéristiques.....	81
Tableau 3. 5.	Résultats du criblage phytochimique préliminaire des	
	extraits bruts.....	82
Tableau 3.	Paramètres caractéristiques estimés de la cinétique de	
6.	croissance des cinq souches leishmanienne.....	87
Tableau 3.	Temps de récolte des promastigotes en phase	
7.	exponentielle.....	90
Tableau 3. 8.	Résultats préliminaires du criblage antileishmanien <i>in</i>	
	<i>vitro</i> des produits extractifs de l'espèce <i>Fraxinus</i>	
	<i>angustifolia</i> Vahl.....	90
Tableau 3. 9.	Valeurs des concentrations inhibitrices CI ₅₀ des produits	
	bioactifs testés sur les souches leishmaniennes	
	étudiées.....	92
Tableau 3.10.	Valeurs des concentrations Cytotoxiques CC ₅₀ des	
	produits bioactifs testés sur la lignée cellulaire THP 1.....	96
Tableau 3.11.	Récapitulatif des résultats du criblage antileishmanien...	97
Tableau 3.12.	Composés identifiés par GC /MS dans l'huile essentielle	
	de <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.....	99
Tableau 3.13.	Principaux composés identifiés de l'extrait	
	éthéropétrolique estérifié.....	100
Tableau 3.14.	Valeurs des CI ₅₀ de l'activité antioxydante estimées par	
	le test au DPPH.....	107
Tableau 3.15.	Résultats statistiques de l'analyse de la corrélation	
	linéaire.....	108

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

Abs	Absorbance optique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AmB	Amphotéricine B
ANOVA	Analyse de variance
APG	Angiosperm Phylogeny Group
Aq	Extrait aqueux
C_{max}	Concentration parasitaire maximale
CC₅₀	Concentrations Cytotoxiques à 50% d'inhibition cellulaire
CI₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
dC / dt	Dérivé de la concentration en fonction du temps
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
EAG	équivalent acide gallique
SEM	Erreur Standard de la Moyenne
ERN	Espèces Réactives de l'azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
Ethp	Extrait éthéropétrolique
GC/MS	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HE	Huile Essentielle
IS	Indice de Sélectivité
IK	Indice de Kovats
LC	Leishmaniose Cutanée
LMC	Leishmaniose Muco-cutanée
LCS	Leishmaniose Cutanée Sporadique
LCZ	Leishmaniose Cutanée Zoonotique
LV	Leishmaniose Viscérale
MeOH	Méthanol
mL	Millilitre
min	Minute
Nist	Institut national des normes et de la technologie
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONM	Office National de la Météorologie
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
r	Coefficient de corrélation
R²	Coefficient de détermination
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard Erreur de la Moyenne
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SOD	superoxydes dismutases
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T₀	Témoin négatif
THP-1	Lignée cellulaire de monocytes humains
Tr	Temps de rétention
μ_{max}	Taux de croissance parasitaire
μg	Microgramme

GLOSSAIRE

- **Acétylcholinestérase** : enzyme de type hydrolase qui convertit l'acétylcholine, un neurotransmetteur en choline et anion acétate ;
- **Acuminé** : qui se termine en pointe fine ;
- **Emphysème** : présence de gaz dans le tissu cellulaire, histologiquement est défini comme une dilatation permanente des espaces aériens distaux par rapport à la bronchiole terminale, avec destruction des parois alvéolaires ;
- **Glomérulonéphrite** : affection (souvent d'origine inflammatoire) du glomérule, qui consiste en un peloton de capillaires dans le cortex rénal chez les mammifères ;
- **Hémochromatose** : affection héréditaire autosomique, définie comme une surcharge chronique en fer d'origine génétique ;
- **Lupus érythémateux disséminé** : pathologie chronique inflammatoire, auto-immune et complexe qui évolue par poussées successives dont l'évolution est imprévisible ;
- **Maladie anthroponotique** : homme (hôte réservoir) est la seule source d'infection pour le vecteur ;
- **Maladie endémique** : maladie qui se déclare au sein d'une population avec une régularité que l'on peut prédire et qui ne s'écarte que très peu de la fréquence attendue. Dans les maladies endémiques, les cas d'atteinte sont concentrés dans l'espace mais non dans le temps. A noter qu'une maladie peut être endémique au sein d'une population à n'importe quel niveau de fréquence, pourvu que l'on puisse en prédire la régularité ;
- **Maladie épidémique** : maladie dont le niveau de fréquence au sein d'une population dépasse la fréquence attendue (normale) et les cas d'atteinte sont concentrés dans le temps et dans l'espèce ;
- **Maladie endémoépidémique** : épidémie survenant dans une zone d'endémicité pour une maladie donnée ;

GLOSSAIRE

- **Maladie sporadique** : une maladie susceptible de se déclarer au sein d'une population, quoique rarement et irrégulièrement ;
- **Maladie zoonotique** : maladie qui se transmet naturellement des animaux [vertébrés] à l'Homme et vice-versa ;
- **Mésohygrophile** : qualifie une espèce nécessitant ou tolérant des quantités d'eau importantes dans le sol tout au long de son développement ;
- **latrogène** : trouble (un effet indésirable) provoqués par le médecin, par un traitement ou un acte médical ;
- **Ischémique** : diminution de l'apport en sang dans un organe ;
- **Pandémie** : grande épidémie affectant plusieurs pays ou même un ou plusieurs continents ;
- **Pancytopenie** : pathologie sanguine définie par une diminution des trois lignées cellulaires hématopoïétiques (érythrocytes, leucocytes et plaquettes) ;
- **Polyadénopathie** : plusieurs adénopathies (ganglions augmentés de volume) localisés en différents territoires ganglionnaires ;
- **Pyélonéphrite** : infection bactérienne des voies urinaires atteignant le parenchyme rénal ;
- **Rupture homolytique** : un électron part avec chaque atome ;
- **Rupture hétérolytique** : deux électrons partent avec le même atome ;
- **Tétralogénicité** : production de malformations ;
- **Toxémie** : synonyme d'intoxication du sang.

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les temps les plus reculés l'homme a cherché chez les végétaux sa nourriture et ses remèdes et appris à ses dépens à discerner les plantes toxiques ; ces connaissances, transmises d'abord oralement, l'ont été ensuite dans les écrits et il existe des traces de l'emploi des plantes comme remèdes dans les plus anciennes civilisations (1).

À l'origine, ces ressources végétales étaient employées sous leur forme brute, puis au fil du temps, la préparation d'extraits et de concentrés ont permis d'en intensifier l'effet médicinal. À partir du XIX^{ième} siècle, les molécules responsables des effets thérapeutiques ont été isolées et ont servi de prototypes à l'élaboration de différents médicaments (2, 3).

En effet, l'ethnobotanique a servi de support aux nombreuses publications actuellement parues dans ce but vu qu'elle apporte des renseignements très précieux sur les propriétés physiologiques de la plupart des drogues végétales. Néanmoins, elle laisse échapper de nombreuses plantes apparemment inactives mais dont les constituants possèdent une potentialité thérapeutique dans diverses pathologies (4).

Le monde végétale offre donc à la thérapeutique des matières premières abondantes et variées, dont les ressources sont loin d'être exploitées, plus de 20 000 plantes ont été répertoriées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme plantes médicinales, mais seulement 5 000 ont déjà fait l'objet de tests médicaux. De ce fait, un grand nombre de plantes n'ont jamais été étudiées, ou ne l'ont pas été par les méthodes modernes. Il y a là un champ immense d'investigations possibles, étendant et renouvelant sans cesse le domaine de la phytothérapie dont les méthodes biotechnologiques et biochimiques sont appelées à jouer un rôle essentiel pour garantir en parallèle une production de drogue bien identifiée, de qualité convenable et en quantité suffisante (1, 5).

A cet égard, le présent travail de recherche s'inscrit dans une contribution scientifique à une meilleure connaissance et valorisation de la plante médicinale

Fraxinus angustifolia Vahl. En médecine traditionnelle, cette espèce pourtant réputée depuis fort longtemps pour ses multiples vertus thérapeutiques à savoir antirhumatismal, antimicrobien et vermifuge, a été tombée en désuétude, selon les données de la littérature, relativement une majorité de ses rôles potentiels n'a pas été démontrée expérimentalement, cela a amené à la nécessité d'élaborer de nouvelles données expérimentales qui pourrait développer et prouver davantage son spectre thérapeutique.

L'objectif de cette étude étant d'étudier la phytochimie de ses produits extractibles et d'évaluer *in vitro* leurs propriétés biologiques : antiparasitaire testée, pour la première fois, sur les souches leishmaniennes et antioxydante estimée par le test de réduction du DPPH.

Le premier chapitre du présent manuscrit sera consacré à l'étude bibliographique descriptive de la plante médicinale *Fraxinus angustifolia* Vahl., ainsi qu'un aperçu général relatif aux activités biologiques évaluées. **Le deuxième chapitre** s'intéressera à l'ensemble des matériels et méthodes employés lors de la réalisation de cette étude. Ensuite, **Le troisième chapitre** présentera et discutera les résultats des investigations phytochimiques et du criblage parasitaire et antioxydant. Puis, pour une analyse plus complète des résultats majeurs obtenus, une discussion récapitulative plus générale sera menée. Enfin, ce manuscrit s'achèvera sur une conclusion synthétisant le bilan phytochimique et biologique de ce travail, proposant aussi des perspectives de recherche dans le contexte de l'étude abordée.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTERATURE

1.1. Aperçu sur les plantes médicinales

Le monde végétal, avec son immense biodiversité, est à l'origine de la majorité des traitements pour lutter contre la plupart des pathologies. Ces traitements ont été élaborés au cours du temps, tout d'abord par expérimentation directe puis, plus récemment, en utilisant les techniques modernes d'analyse et de purification (5).

Toutes les espèces végétales et toutes **les parties d'un végétale** peuvent être **sources de molécules utilisables en phytothérapie**. Ces végétaux synthétisent de nombreux composés dénommés **métabolites primaires** qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent les molécules qui servent à la subsistance et à la reproduction. De plus, ils synthétisent une foule importante d'autres composés bioactifs appelés **métabolites secondaires** dont la fonction est loin de faire l'unanimité. Ces molécules jouent probablement le rôle de défense chimique contre des prédateurs ou des agents infectieux. Certains de ces métabolites secondaires, au moins à l'état pur et à certaines doses, ont des propriétés médicinales ou peuvent être toxiques. Il ne s'ensuit pas nécessairement que les mêmes composés sont aussi toxiques ou bénéfiques lorsqu'ils se trouvent dans la plante que lorsqu'ils en sont extraits, car il peut y avoir des effets synergiques des composés chimiques dans la plante (6.7). En effet, une plante est dite **médicinale** lorsque « **au moins une partie** possède des **propriétés médicamenteuses** » (8).

1.2. Généralités sur la plante médicinale *Fraxinus angustifolia* Vahl.

1.2.1. Rappel botanique

1.2.1.1. Rappel sur la famille des Oléaceae

Le genre *Fraxinus* (Tourn.) L se range dans l'ordre botanique des Lamiales (Bromhead 1838), famille des Oléacées (Hoffmannseg et Link, 1809) (1), elle comprend 600 espèces réparties en 25 genres (WALLANDER 200), Cette famille aux plantes ligneuses (arbres, arbustes, parfois sarmenteux) se caractérise surtout par ses fleurs régulières à deux étamines. Les feuilles, sans stipules sont généralement opposées, simple ou composées-pennées ou encore trifoliées, entière à dentées (9),

En 1753, Linné décrit le genre *Fraxinus* pour la première fois dans son ouvrage *Species plantarum* (10). Depuis, près de 800 taxons (espèces, sous espèces et variétés) ont été reconnues, dont la majorité est aujourd'hui tombée en synonymie. Le genre *Fraxinus* inclue 48 espèces répandues, principalement, dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord, dont l'espèce ***Fraxinus angustifolia* Vahl.** (11).

1.2.1.2. Synonymie, dénominations vernaculaires et position systématique

Le **nom latin** *Fraxinus angustifolia* Vahl. possède différents synonymes, comme : *Fraxinus oxyphylla* Mar. Bieb, *Fraxinus tamariscifolia* Vahl. (12) et *Fraxinus rotundifolia* Mill. (13). Ainsi, plusieurs dénominations ont été attribuées à cette espèce :

Noms berbères : *Taslent, tasslène, asseln, aslen, islène, islen* et *tabouchicht* (6, 7).

Noms arabes : *Sella, sellane, rasleut, dandar, dardâr, derdâr* et *mesharouane*, son fruit s'est longtemps appelé : *Isâne et-tir, Isan usfur, lisan al-asafir, hebb dedâr* et *tmer derdâr* (14,15).

Noms français : *Frêne à feuilles étroites, frêne oxyphyllé, frêne du Sud* et *frêne de Kabylie* (15,16).

Noms anglais : *Narrow-leaved ash* et *Southern ash* (16).

Les classifications de KNOBLAUCH, TAYLOR et JOHNSON placent les espèces du genre *Fraxinus* dans la tribu de Fraxineae de la sous-famille des Oléoideae, famille des Oléacées. Cependant, KNOBLAUCH en 1897 décrit 39 espèces de *Fraxinus* qui fut traditionnellement subdivisé en deux sous-genres sur la base de critères morphologiques : *Ornus*, comprenant les taxons dont les fleurs naissent sur une panicule terminale en même temps que les feuilles, et *Fraxinaster*, comprenant tous les taxons avec des inflorescences latérales. Plus tard en 1920, 63 espèces ont été reconnues par la classification de LINGELSHEIM, regroupées ainsi dans les mêmes deux sections (17). Actuellement, la famille des oléacées est divisée en 5 tribus (Myxopyreae, Fontanesieae, Forsythieae, Jasmineae, Oleae), dont le genre *Fraxinus* appartient à la sous-tribu Fraxininae de la tribu Oleae (18). De plus, selon la dernière révision de la classification phylogénétique du genre *Fraxinus*, 45 espèces ont été retenues et réparties en six sections : *Fraxinus*, *Sciadhanthus*, *Pauciflorae*, *Melioides*, *Ornus* et *Dipetalae*, tandis que trois espèces ont été classées comme *incertae sedis* (11,19). En effet, ***Fraxinus angustifolia* Vahl.** fait partie de la section ***Fraxinus***, qui comprend également trois autres espèces : *F. mandshurica*, *F. nigra* et *F. excelsior* (une espèce extrêmement proche de *F. angustifolia* Vahl.) (11).

La classification phylogénétique de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl.

(APG IV - Angiosperm Phylogeny Group, 2016) (20,11)

Domaine	: Eucaryota
Règne	: Plantae
Clade	: Angiospermae
Clade	: Eudicotylédones
Clade	: Superastériidae
Clade	: Astériidae
Superordre	: Lamiidae
Ordre	: Lamiales
Famille	: Oléaceae
Tribu	: Oleae
Sous tribu	: Fraxininae
Genre	: <i>Fraxinus</i>
Espèce	: <i>F. angustifolia</i> Vahl.

Classification classique de *Fraxinus angustifolia* Vahl. selon Cronquist 1981.

(21, 22, 23, 24)

Domaine	: Eucaryota
Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Asteridea
Ordre	: Scrophulariales
Famille	: Oléaceae
Genre	: <i>Fraxinus</i>
Espèce	: <i>F. angustifolia</i> Vahl.

1.2.1.3. Description botanique

L'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl., décrite initialement par Martin Vahl dans son ouvrage *Enumeratio Plantarum* en 1804 (12), est un arbre ou arbuste méso à macrophanérophyte qui peut atteindre **15 mètres** de hauteur, à racine pivotante très profonde, au port droit et large, au houppier assez compact, avec des branches d'une couleur jaunâtre jusque brun-gris et ramules vert-olive poilus à l'extrémité (15, 25,16).



Figure 1.1 : photographie d'arbre de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. (Originale).

Son **écorce** est crevassée transversalement de crêtes saillantes. Sa face externe est verruqueuse de couleur grise cendrée alors que sa face interne est de couleur brune (15, 25).

Quant aux **bourgeons**, ils sont le plus souvent d'un **brun jaunâtre**, gros, un peu aplatis latéralement et plus au moins arrondis ou circulaire. Le bourgeon, au bout d'un long ramule, est régulièrement un bourgeon à feuille, tandis qu'au dessous de lui sont disposés, opposés l'un à l'autre, ou presque opposés, les bourgeons à fleurs, ces bourgeons diffèrent nettement des bourgeons à feuilles, ils sont **arrondis**, presque globuleux, couverts d'écailles grises tirant sur le brun, veloutées et se couvrent plus tard, au bord, de cils. Les bourgeons à fleurs sont ordinairement disposés d'une manière dense sur les jeunes ramules, quelquefois par trois dans un verticille, ce qui a aussi permis de les distinguer des bourgeons à feuilles, qui sont toujours opposés deux à deux (26).



Figure 1.3 : photographie des bourgeons de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. (Originale).

Les **feuilles** de *F. angustifolia* Vahl. sont de couleur jaune verdâtre, composées, opposées, caduques, et un peu coriaces. Celles qui sont adultes mesurent de 12 à 25 cm de long, elles sont pennées de **5 à 13 folioles. étroites** et de forme **ovale**, de 4 à 9 cm de long sur 1,5 à 2,5 cm de large, presque sessiles, d'une couleur jaune verdâtre, prolongées de coin à la base où elles sont un peu inégales, longuement acuminées, elles sont glabres, luisantes sur la face supérieure et légèrement pubescentes sous la nervure dorsale, bordées de dents espacées qui sont peu profondes, très aiguës, très étalées et même réfléchies vers le sommet **dont chacune correspond à une nervure** qui aboutit à son extrémité.

Ces nervures secondaires partent obliquement de la nervure principale et possèdent des anastomoses marginales en arc (15,27).



Figure 1.4 : photographie des feuilles de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. (Originale).

La période de floraison de l'espèce *F. angustifolia* Vahl. s'étend de la mi-décembre jusqu'à la fin de janvier (28). Son **inflorescence** est formée de 15 à 20 (29) fleurs disposées en grappes, non ramifiée, allongées et longues de 3 à 7 cm. Ses fleurs sont généralement petites, de couleur brune rougeâtre, sans calice, avec une corolle dite nulle (pas de pétales). De plus, elles sont hermaphrodites, dioïques (males) ou polygames. Le *Fraxinus angustifolia* Vahl. est une espèce à pollinisation par le vent (anémophile), dont les sacs polliniques ont une forme oblongue et sont divisés au milieu par un profond sillon. Ils sont d'ordinaire posés comme un bonnet sur un rachis quelquefois pubescent de couleur blanche ou blanc jaunâtre. L'ovaire est à 2 loges biovulées. Néanmoins, un seul ovule de chaque locule se développe en une samare contenant une seule graine **dépassant le milieu du fruit**. (18, 15,26).

Le **fruit** est une **samare** de couleur brune claire, lancéolées et linéaire, atténuées aux deux extrémités, arrondies ou aiguës et souvent **mucronées** au sommet, Chaque graine est munie d'une aile membraneuse latérale, qui est le péricarpe allongé du fruit (15,27).

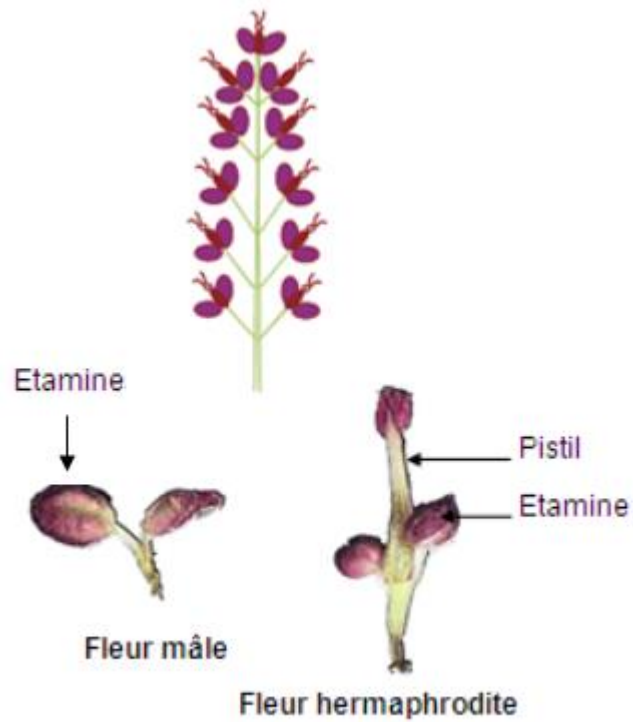


Figure 1.5 : Inflorescence portant des fleurs hermaphrodites et les pièces florales de *Fraxinus angustifolia* Vahl. (29).

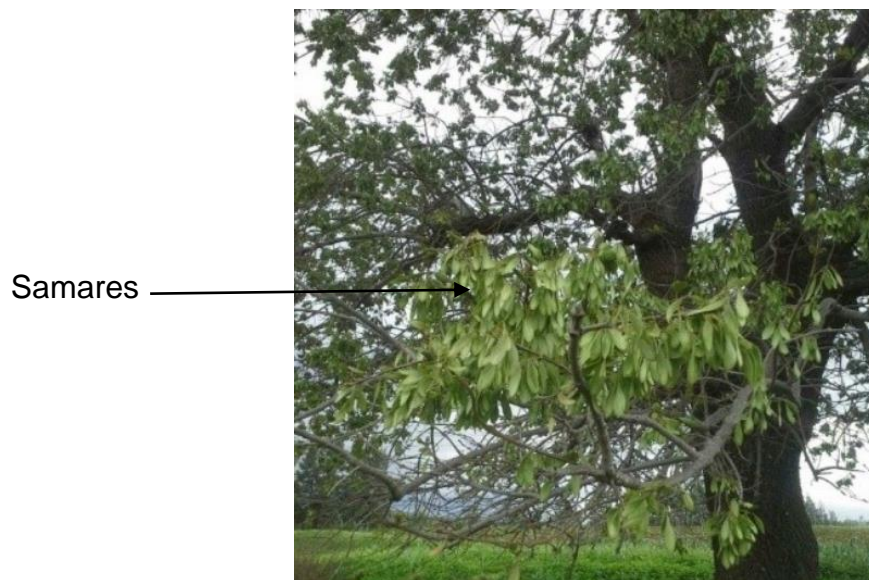


Figure 1.6 : photographie des samares de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. (Original).

1.2.2. Données éco-géologiques

1.2.2.1. Répartition géographique de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

Le *Fraxinus angustifolia* Vahl. est une espèce principalement thermo à mésoméditerranéenne (23), elle s'étend sur l'Europe méridionale et Orientale (du Portugal à l'Ouest jusqu'à la mer noire à l'Est), elle est rencontrée également en Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) et en Asie Occidentale (Iran, Caucase et sud de la Russie). Néanmoins, sa répartition géographique reste essentiellement méditerranéenne (**figure 1.7**) (30,31, 32).

En effet, cette espèce a prouvé une grande tolérance vis-à-vis de son environnement, le facteur changement climatique semble actuellement agir favorablement sur sa distribution géographique globale (33).

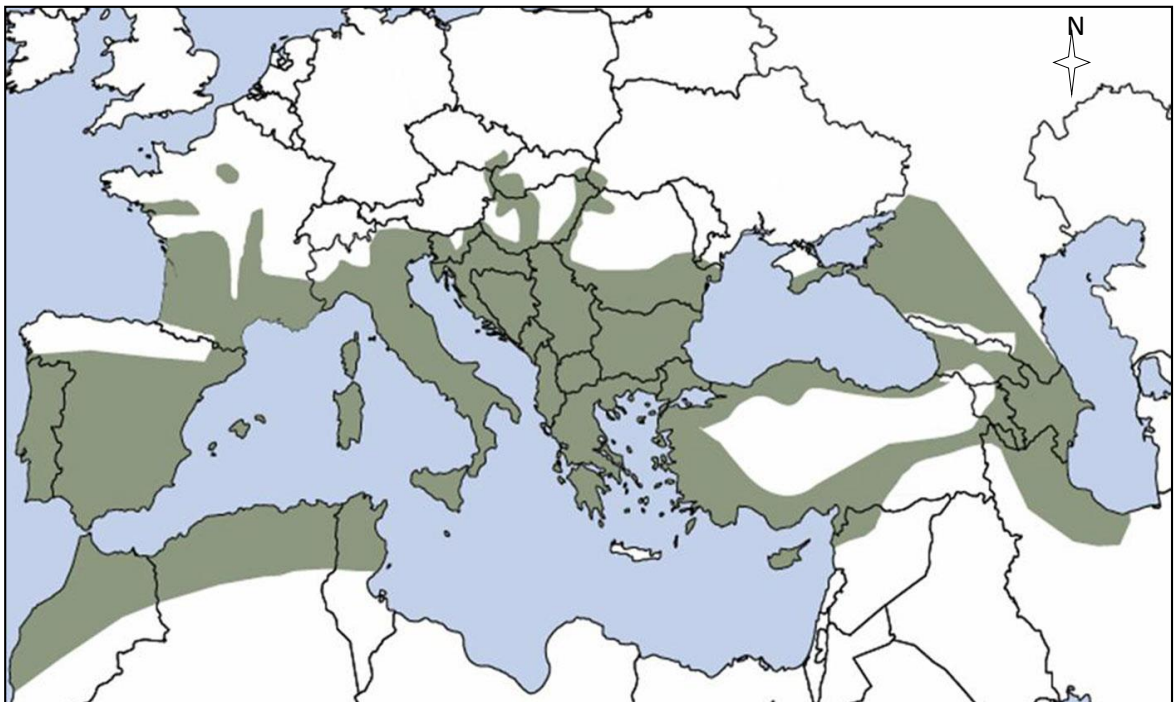


Figure 1.7 : Aire de répartition géographique de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. (29).

1.2.2.2. Autécologie

Le frêne oxyphylle est une essence à longévité moyenne de 150 à 200 ans, sa fourchette d'altitude est située entre 0 à 1000 m, mais il peut également monter jusque 2000 m (29,34). Elle est considérée comme une espèce héliophile, exigeant une lumière directe entre 60 et 100%, thermophile et mésophile à mésohygrophile avec une précipitation moyenne comprise entre 400 et 800 mm. Cette espèce préfère un sol à des profondeurs comprises entre 40 à 100 cm, avec un volume de 0,45 à 0,9 m³ / m², elle pousse presque sur divers types de sols avec un pH basique à neutre ou légèrement acide (pH de 5,0 à 8,0): tels que les sols limoneux, limono-sableux et limono-argilo-sableux avec une préférence pour les sols argilo-sableux (29, 16).

1.2.3. Utilisations ethnobotaniques

La plante *Fraxinus angustifolia* Vahl. est utilisée depuis les temps les plus anciens, ses différentes drogues ont des usages médicaux traditionnels dans toute son aire de répartition, c'est surtout la partie aérienne qui est couramment utilisée, les racines sont employées dans une moindre mesure. Cette plante est particulièrement réputée pour son emploi, depuis Hippocrate et Théophraste, jusqu'à nos jours, contre le rhumatisme musculaire chronique, rhumatisme goutteux et la goutte (35).

En **Algérie**, les préparations des feuilles et d'écorce se prennent, en usage interne, couramment pour leurs vertus laxatives, fébrifuges, antirhumatismales, vermifuges et antidiarrhéiques, l'écorce est également utilisée contre les calculs biliaires (16,15).

Au **Maroc**, le *Fraxinus angustifolia* Vahl. est employé afin de consolider les fractures, et ainsi, administré sous forme d'infusé contre la toux. Il sert également à traiter le diabète, la pyélonéphrite, la cystite et aussi comme employé sudorifique. Le fruit (samares) s'ingère, infusé ou en poudre mélangée avec du miel, pour ses vertus réchauffantes, toniques et aphrodisiaques. Les samares sont aussi employées, sous forme de poudre triturée dans un peu de vinaigre, dans le traitement des maladies hépatiques (15,36, 37).

Outre ces emplois, en **Grèce**, l'infusion de feuilles se boit pour soulager les menstruations douloureuses. Les samares pilées se consomment mélangée à des galettes pour leur effet narcotique. Au Portugal, on emploie aussi cette plante pour faire baisser la pression artérielle et l'acide urique, et pour atténuer la douleur de la cystite et de la prostate, Ainsi, l'infusion de feuilles ou de fleurs se prend pour diminuer le taux de cholestérol (38, 39, 40).

De plus, Le *Fraxinus angustifolia* Vahl. est souvent employé comme adjuvant des régimes amaigrissants. Il est crédité aussi de vertus carminatives et contre la dyspepsie (41). Enfin, le suc des feuilles du frêne, pris dans du vin, a été appliqué sur les plaies contre les morsures de vipères. Probablement, s'agit-il là d'une action modificatrice des principes constitutifs du venin. Au moyen âge, les racines et les feuilles ont été recommandées pour soulager le mal de dents (8, 35).

Additivement aux utilisations ethnobotaniques, Il convient de noter que le frêne présente, depuis longtemps, un excellent fourrage brouté par différentes espèces comme : bovins, ovins, caprins, et équidés (42).

1.2.4. Posologie traditionnelle (voir appendice A) (35).

1.2.5. Profil chimique et bioactivité

Les données phytochimiques apportées à ce jour sur l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. révèlent la présence d'un profil complexe de diverses classes de substances chimiques bioactives. En fait, les principaux constituants qui ont été isolés de cette espèce appartiennent principalement à la famille chimique des coumarines et des sécoiridoïdes. Néanmoins, d'autres composés d'intérêt pharmacologique ont été aussi identifiés tels que : les lignanes, les flavonoïdes et les phénols simples.

En effet, les **coumarines** ont caractérisées les espèces du genre *Fraxinus* depuis les travaux expérimentaux de LINGELSHEIM en 1916 (43). Ces composés sont rencontrés chez l'espèce *F. angustifolia* Vahl. à l'état libre ou sous forme hétérosidique, on retrouve essentiellement : Esculin, esculétine ou esculétole, fraxétine, fraxinol, scopolétine, isoscopolétine, et la cichoriine (**figure 1.8**) (17).

Ainsi, les feuilles de *Fraxinus angustifolia* Vahl. renferment de nombreux **sécoiridoïdes** dont les hétérosidiques sont majoritaires tels que : oleuropéine, nuezhenide, ligstroside, angustifolioside A, B, et C et les dérivés méthylés de diester méthylique (7, 11) d'oléoside (**figure 1.9**) et d'autres sécoiridoïdes non hétérosidiques comme le ligstral (44,45, 17).

De plus, de récentes études de différents organes de *F. angustifolia* Vahl. (feuille, écorce et samare), ont montré la présence de plusieurs autres composés phénoliques et terpénique : les **triterpènes** comme l'acide ursolique (46), les **acides phénoliques** comme l'acide chlorogénique et l'acide tannique, les **polyols** principalement le mannitol et l'inositol, les phénylethanoides comme le verbascoside (47), les **flavonoïdes** comme la quercétine et la lutéoline. Cependant, le rutoside, l'isorhamnetin-3-O-glucoside-7-Orhamnoside, la nicotiflorine (kaempférol-3 rhamnoglucoside) et aussi l'acide cinnamique ont été identifiés seulement dans les feuilles. Alors que la catéchine (flavonoïde), le tyrosol (phénylethanoides), l'acide caféique (acide phénolique) et le pinorésinol (lignane) ont été identifiés dans l'écorce (49, 50, 51). En ce qui concerne les samares, les recherches récentes ont mis en évidence la présence de trois autres composés de la classe sécoiridoïdes hétérosidiques : excelside B, GL3 et 1-O-β-D-Glucosylformoside, et aussi de la salidroside qui est un composé phénylethanoidique (51).

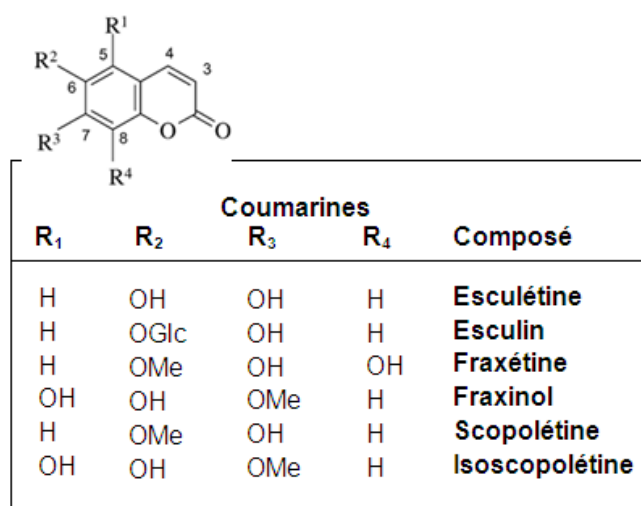


Figure 1.8 : Structures chimiques de quelques coumarines hétérosidiques de *Fraxinus angustifolia* Vahl. (17).

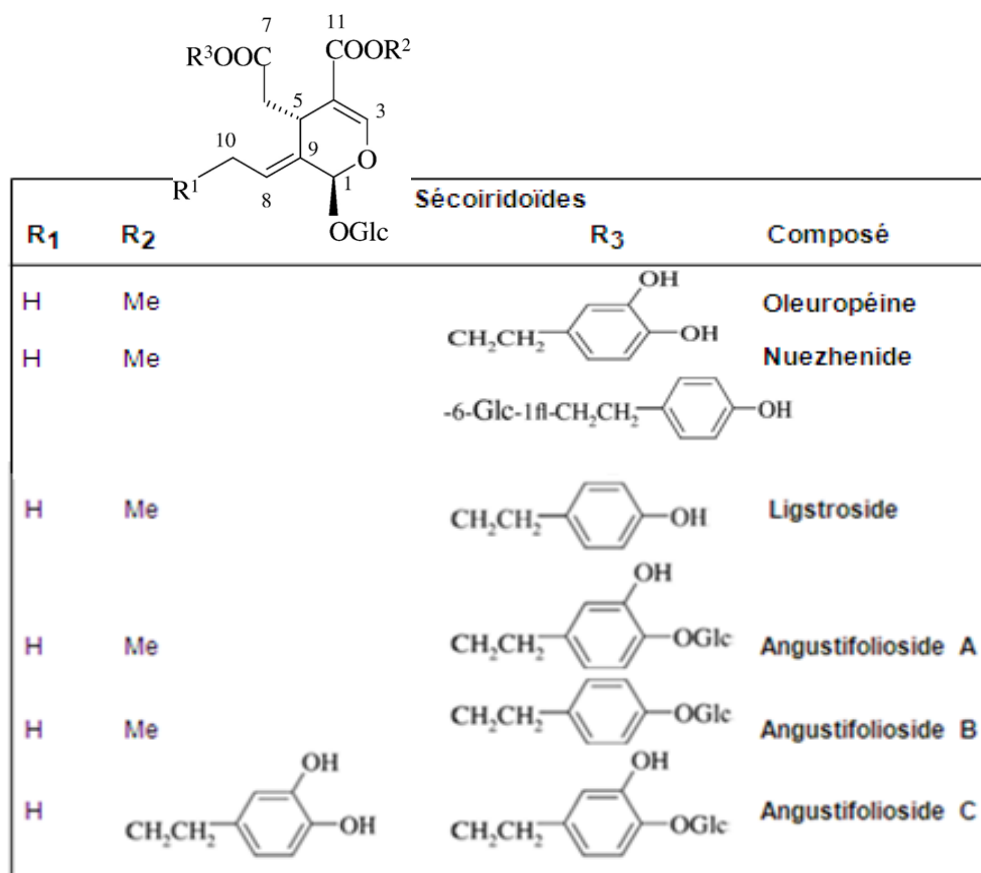


Figure 1.9 : Structures chimiques de quelques sécoiridoïdes hétérosidiques de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. (17).

Quelques usages de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl., en médecines traditionnelles, ont été confirmés par des études expérimentales *in vivo* et *in vitro*. Les extraits ethanologiques de l'écorce et de feuille ont montré une activité analgésique (49), anti-inflammatoire (50,96 % à une dose de 200 mg/kg) et hypoglycémique (feuilles et écorce à 50 mg/kg ont manifesté respectivement une réduction de 68% et 57%) (52). L'extrait ethanologique de feuilles a révélé également une activité hépatoprotectrice significative à une dose de 25 mg/kg (50). Cependant, l'extrait aqueux de feuilles a fait ressortir un effet inhibiteur de l'acétylcholinestérase ($IC_{50}=1066 \pm 19\mu\text{g/ml}$) (48). Ainsi, d'autres propriétés pharmacologiques ont été démontrées telles que : l'activité antioxydante, antimicrobienne et hypocholestérolémiante (53, 54).

En effet, divers principes actifs identifiés chez l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl., ont auparavant fait l'objet de plusieurs recherches, entre autres: le mannitol, qui a fait preuve d'une forte activité diurétique (55), les sécoiridoïdes hétérosidiques, extraits du genre *Fraxinus*, qui ont été étudiés pour leur action anti-complément, exemple : le ligstroside qui s'est avéré efficace comme antidote contre le venin du cobra ($IC_{50}=33 \mu\text{g/ml}$), la coumarine esculetine qui a montré un effet antiviral sur de nombreux virus : picornavirus, orthomyxovirus, paramyxovirus et herpesvirus (à une concentration de $36 \mu\text{M}$) et le verbascoside qui présente un large spectre d'activités pharmacologiques, comme : l'activité antivirale, antimicrobienne et immunosuppressive (56,17).

1.2.6. Pharmacovigilance et toxicité

Les données disponibles sont **limitées** en ce qui concerne les essais cliniques et la pharmacovigilance du *Fraxinus angustifolia* Vahl., peu d'études ont été menées sur la toxicité de la plante. Néanmoins, l'étude effectuée par MEDJAHED et *al.*, en 2016 sur les extraits éthanoliques de feuilles et d'écorce ont montré que l'administration de ces deux drogues végétales, à une dose de 200 mg/kg et à long terme, ne présente **aucun effet toxique** (50).

Avec l'ambition de découvrir de nouvelles potentialités curatives de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl., les investigations en matière de ses activités biologiques devront être complétées, en valorisant ainsi sa richesse en diverses molécules d'intérêt thérapeutique.

1.3. Généralités sur le parasite *Leishmania* et la leishmaniose

1.3.1. Description générale et position systématique de *Leishmania*

Leishmania est un parasite protozoaire unicellulaire appartenant à l'ordre des Kinétoplastidae et à la famille des Trypanosomatidae (57). Il fut découvert par Sir William LEISHMAN (1865-1926) en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-dum en Inde. Le 23 mai 1903 William Boog LEISHMAN publie ses observations sur le parasite *Leishmania*. Au même moment Charles DONOVAN (1863-1951), identifia le même parasite qui fut appelé à juste titre *Leishmania donovani* (58). Les Trypanosomatides sont des eucaryotes unicellulaires très mobiles de forme allongée, aux deux extrémités pointues, avec un noyau central, un kinétoplaste qui constitue un support génétique des adaptations métaboliques aux différents milieux où évoluent les parasites, il contient des maxicercles de l'acide désoxyribonucléique qui correspondent aux traditionnels ADN mitochondriaux et des minicercles qui servent à l'adressage des ARN messagers (58). Ils possèdent également une membrane ondulante et un flagelle libre, Leur cytoplasme est plus ou moins granuleux. Certains stades évolutifs, adaptés à la vie intracellulaire font l'exception : ils sont immobiles, sphériques et ne possèdent ni flagelle extérieur ni membrane ondulante.

La classification traditionnelle des Leishmanies est basée sur un nombre de caractères essentiellement extrinsèques : le pouvoir pathogène, l'organe parasité et la distribution géographique (60). Le genre *Leishmania* est placé dans la classification adoptée par LEVINE et COLL, 1980 comme suit : (61,62)

Règne	: Protista
Sous-règne	: Protozoa
Embranchement	: Sarcomastigophora
Sous- embranchement	: Mastigophora
Classe	: Zoomastigophorea
Ordre	: Kinetoplastida
Sous-ordre	: Trypanosomatina
Famille	: Trypanosomatidae
Genre	: <i>Leishmania</i> Ross 1903

A partir des années 80, plusieurs types de classifications qui reposent principalement sur l'étude de caractères intrinsèques génétiques, biochimiques et immunologiques du parasite *Leishmania* ont été successivement utilisés : la classification proposée par LAINSON et SHAW en 1987, la classification de RIOUX et *al.* en 1990 et la classification phylogénétique par RIOUX et LANOTTE en 1993. La concordance entre ces différents types de classification a été globalement positive, assurant leur validation réciproque.

Une nouvelle classification admise à l'heure actuelle est celle élaborée par ADL et *al.* en 2005, en tenant compte des phylogénies moléculaires récentes (63,64).

Super- groupe	: Excavata
1^{ier} rang	: Euglenozoa
2^{ème} rang	: Kinetoplastea
3^{ème} rang	: Metakinetoplastina
Genre	: <i>Leishmania</i> Ross 1903.

Depuis la création du genre *Leishmania*, le nombre d'espèces décrites a régulièrement augmenté. Il comprend actuellement une trentaine d'espèces d'importance médicale et vétérinaire dont la majorité est pathogène pour l'homme (65). Le genre *Leishmania* est subdivisé en trois sous-genres : *Leishmania* Safjanova, 1982, *Viannia* Lainson et Shaw, 1987, et *Sauroleishmania* Ranque, 1973. Les deux premiers sous-genres regroupent les nombreuses espèces responsables de leishmanioses chez l'homme. Le troisième sous-genre *Sauroleishmania* englobe les espèces de *Leishmania* parasites de lézards (66). La classification du genre reste cependant incertaine, car le positionnement phylogénétique de plusieurs espèces est encore non déterminé. De même, des éléments de preuve sur la possibilité d'intégrer un autre sous-genre, ont été récemment proposés (67).

Cette classification des espèces, au sein du genre *Leishmania*, est fondée principalement sur des caractères biochimiques, en particulier enzymatiques. Les souches présentant un même profil enzymatique appartiennent à une population homogène ou zymodème. L'ensemble des zymodèmes étroitement proches constitue un complexe phénétique d'espèces (**tableau 1.1**) (68).

Tableau 1.1 : Classification simplifiée du genre *Leishmania* (66, 67).

Sous-genres	Complexes	Espèces
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. archibaldi</i> <i>L. infantum</i> [syn. <i>L. chagasi</i>]
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i>
	<i>L. major</i>	<i>L. major</i> <i>L. gerbilli</i> <i>L. Arabica</i> <i>L. turanica</i>
	<i>L. Mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> [syn. <i>L. garnhami</i>] <i>L. aristidesi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. forattinii</i>
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i>
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i>
	/	Autres espèces de <i>Viannia</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. utingensis</i> (trouvée seulement chez le vecteur)
/	<i>L. enriettii</i>	<i>L. enriettii</i> , <i>L. siamensis</i> , <i>L. martiniquensis</i> et autres espèces non encore nommées : <i>Leishmania</i> sp. (AM-2004) de l'Australie et <i>Leishmania</i> sp. de Ghana.

1.3.2. Cycle évolutif et transmission du parasite

1.3.2.1. Dimorphisme de *Leishmania*

Au cours de son cycle de vie complexe, le parasite *Leishmania* sera exposé à divers environnements **extra** et **intracellulaires** (68). A cet effet, il présente un cycle de vie hétéroxène et dimorphe c'est-à-dire à plusieurs hôtes en possédant deux stades morphologiques principaux (69,70). Chez l'hôte invertébré, le parasite se présente au stade promastigote extracellulaire, au sein duquel il passe de sa forme procyclique non infectieuse à la forme métacyclique infectieuse pour l'hôte vertébré, qui héberge à son tour le parasite au stade amastigote intracellulaire (**voir appendice B**) (71).

Stade extracellulaire promastigote

Ce stade est caractérisé par le parasite extracellulaire vivant dans un environnement dont la température est de 25 à 27°C (72), et dont la concentration en oxygène est la même que celle de l'air. On retrouve ces formes promastigotes dans la lumière du tube digestif des vecteurs, présentant une forme plus au moins fuselé de 15 à 25 µm de longueur et 2 à 5 µm de largeur (73). Elles sont pourvues d'un kinétoplaste situé en position antérieure et possèdent également un flagelle libre qui émerge de leur pôle antérieur (74).

Stade intracellulaire amastigote

A ce stade, Le parasite est intracellulaire situé dans une vacuole parasitophore des cellules du Système Mononuclée Phagocytaire essentiellement des macrophages et des monocytes ; rares dans le sang périphérique ; localisé dans divers viscères (rate, et autres) et dans la lymphe dermique (75). Il est de forme arrondie ou ovoïde mesurant de 2 à 6 µm de longueur et 1 à 2 µm de largeur (73), possédant un kinétoplaste en périphérie intensément coloré, sur lequel s'insère un flagelle limité à sa partie intracytoplasmique (75).

La variation de température et du pH entre le vecteur (25°C, pH légèrement alcalin) et l'hôte vertébré (37°C, pH 4.5-5 au sein du phagolysosome) semble avoir un effet déterminant sur la différenciation du stade promastigote au stade amastigote des *Leishmanies* (72). Ainsi, cette adaptation morphologique confère aux *Leishmanies*

une meilleur **tolérance** à des environnements variés et hostiles en terme de température, pH, besoins nutritionnels, pression en O₂ et CO₂ (76).

En ce qui concerne la reproduction du genre *Leishmania*, Il a été admis depuis longtemps qu'elle reposait principalement sur un mode asexuée fondamentalement clonal, associé occasionnellement à des phénomènes de recombinaison génétique. Toutefois il a été démontré, récemment pour la première fois expérimentalement, qu'une éventuelle recombinaison **sexuée** entre souches leishmaniennes d'une même espèce pouvait avoir lieu chez son vecteur (77).

1.3.2.2. Transmission de *Leishmania*

Plusieurs hôtes peuvent être inclus dans le cycle naturel de *Leishmania*. On peut distinguer les cycles zoonotiques, primaire et secondaire, dans lesquels les réservoirs sont respectivement des vertébrés sauvages et domestiques (majoritairement des mammifères sauvages : rongeurs, marsupiaux, primates ou canidés et domestiques : canidés). L'homme peut être un hôte accidentel en se mettant en contact avec le cycle primaire où l'infection apparaît de façon sporadique avec localement des poussées épidémiques, et évidemment, avec le cycle secondaire où l'infection évolue sous forme endémique. Comme il peut être un hôte obligatoire en étant un réservoir exclusif composant avec le vecteur un cycle tertiaire strictement anthroponotique présentant une infection endémoépidémique (78).

Les Leishmanies sont transmises par la piqûre infectante d'insecte vecteur du genre *Phlebotomus* (en Afrique, Asie et Europe, soit le « Vieux Monde ») ou *Lutzomyia* (en Amérique centrale et en Amérique du sud, soit le « Nouveau Monde »), son rôle dans la transmission vectorielle était suspecté depuis le début du XXe siècle, c'est à Edmond et Étienne Sergent , avec Louis Parrot et leurs collègues de l'Institut Pasteur d'Algérie, que revient le mérite d'avoir apporté la première démonstration expérimentale de cette transmission, en 1921 (Les découvertes d'Edmond SERGENT) (79). Les phlébotomes, communément dénommés mouche des sables, appartiennent à la famille des Psychodidea où ils constituent la sous famille des Phlébotominae qui est largement répartie dans les régions tropicales et tempérées

(80,81). Les phlébotomes adultes, sont de petits insectes diptères (2 à 3 mm de long), nématocères (avec des antennes filiformes) de couleur jaune paille, recouverts d'une fine pilosité et possédant une paire d'ailes lancéolées dressées. Ils sont actifs au crépuscule lorsque la température est supérieure à 20°C (82). Ils se nourrissent de sucres végétaux, mais la femelle a besoin d'un repas sanguin pour assurer la maturation de sa ponte. Les phlébotomes piquent couramment les reptiles, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères, ces préférences alimentaires dépendent des espèces et représentent un facteur déterminant de la transmission des Leishmanies (83).

Il existe presque 800 espèces décrites de phlébotomes, parmi lesquelles 98 espèces seraient de possible vecteurs de leishmanies (84), néanmoins, un autre insecte-vecteur de la famille de Ceratopogonidés a été proposé récemment à l'exception à cette implication restreinte (85).

Cependant, la transmission non vectorielle (anthroponotique artificielle) de *Leishmania* semble être rare mais possible, elle survient par voie parentérale : des cas de transfusion, d'accident de laboratoire, échanges de seringue chez des toxicomanes, ainsi que d'exceptionnels cas de transmission congénitale (passage trans-placentaire), ou consécutifs à des transplantations d'organe ont été rapportés (86,74).

En récapitulant, le cycle de vie de *Leishmania* est résumé ci-dessous :

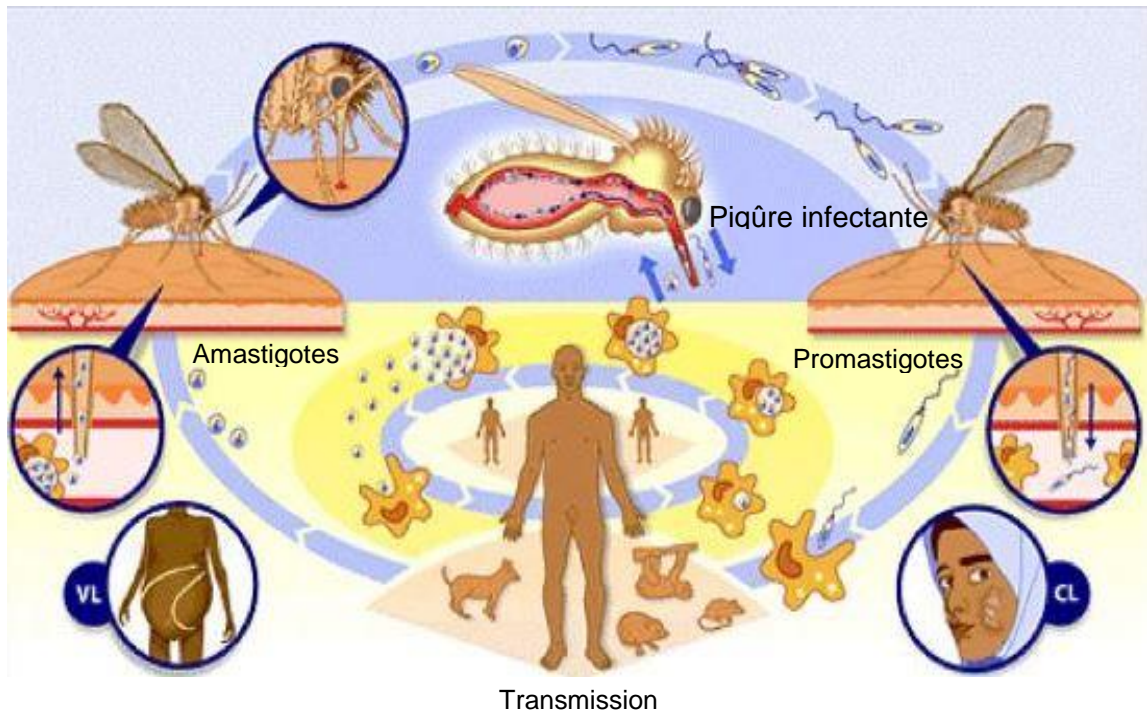


Figure 1.10 : Cycle de vie du parasite *Leishmania sp.* (87).

Dans le derme des vertébrés, l'insecte prélève le sang où le parasite est présent. Les *Leishmanies* intracellulaires sous forme amastigote sont délivrées avec le bol alimentaire au niveau de la partie moyenne du tube digestif. Quelques heures après (12 à 18 h), les *Leishmanies* sont libérées après éclatement des cellules infectées. Elles se différencient en promastigote extracellulaire. Les Parasites sont au stade procyclique, non infectieux, et se divisent activement. La maturation de ces derniers, sous l'influence du pH et de la température, s'accomplit dans la partie antérieure du tractus digestif, ainsi, les parasites acquièrent leur forme promastigote métacyclique infectieuse. Au cours du repas sanguin suivant, les parasites sont transmis à l'hôte vertébré par régurgitation et ils pénètrent dans la cellule cible, une fois à l'intérieur, les promastigotes induit la formation de vacuoles parasitophores et se transforment en forme amastigote. Ces formes se multiplient de manière active et font éclater les cellules pour infester d'autres (82).

1.3.3. Manifestations cliniques de leishmaniose chez l'homme et sa répartition géographique

L'infection de l'homme par les parasites du genre *Leishmania* aboutit à un ensemble de manifestations cliniques, caractérisées par un grand polymorphisme d'expression pathologique, allant d'une infection asymptomatique à la survenue d'une leishmaniose plus ou moins grave. La spécificité de ces manifestations cliniques est associée à des espèces particulières de *Leishmania* (69). Cependant, plusieurs formes cliniques peuvent être associées à une même espèce donnée. Ainsi, ces multiples associations sont déterminées par la combinaison de nombreux facteurs propres aux caractéristiques du parasite (infectiosité, pathogénicité et virulence) (88), aux caractéristiques de la population à risque (statut immunogénétique de l'hôte) (89) et aux divers facteurs environnementaux (90).

Les Leishmanies infectent l'homme avec trois tropismes cliniques dominants :
Les leishmanioses cutanées, muco-cutanées et viscérales (74).

1.3.3.1. Leishmaniose asymptomatique

Le contact homme *Leishmania* ne détermine pas forcément leishmaniose-maladie, l'infection peut demeurer asymptomatique pendant plusieurs années. Cependant, Il semble désormais que le sujet porteur asymptomatique est à risque de développer une leishmaniose plus ou moins sévère dans le cas d'une immunodépression (91). Ceci a été confirmé par plusieurs études de dépistage de leishmaniose viscérale causée principalement par différentes espèces comme *Leishmania infantum* (92,93).

1.3.3.2. Leishmaniose cutanée (LC)

Le terme « Leishmaniose Cutanée » regroupe l'ensemble des formes cliniques au cours desquelles le parasite se développe dans les cellules phagocytaires mononucléées et les cellules dendritiques de la peau, et reste localisé au revêtement cutané (84). La Leishmaniose dermatrope, également connues sous le

nom de bouton d'orient, clou de Biskra ou bouton d'alep (60), se traduit alors par une ou plusieurs lésions cutanées siégeant au niveau d'une zone découverte. La forme habituelle, qui est spontanément résolutive, réalise le classique bouton oriental, une papule inflammatoire ulcéro-croûteuse indolore, qui peut prendre des formes diverses telles que la forme ulcérate, végétante et surinfectée (94) (**figure 1.11**). La leishmaniose cutanée évolue parfois vers l'aggravation, elle devient récidivante et résistante aux traitements, et probablement à cause d'une défaillance immunitaire chez l'hôte (95).

La LC est causée principalement par les espèces au tropisme cutané comme : *Leishmania major*, *L. tropica* et *L. aethiopica*, dans l'Ancien monde, et *L. mexicana*, *L. braziliensis* et *L. guyanensis* dans le nouveau monde (69).

Selon l'OMS, environ 95% des cas de LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale. Plus des deux tiers de ces cas surviennent majoritairement dans les six pays suivants : l'Afghanistan, l'**Algérie**, le Brésil, la Colombie, la République arabe syrienne et la République islamique d'Iran. L'incidence annuelle mondiale de la Leishmaniose Cutanée est estimée entre 0,7 million et 1,3 million de cas, en progression constante du fait de l'augmentation des facteurs de risque (**figure 1.12**) (96).

1.3.3.3. Leishmaniose Muco-Cutanée (LMC)

La leishmaniose muco-cutanée appelée aussi espundia, est une affection chronique destructrice qui touche d'abord la peau avant de s'étendre, chez environ un tiers des patients, aux muqueuses des voies aérodigestives supérieures (97). La muqueuse nasale est généralement la première touchée (**figure 1.11**), le cartilage nasale et par voisinage la muqueuse buccale sont atteintes. Ainsi, ces différentes affections entraînent évidemment des troubles nutritionnels et respiratoires qui pourront être à l'origine d'une mortalité significative (97). Quant à la muqueuse génitale, plusieurs cas d'infection ont été rapportés (98). (Visceral leishmaniasis Epidemiology). La LMC est souvent causée par *Leishmania braziliensis*, plus rarement par *L. guyanensis* et *L. panamensis* (69).

Elle est rarement rencontrée dans l'Ancien monde, près de 90% des cas atteints de cette forme surviennent au Brésil, dans l'État plurinational de Bolivie et au Pérou (**figure 1.12**) (96).

1.3.3.4. Leishmaniose Viscérale (LV)

Cette atteinte viscérale touchant l'ensemble du système réticulo-endothélial, est la forme clinique la plus grave car mortelle dans la majorité des cas. Dans les formes typiques, elle se manifeste par l'ensemble de syndromes cliniques suivant : une fièvre désarticulée (souvent atteignant 40°C), une hépatosplénomégalie (augmentation anormale et simultanée des volumes du foie et de la rate), une polyadénopathie indolore, voire une pâleur extrême et un amaigrissement (**figure 1.11**). Sur le plan biologique, il existe constamment une pancytopénie et une hypergammaglobulinémie (augmentation des IgG). Le décès est presque toujours lié à une surinfection bactérienne digestive ou pulmonaire, ou à une hémorragie digestive (74,94).

Leishmaniose donovani, *L. infantum* et *L. chagasi* rendent compte de la majorité des cas de Leishmaniose Viscérale (99).

La Leishmaniose Viscérale est fortement endémique dans le sous-continent indien et en Afrique de l'Est. Selon les estimations de l'OMS, de 200 000 à 400 000 nouveaux cas surviennent chaque année. Plus de 90% d'entre eux se produisent dans six pays: Bangladesh, Brésil, Éthiopie, Inde, Soudan et Soudan du Sud (**figure 1.12**) (96).

Toutes fois, les leishmanies peuvent être grossièrement distinguées en espèces viscérotropes et en espèces dermatotropes, **mais leur tropisme pour un organe n'est pas absolu**. Par exemple, les espèces incontestablement viscérotropes, comme *L. donovani* et *L. infantum* peuvent être occasionnellement responsable de la Leishmaniose Cutanée. Exceptionnellement, d'autres espèces normalement dermatotropes comme : *L. tropica* et *L. amazonensis* peuvent aussi se montrer viscérotropes (100,84)

1.3.3.5. **Leishmaniose et immunodépression**

C'est vers le milieu des années 1980 qu'ont été observés les premiers cas d'infection concomitante par le VIH chez des patients d'Europe du Sud souffrant de Leishmaniose Viscérale et depuis lors, elle s'étend dans un tiers des pays d'endémie (Afrique orientale et sous-continent indien) (101). Cette co-infection VIH est apparue du fait de la superposition croissante des deux maladies: la leishmaniose (principalement viscérale, plus rarement cutanée) et le SIDA, la pandémie du SIDA atteignant les zones rurales et la leishmaniose viscérale devenant quant à elle de plus en plus sub-urbaine (102).

Ainsi, la leishmaniose a été rapportée dans certains cas d'immunodépression non VIH comme : les hémopathies, le lupus, les immunodépressions iatrogènes (corticothérapie, immunosuppresseurs), et les greffes d'organes (rein) (87).

Leishmania infantum a été ainsi dénommée par Ch. Nicole en 1908, car la maladie qu'elle provoque dans le pourtour méditerranéen atteint presque uniquement les enfants, cette forte prévalence d'infection doit être en relation avec une immunité spécifique insuffisante et probablement lié à l'Immaturité Immunologique Infantile (103).



Figure 1.11 : Diverses manifestations cliniques de la leishmaniose chez l'homme. **(A), (B)** et **(C)** : Principales aspects cliniques de la LC, représentant respectivement, des lésions ulcérées, végétantes et récidives (104,105, 106). **(D)** : Lésion mucocutanée de la LMC (107). **(E)** : Enfants atteints de la LV (108). **(F)** : LC chez un patient immunodéficient (109).

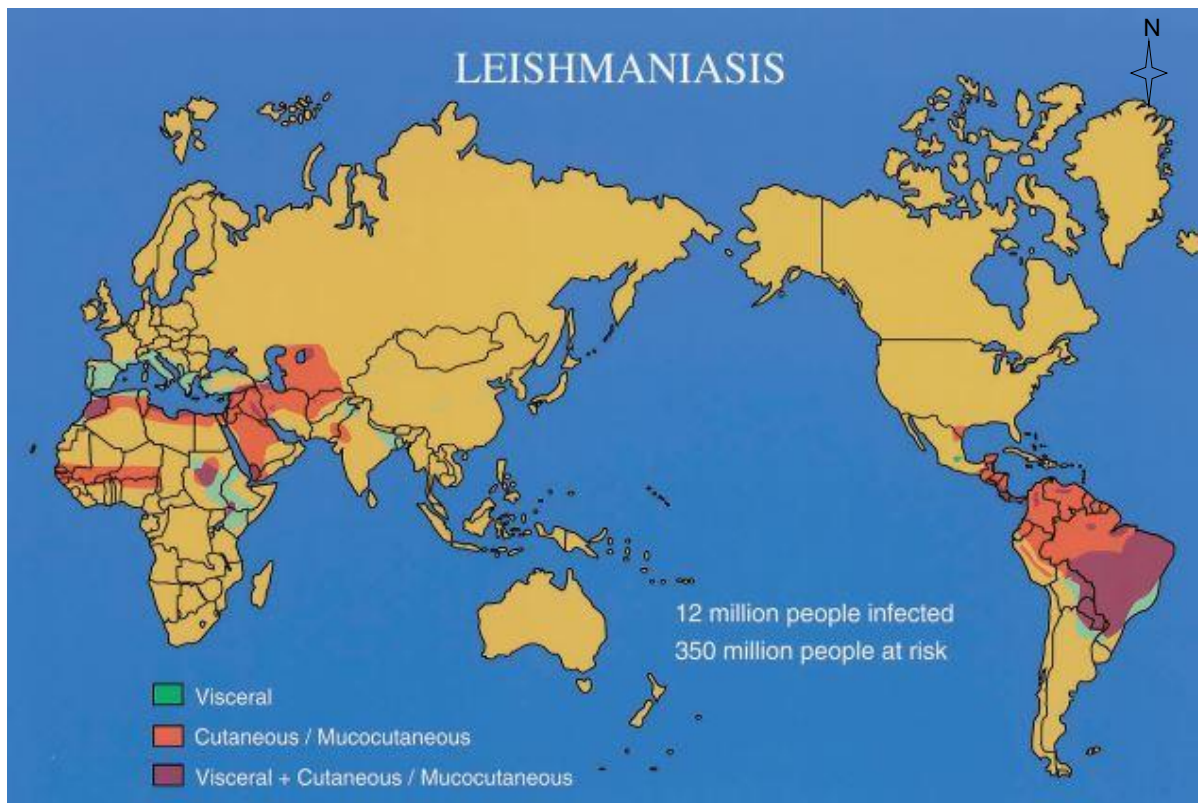


Figure 1.12 : Aire de répartition géographique globale de différentes formes de la leishmaniose (110).

À l'exception de l'Antarctique, la leishmaniose affecte 98 pays répartis sur tous les continents, elle est principalement endémique dans les régions tropicales et subtropicales. En Europe, à l'heure actuelle, la leishmaniose semble se propager vers le nord à partir de ses foyers traditionnels. Cependant, en Amérique du Nord, des foyers d'infection limitée ont été rapportés au Canada et aux États-Unis. Enfin, l'Australie semblait indemne du parasite *Leishmania* jusqu'en 2004 quand il est apparu chez quelques espèces du genre *Macropus* telles que le kangourou et le wallaby (111, 112).

1.3.4. Leishmaniose en Algérie

L'Algérie, d'une part par sa situation géographique, caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques 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 (113) A cet effet, deux formes de leishmaniose coexistent à l'état endémique en Algérie : La Leishmaniose Viscérale (LV) et la Leishmaniose Cutanée (LC) du Nord et du Sud.

Leishmaniose Viscérale

Elle est connue en Algérie depuis 1911 lorsque LEMAIRE décrit le premier cas, elle est causée par l'espèce *Leishmania infantum* dont le chien est le principal réservoir. Ainsi, le *Phlebotomus perniciosus* a été confirmé en tant qu'insecte vecteur de la maladie (114). La LV affecte habituellement les enfants malnutris âgés de moins de 5 ans. Elle touche essentiellement toute la partie Nord du pays, qui correspond aux étages bioclimatiques humides et subhumides et s'étend ces dernières années vers les régions arides et semi arides du Sud Algérien (113).

Etant déclaré le foyer le plus actif, la Grande Kabylie représente à elle seule près de 50% de cas recensés dans le pays, et cela inclut la région de Tizi Ouzou, de Bouira, de Bejaïa et de Boumerdès. La Wilaya de Constantine, de Jijel, de Mila et de Skikda sont aussi fortement touchés par la Leishmaniose Viscérale. En effet, d'autres foyers infectieux sont observés au Centre du pays au niveau des localités de la Wilaya de Blida, de Tipaza, de Chlef et de Médéa ; à l'Ouest principalement au niveau de la Wilaya de Tlemcen et d'Oran; au Sud dans les Wilayas de M'Sila et Biskra (113). Néanmoins, d'autres cas sporadiques de la LV ont été enregistrés dans le Hoggar et le Tassili n'Ajjer à l'extrême Sud de l'Algérie (114).

Leishmaniose Cutanée

En Algérie, la Leishmaniose cutanées est due à trois espèces de *Leishmania* :

- Leishmaniose Cutanée Zoonotique due à *Leishmania major* ;
- Leishmaniose Cutanée Zoonotique due à *Leishmania killicki* ;
- Leishmaniose Cutanée Sporadique du nord due à *Leishmania infantum*.

Leishmaniose Cutanée Zoonotique (LCZ)

Elle a été décrite pour la première fois en 1860 par M. Henri HAMEL à Biskra d'où la dénomination « clou de Biskra » (115). Les Gerbillidés sont reconnus comme réservoirs de l'espèce du parasite en cause (116). Le vecteur prouvé de la LCZ à *Leishmania major* est l'insecte *Phlebotomus papatasi* (113). Cette forme sévit à l'état endémo-épidémique dans les régions steppiques, arides et semi-arides, (117). Les principaux foyers sont : Biskra, Abadla (Béchar). Tiaret, M'sila, Batna, Bordj Bou Arreridj et Médéa (118). A ce jour, la LCZ continue à se propager de plus en plus vers le Nord du pays (119).

La Leishmaniose Cutanée Zoonotique à *Leishmania Killicki* est apparue en 2005 à Ghardaïa, récemment, elle a été également rapportée dans la région de Hajout (Tipaza) (120).

Leishmaniose Cutanée Sporadique (LCS)

Elle a été rapportée pour la première fois en 1923 par SERGENT sous la dénomination « clou de Mila ». Ainsi, elle est due aux variants enzymatiques (MON 24, MON 80) de *L.infantum*, dont le chien est le réservoir. Ce parasite est transmis par l'espèce *Phlebotomus perfilliewi*. La LCS se répartit en semis tout le long du littoral et du Tell algérien et sa répartition géographique se confond avec celle de LV (113).

1.3.5. Traitement de la leishmaniose

Le **traitement** des leishmanioses reste **difficile**, en raison, d'une part de la multiplicité des espèces de *Leishmania*, de sensibilité variable aux produits médicamenteux utilisés et, d'autre part, du nombre restreint de ces produits qui sont de surcroît anciens, toxiques et coûteux. Ce traitement est dominé depuis les

années 1920 par les dérivés stibiés (antimoniés pentavalents) qui demeurent encore souvent des médicaments de première intention. Mais depuis l'accroissement des cas de co-infection LV/sida et l'apparition des résistances aux antimoniés, d'autres traitements médicamenteux alternatifs ont été autorisés comme : l'amphotéricine B, la pentamidine, la paromomycine et la miltéfosine (**tableau 1. 2**). La résistance clinique et les échecs thérapeutiques chez les patients atteints de leishmaniose ont été de plus en plus démontrés ces dernières années, illustrant ainsi la nécessité de poursuivre les recherches pharmacologiques sur le développement de nouveaux agents anti-leishmanioses plus actifs et moins toxiques (121, 122, 123). Pour atteindre cet objectif plusieurs approches alternatives ont été adoptées, le retour aux **thérapeutiques naturelles**, l'emploi des **plantes médicinales** en particulier, constitue une source potentielle de molécules bioactives décelées et exploitées par des essais reproductifs, incomplexes, rapide et moins coûteux (124).

En outre, les nanoformulations, qui sont des systèmes de biodistribution visant à améliorer le profil pharmacocinétique d'un principe actif, présentent aujourd'hui une approche novatrice faisant incorporer les produits d'origine végétale tels que les huiles essentielles, les extraits bruts, les fractions, ou les phytocomposants isolés dans des différents nanovecteurs afin d'optimiser leur efficacité antileishmanienne et d'augmenter leur tolérance clinique (125).

D'autres méthodes de thérapie sont également employées telles que : la cryothérapie et la thérapie photodynamique, notamment dans le cas de LC lorsque le traitement systémique est jugé non nécessaire (126).

Tableau 1.2 : Principaux médicaments utilisés contre la leishmaniose.

<i>Substance médicamenteuse (annexe)</i>	<i>Efficacité</i>	<i>Toxicité</i>
Antimoniés pentavalents (Antimoniote de <i>N</i> -methyl- glucamine et stibogluconate de sodium)(127,128)	35 à 95 % (variable selon la zone géographique)	Cardiotoxicité sévère, la pancréatite, néphrotoxicité, hépatotoxicité
Amphotéricine B (Antibiotique polyénique antifongique)(129,130)	> 90 %	Néphrotoxicité, hypokaliémie, réactions liées à la perfusion, une pyrexie élevée
Isethionate de pentamidine (Diamine aromatique)(131)	35 à 96 % (variable selon l'espèce de <i>Leishmania</i>)	Hyperglycémie suite à une pancréatite, hypotension, tachycardie,
Paromomycine (Antibiotique aminoglycosidique) (131,132)	94 % (Inde) 46 à 85 % (Afrique)	Néphrotoxicité sévère, ototoxicité, hépatotoxicité
Miltéfosine (Antinéoplasique alkylphospholipide) (131,132)	94 % (Inde) 60 à 93 % (Afrique)	Vomissements et diarrhées, néphrotoxicité, hépatotoxicité, téatogénicité

1.4. Généralités sur les radicaux libres et les antioxydants

1.4.1. Radicaux libres et stress oxydatif radicalaire

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules hautement réactifs, neutres ou chargés, capables d'assurer une existence indépendante, possédant un ou plusieurs électrons célibataires (ou non appariés) isolés sur une orbitale externe. Cet électron (e^-) est conventionnellement représenté par un point « • » sur l'atome dont il dépend. La formation d'un radical libre peut résulter de la rupture homolytique d'une liaison covalente (par opposition à la rupture hétérolytique donnant naissance à des ions de charge opposée) ou d'un transfert d'électron. Ils sont le plus souvent des espèces chimiques ayant une durée de vie extrêmement courte, étant donné qu'elles cherchent sans cesse à réappairier leur électron célibataire (133,134).

Toutefois, la production des radicaux libres est un phénomène permanent au sein de la matière vivante, impliqué dans de nombreux processus physiologiques et/ou pathologiques (134).

La production de ces radicaux libres peut cependant résulter de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes, les sources endogènes se situent principalement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, au niveau de certains organites cellulaires (tels que lysosomes et peroxyosomes), au cours de la phagocytose et par de nombreuses oxydases cellulaires, à titre d'exemple, la *monoamine oxydase* qui catalyse la déamination oxydative de certains neurotransmetteurs, produisant simultanément des radicaux libres mis en cause dans les maladies neurodégénératives (135).

Les sources exogènes sont aussi multiples : xénobiotiques, composés chlorés, divers agents environnementaux (comme : les rayonnements ultraviolets ou ionisants, les métaux toxiques et les polluants), et même de nombreuses substances médicamenteuses (exemple : l'antibiotique bactéricide *fluoroquinolones*) (136, 137).

Les radicaux libres peuvent être classés en deux catégories : radicaux libres primaires et secondaires. Les radicaux libres primaires sont formés directement à partir de l'oxygène ou de l'azote et sont appelés Espèces Réactives de l'Oxygène

(ERO) ou Espèces Réactives de l'azote (ERN). Par ailleurs, les radicaux libres secondaires sont générés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres primaires sur des différents composés biochimiques cellulaires. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, tel que : l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont tout aussi réactives, étant des précurseurs, en donnant naissance à des radicaux (138, 134).

Les radicaux libres jouent un rôle physiologique, indispensable à la survie des organismes vivants, ils participent, essentiellement, au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule et à la régulation des gènes (138)

Néanmoins, il apparaît, dans certaines conditions, un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense neutralisant ces derniers, ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre caractérise l'état de **stress oxydant** (138).

Selon la définition classique proposée par HELMUS SIES en 1985, **le stress oxydatif** est un déséquilibre de la balance production des oxydants (radicaux libres) / réaction du système de défense antioxydante cellulaire en faveur de la première, cette notion a ensuite été modifiée, par P. Jones Dean en 2006, afin de définir, avec plus de précision, le stress oxydatif comme étant une perturbation de la signalisation du maintien de l'homéostasie cellulaire redox qui entraîne des dommages oxydatifs à une échelle biomoléculaires (139, 133,140).

Le rôle des réactions radicalaires, provoquées par le stress oxydatif, dans le vieillissement des organismes vivants a été initialement proposé par Harman en 1954, mais depuis, il paraît que le stress peut engendrer des conséquences importantes sur la structure et métabolisme cellulaires, il est à l'origine de dégâts

cellulaires consécutifs à l'apparition de cassures et de mutations au sein de l'ADN, à l'inactivation de nombreuses enzymes, à la modification et/ou l'altérations de la structure de protéines, à l'oxydation de glucides ou à l'induction des dommages moléculaires en provoquant la peroxydation des lipides membranaires, à la rupture des processus mitochondriaux et cytosoliques, et autres (141, 142, 143).

Le stress oxydatif est significativement impliqué dans le développement de très nombreuses pathologies : les pathologies inflammatoires [arthrite, vascularite, glomérulonéphrite, lupus érythémateux disséminé et syndrome de détresse respiratoire de l'adulte], les pathologies ischémiques [pathologie cardiaque, accident vasculaire cérébral, et ischémie intestinale], l'hémochromatose, Le Syndrome d'Immuno-Déficiences Acquis (SIDA), l'emphysème, les ulcères gastriques, l'hypertension artérielle et la toxémie gravidique ainsi que les pathologies neurologiques [sclérose en plaques, Alzheimer, Parkinson, sclérose latérale amyotrophique, dystrophie musculaire], l'alcoolisme, les pathologies liées au tabagisme et même plusieurs autres maladies (144).

Il est à noter que, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des procarcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les anti-oncogènes (145).

Cette multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu (145).

1.4.2. Antioxydants et leur activité thérapeutique

Pour empêcher ou limiter les dommages oxydatifs cellulaires et tissulaires, l'organisme dispose d'un système de défense très complexe et très coordonné, constitué par des composants antioxydants. Ces antioxydants peuvent être définis comme toute substance, présente à faible concentration par rapport au substrat

oxydable, capable significativement de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (146).

Cette défense comporte un système de composants qui interagissent entre eux à différents compartiments de l'organisme : intracellulaire, membranaire (membrane péricellulaire et membrane intracellulaire) et extracellulaire (147).

Les antioxydants peuvent être soit enzymatiques, soit non enzymatiques, ils peuvent être d'origines endogène ou exogène et peuvent être également des composés naturels ou synthétiques. Toutefois, ils peuvent intervenir comme antioxydants primaires en exerçant un rôle préventif sur la production de radicaux libres ou comme antioxydants secondaires en éliminant les radicaux formés (148,146).

Les antioxydants **enzymatiques** sont au nombre de trois :

- *les superoxydes dismutases (SOD)* : sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en molécule de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (149);
- *les catalases* : sont des enzymes hémiques capables de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène principalement au niveau des peroxysomes, des érythrocytes et des hépatocytes. Elle interviendrait essentiellement lorsque H₂O₂ est produite en excès (hyperoxie) ou dans les situations d'insuffisance du système glutathion (149);
- *les glutathion peroxydases* : catalysent la réduction des hydroperoxydes minéraux (peroxyde d'hydrogène) ou organiques en molécule d'eau ou alcool couplé à l'oxydation d'un substrat comportant une fonction thiol (glutathion) (149).

En outre, il existe d'autres antioxydants de nature **non enzymatique**, qui sont d'origine exogène apportés par alimentation nutritionnelle, citons : les composés vitaminiques (vitamines C, E et A), les caroténoïdes, certains oligo-éléments (zinc, sélénium et autres), les **flavonoïdes** et **autres polyphénols**. Enfin, de nombreuses molécules endogènes, synthétisées par l'organisme tels que : glutathion, bilirubine, acide urique, ubiquinone (coenzyme Q), protéines à groupements thiols

comme l'albumine, les hormones sexuelles (œstrogènes), la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque (149).

Les **polyphénols végétaux**, en particulier, font l'objet de nombreuses études qui mettent en évidence de multiples substances antioxydantes. Plusieurs travaux, *in vitro*, leur attribuent des capacités de neutralisation de la plupart des espèces oxygénées actives (150).

L'administration d'antioxydants à titre curatif peut à la fois corriger les carences et subcarences vitaminiques antioxydants et rétablir l'équilibre nécessaire de la balance oxydants / antioxydants. Ainsi, il semble parfaitement judicieux de rappeler qu'un apport en antioxydants peut faire reculer l'apparition de certaines pathologies. Ces complexes antioxydants sont des substances thérapeutiques atoxiques, qui préviennent la dégradation des systèmes biologiques qui induisent fréquemment des altérations cellulaires irréversibles. Ces substances devraient trouver, dans un avenir immédiat, une place de tout premier choix dans l'arsenal thérapeutique d'avenir (151).

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. Collecte, identification et séchage du matériel végétal

La période de récolte de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl., selon les données ethnobotaniques, s'étend entre le début du printemps et la fin de l'été. En effet, la cueillette destinée à la présente étude a été effectuée durant le mois de juin 2014, dans la région de Tizi gheniff (36°35'20" N de latitude, 3°46'33" E de longitude et 359 m d'altitude), au niveau de la Wilaya de Tizi Ouzou (figure 2.12).

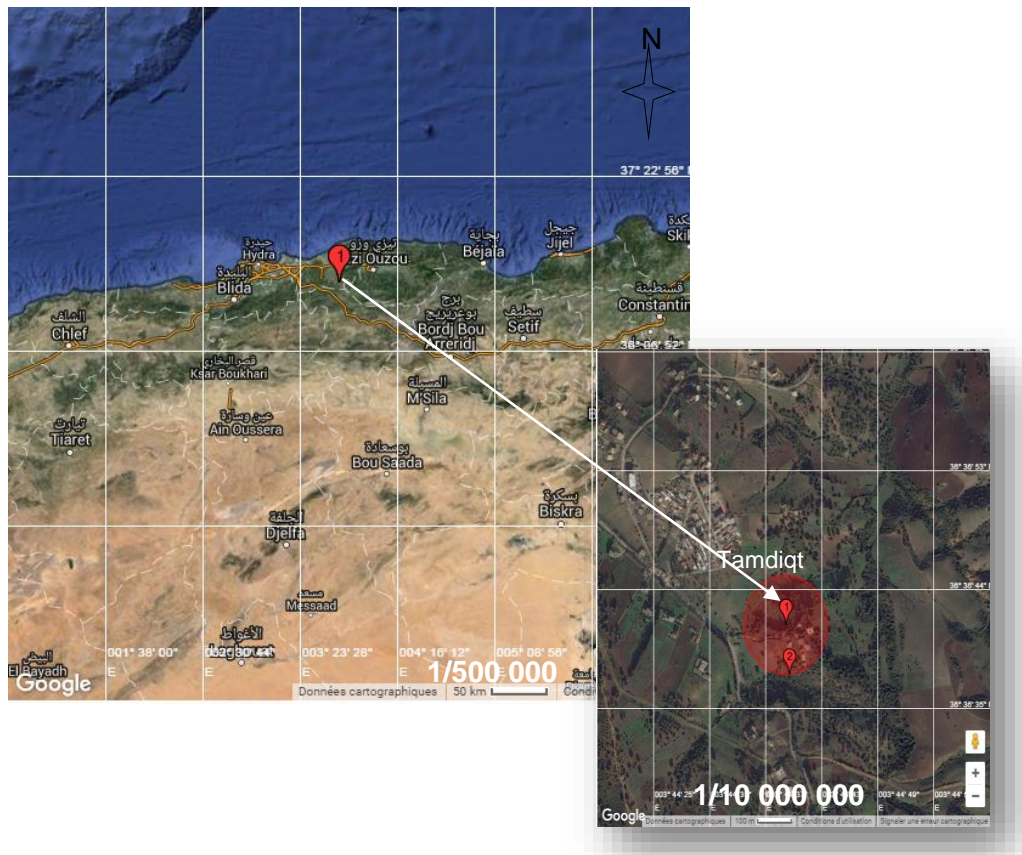


Figure 2.12 : Situation géographique de la région de collecte (152).

Tenant compte de l'influence exercée par divers facteurs environnementaux sur la composition chimique des plantes médicinales (à titre d'exemple, basses températures nocturne, au-delà d'une certaine altitude, empêchent la formation de quelques principes actifs, comme les alcaloïdes, à partir des produits de la photosynthèse (1)), et afin de mieux connaître le milieu naturel de l'espèce *Fraxinus*

angustifolia Vahl. récoltée, des données relatives aux caractéristiques édapho-climatiques de la région des récoltes ont été recueillies (selon la disponibilité).

En effet, le sol homogénéisé prélevé (jusqu'à environ 45 cm) au site de récolte est caractérisé par une texture argilo-limoneuse, avec un pH presque neutre environ de 6,89, concordant ainsi avec les données de la littérature déjà citées.

En outre, les données climatiques de la région de collecte (température, humidité, précipitation et insolation), relevées à la station météorologique de Tizi Ouzou (la plus représentative par rapport au site) durant la période de 1996 à 2008, et qui ont été fournies par l'Office National de la Météorologie (ONM) d'Algérie, sont rapportées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.3 : Données météorologiques relatives à la période de 1996 à 2008 de Tizi Ouzou (153).

Données météorologiques	1996-2008	Juin (1996-2008)
Température moyenne maximale	20°C	30.9°C
Humidité relative moyenne	69%	59%
Précipitation	783,3 mm	5,9 mm
Insolation totale	2687,3 heure/an	302,1 heure/mois

Après la récolte d'un nombre d'échantillons de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl., son identité a été confirmée par Mr ABDELGUERFI, Professeur à l'Ecole National Supérieure Agronomique (ENSA).

En ce qui concerne le matériel végétal employé, les **feuilles** sont l'organe de la plante, qui a fait l'objet de cette étude. La récolte de ces feuilles a été réalisée dans des conditions climatiques propices et le taux de la cueillette estimé n'a pas dépassé les **5%** de feuillage par individu (récolte totale sur cinq individus)(154, 155).

Le séchage a notamment été réalisé le jour même de la cueillette, les feuilles ont été suspendues en bouquets, sur de longues cordes tendues, dans un endroit aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, et ce, pendant cinq (05) jours.

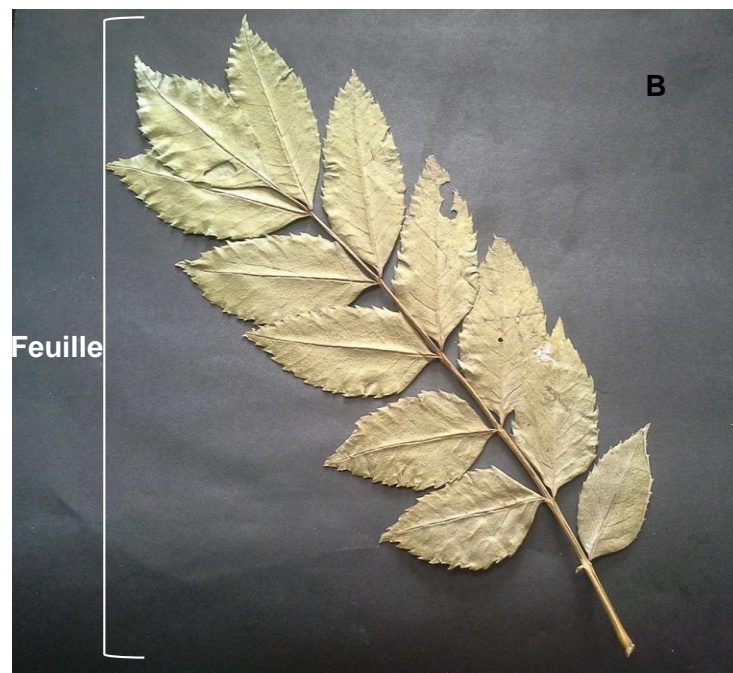
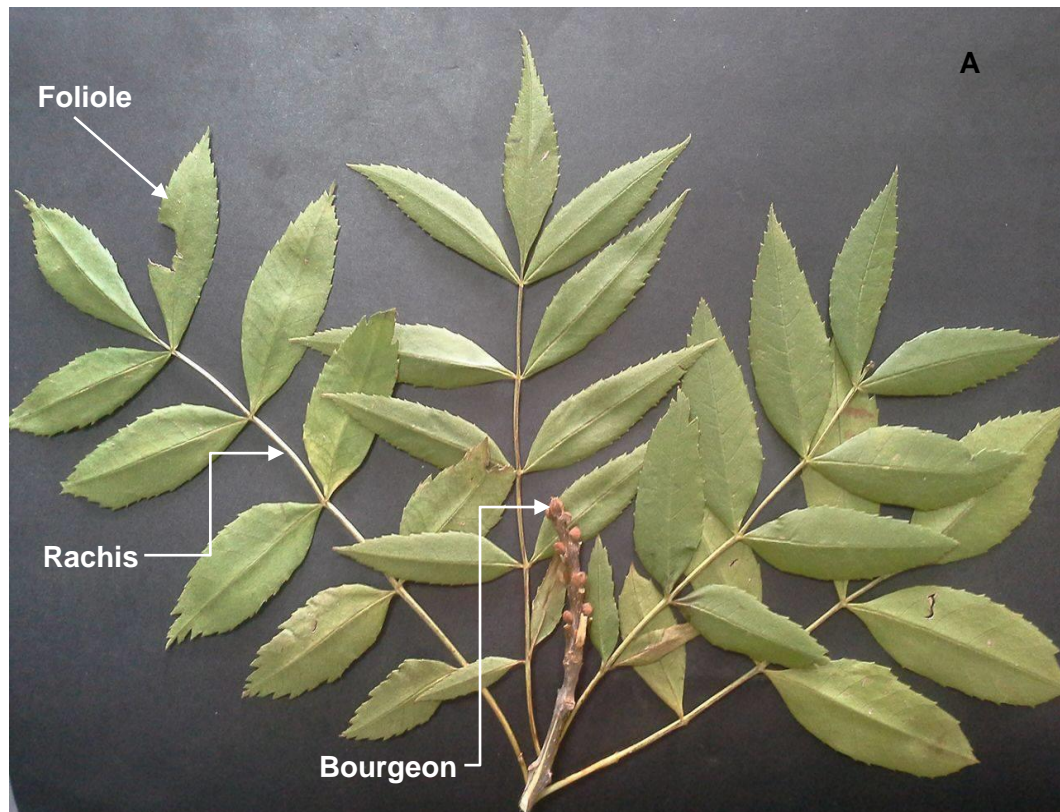


Figure 2.13 : représentations photographiques des échantillons du matériel végétal destiné à l'expérimentation (**A**: échantillon frais, **B** : échantillon séché).

2.2. Extraction de substances bioactives

Au cours de cette étude, trois types d'extraction ont été exécutés : extraction par hydrodistillation simple, extraction par décoction et extraction par épuisement au soxhlet.

2.2.1. Détermination de la teneur en eau par la méthode gravimétrique

Avant de procéder aux différentes extractions, la teneur en eau de la matière végétale séchée a été estimée par la méthode gravimétrique.

Cette méthode consiste à déterminer la teneur en eau en mesurant la perte de poids par dessiccation à l'étuve. Pour cela, trois prises d'essai de 1 à 2 grammes environ, de la matière végétale broyée, ont été déposées dans des flacons à tare (dont le poids est préalablement mesuré). Puis, pesées avec trois répétitions de mesure pour chaque prise. Les échantillons ont ensuite été séchés dans une étuve à $103^{\circ} \pm 2^{\circ}$ pendant 2h (1).

Après refroidissement à température ambiante dans un dessiccateur, les échantillons ont encore été pesés. La teneur en eau fut calculée comme suit (1) :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = [(P_0 - P) / P_0] \times 100$$

P₀ : poids initial de la poudre végétale en gramme;

P : poids final de la poudre végétale en gramme.

2.2.2. Extraction de l'huile essentielle entrainable à la vapeur

2.2.2.1. Extraction par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un extracteur de type clevenger

L'extraction de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. a été réalisée par entrainement à la vapeur en utilisant le procédé d'hydrodistillation simple, qui consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un bain d'eau dans le ballon réacteur de l'appareil extracteur de type clevenger (**figure 2.14**), préconisé par la pharmacopée européenne. Le montage est ensuite porté à

ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans le réfrigérant, l'huile essentielle se concentre goutte à goutte dans l'essencier, et se sépare de l'hydrolat (phase aqueuse obtenue) par différence de densité. L'hydrodistillation se fait en continu et l'hydrolat est cohobé (renvoyé dans le système) durant la période d'extraction (8, 156, 157).

La durée d'extraction de l'huile essentielle débute lorsque la première goutte de distillat se condense jusqu'à la dernière goutte.

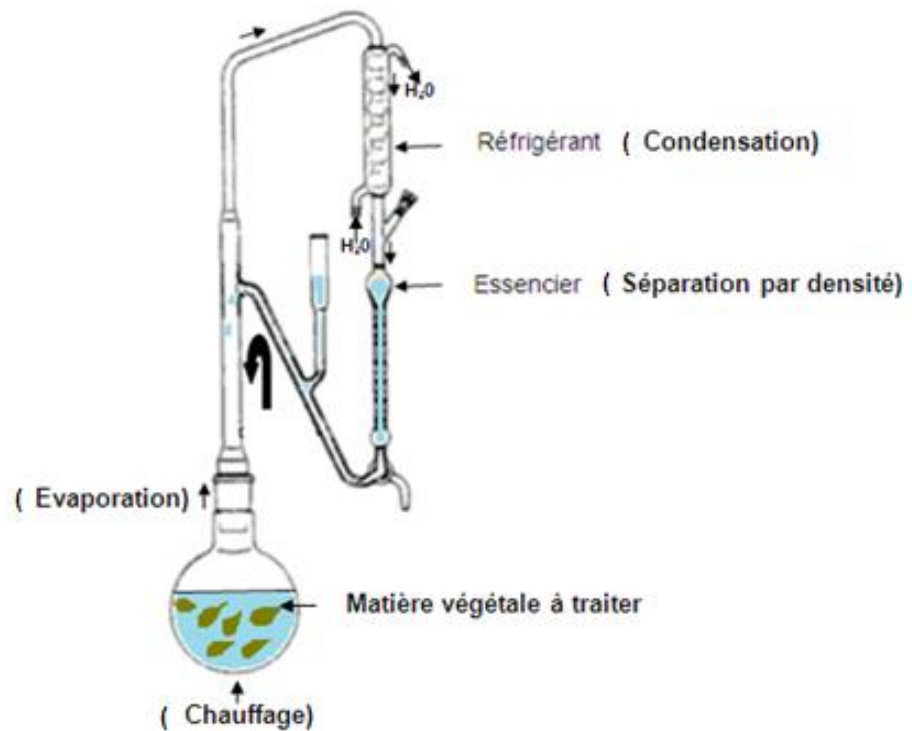


Figure 2.15 : Schéma de l'hydrodistillation par clewenger (158).

Protocole d'extraction :

Une prise d'essai de 50 g de feuilles séchées a été introduite dans le réacteur à fond rond de 2L avec 1,1L d'eau distillée. Le montage a été installé et amené à ébullition par chauffage direct. Après 5h d'extraction, l'huile essentielle ainsi récupérée a été déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), ensuite pesée, avant d'être conservée (à l'abri de la lumière) dans des flacons en verre scellés à $-18 \pm 02^\circ\text{C}$ jusqu'à utilisation. Pour la détermination du rendement, trois répétitions d'extraction ont été effectuées.

2.2.2.2. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement a été estimé en tenant compte directement de la masse d'huile essentielle (en gramme) obtenue pour 50 g de matière végétale sèche.

Le rendement fut calculé selon l'équation suivante :

$$R_{HE} = [m/m_0] \times 100$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle en %;
 m_n : masse de l'huile essentielle en gramme;
 m_0 : masse de la matière végétale séchée utilisée en gramme.

2.2.3. Extraction solide - liquide de principes bioactifs

2.2.3.1. Extraction continue par la méthode de décoction assistée par agitation magnétique

Préparation de l'extrait brut aqueux

15 g de matière végétale séchée et broyée en fine poudre, ont été introduits dans 300 mL de l'eau distillée, l'ensemble a été porté à reflux sous agitation magnétique pendant 10 minutes. Le décocté obtenu a été filtré par gravité sur des compresses stérile de gaze hydrophile, ensuite soumis à la filtration sous vide à travers un filtre à membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE), de porosité 0,45 μ m.

Le filtrat récupéré a ensuite été congelé à - 20°C en vue de son lyophilisation, qui a été conduite, à l'aide d'un lyophilisateur Martin Christ Alpha 2-4 LSC Plus, en deux périodes de déshydratation sous vide : déshydratation primaire durant 24h à 0.2 mbar, et secondaire durant 4h à 0,09 mbar. La température du condensateur à glace a été maintenue à - 80°C tout au long de la lyophilisation (159).

Enfin, le lyophilisat a été pesé afin de calculer son rendement et conservé à -18 \pm 02 °C à l'abri de la lumière, jusqu'à utilisation.

2.2.3.2. Extraction continue par la méthode de soxhlet assistée par agitation magnétique

Les extraits bruts méthanolique et éthéropétrolique ont été préparés par la méthode d'extraction au soxhlet, qui repose sur l'épuisement de la matière végétale par un solvant pur. Ce dispositif est composé d'un corps extracteur, fixé sur un ballon collecteur, et surmonté d'un réfrigérant ascendant (**figure 2.15**).

Durant l'extraction, le solvant employé est amené à ébullition dans le ballon collecteur placé sur un dispositif chauffant, ses vapeurs émises traversent l'extracteur à travers le tube adducteur et se condensent dans le réfrigérant. Le condensat retombe alors, goutte à goutte, sur l'échantillon introduit dans une cartouche filtrante en cellulose placée dans le corps extracteur du soxhlet, permettant ainsi la macération de l'échantillon. Le solvant, chargé de molécules extraites, est renvoyé dans le ballon à travers le tube siphon de l'extracteur au moyen d'un système de trop-plein. Ainsi, l'extrait, se trouvant dans le ballon, se concentre progressivement, et ce d'autant plus vite que les substances extraites ont plus d'affinité pour le solvant choisi (160).

La durée d'extraction débute dès que la première goutte de solvant tombe dans l'extracteur jusqu'au dernier siphonage (160).

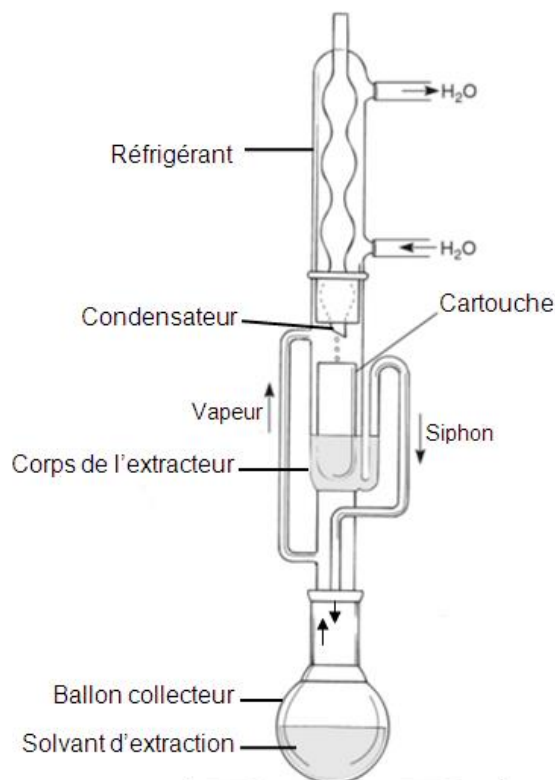


Figure 2.15 : Schéma de l'extracteur type soxhlet (161).

Préparation de l'extrait brut méthanolique :

15 g de matière végétale séchée et fraîchement broyée en fine poudre, ont été introduits dans la cartouche en cellulose de soxhlet, ainsi un volume de 300 mL de méthanol a été transféré dans le ballon et laissé refluer 12h sous agitation magnétique à sa température d'ébullition. En effet, l'extraction a été effectuée au rythme d'un cycle/heure totalisant environ 12 cycles.

Après refroidissement, l'extrait recueilli a été filtré sous vide en utilisant le filtre à membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 0,2 µm. Le solvant du filtrat a ensuite été évaporé à sec sous vide, à l'aide d'un évaporateur rotatif à 41 ± 01 °C. Enfin, l'extrait méthanolique a été pesé pour évaluer la teneur de l'extrait et conservé à -18 ± 02 °C à l'abri de la lumière, jusqu'à utilisation.

Préparation de l'extrait éthéropétrolique

L'extrait éthéropétrolique a été obtenu par le même protocole que l'extrait méthanolique décrit précédemment. Cependant, l'extraction par l'éther de pétrole a été effectuée durant 10h à un rythme d'un cycle / 35 minutes exécutant au total environ 17 cycles. L'extrait brut obtenu a été refroidi et filtré sous vide sur le filtre à membrane en PTFE de 0,2 µm. Puis, le solvant a été évaporé à sec et sous vide par le rotavapor à une température de 25 ± 01 °C. Le résidu a été pesé pour évaluer son rendement et gardé à -18 ± 02 °C à l'abri de la lumière, jusqu'à utilisation.

2.2.3.3. Calcul des rendements en extrait brut

Le rendement en extrait a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R (\%) = [m_{\text{ext}} / m_{\text{vgt}}] \times 100 \quad (162)$$

m_{ext} : masse de l'extrait en gramme;

m_{vgt} : masse de la matière végétale séchée utilisée en gramme.

Des analyses statistiques seront effectuées afin de traiter les résultats expérimentaux obtenus.

2.3. criblage phytochimique préliminaire des extraits bruts

Le criblage phytochimique préliminaire de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl. a porté sur les extraits bruts aqueux, resuspendu dans de l'eau distillée, méthanolique et éthéropétrolique remis en solution dans du méthanol. Ce criblage a été effectué par les tests de caractérisation (colorimétrique et par précipitation) de différentes classes chimiques présentes dans les extraits, entre autres :

A- Tanins :

- **Test au chlorure ferrique** : ce test a été réalisé par l'ajout de quelques gouttes de la solution aqueuse de chlorure ferrique (FeCl_3) à 5 % à 1 mL de chaque solution d'extrait préalablement préparée à raison de 50 mg pour 1 mL. L'apparition d'un précipité bleu-noir, bleu-vert ou brun verdâtre indique la présence des tannins (163, 8).

B- Flavonoïdes :

- **Test de shinoda** : ce test a été réalisé par l'addition de quelques copeaux de magnésium, suivis par quatre gouttes d'acide chlorhydrique concentré (0,5 N) à chaque solution d'extrait ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). L'apparition d'une coloration rose, rouge ou orange indique la présence des flavonoïdes (163).
- **Test à hydroxyde de sodium** : 0,5 mL de la solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 0,1N (10%) ont été ajoutés à 1mL de chaque solution d'extrait (50mg/mL). Induisant ainsi l'apparition d'une coloration jaune. La disparition de cette couleur après l'addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique confirme la présence des flavonoïdes (164).

C- Alcaloïdes :

- **Test de Dragendorff** : 1mL de chaque solution d'extrait (50mg/mL) a été ajouté à un volume équivalent du réactif de Dragendorff (**voir appendice B**). La formation d'un précipité jaune ou rouge orangé indique la présence des alcaloïdes (165, 163).
- **Test de Hager (test de confirmation)** : 1 mL du réactif de Hager (solution aqueuse saturé en acide picrique) a été ajouté à 1mL de chaque solution

d'extrait (50mg/mL). La formation d'un précipité jaune cristallin indique la présence des alcaloïdes (165, 163).

D- Saponosides :

- **Test de mousse** : 0,5 mL de chaque solution d'extrait brut aqueux et méthanolique (préparée à raison de 25 mg pour 0,5 mL), ont été ajustés à 10 mL d'eau distillée, puis, agités vigoureusement pendant 15 min. La formation d'une mousse persistante indique la présence de saponosides (163).

E- Glycosides cardiotoniques :

- **Test de Keller-Kiliani** : 50 mg de chaque extrait ont été traités avec 2 mL d'anhydride acétique renfermant une goutte de 5% de chlorure ferrique, puis, 1 mL d'acide sulfurique (1N) concentré a été soigneusement introduit à la partie inférieure du tube contenant la solution préparée. L'apparition d'une coloration bleu-vert de la phase acétique indique la présence des glucosides cardiotoniques (1).

F- Composés réducteurs :

- **Test de Fehling** : 1mL de chaque solution d'extrait brut (50mg/mL) a été chauffé dans un bain-marie avec un volume équivalent de liqueur de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs (163).

G- Mucilages :

12,5 mL d'éthanol absolu ont été ajoutés à la solution d'extrait brut aqueux préparée à raison de 50 mg pour 5mL. La formation d'un précipité blanchâtre et floconneux indique la présence de mucilages (163).

Un témoin négatif a été également réalisé pour chaque test de caractérisation.

2.4. Détermination de la teneur en composés polyphénoliques totaux

Le contenu en composés polyphénoliques des extraits bruts de *Fraxinus angustifolia* Vahl. a été estimé par le dosage colorimétrique selon la méthode décrite par FOLIN et CIOCALTEU (1927) et modifiée par SINGLETON et ROSSI (1965) (166,167). Cette méthode est fondée sur la réduction en milieu alcalin de réactif de Folin-Ciocalteu, qui est un mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune, par les composés phénoliques en oxydes de tungstène et de molybdène de couleur bleue, l'intensité de cette coloration produite est proportionnelle avec la quantité des composés phénoliques réagissant lors du dosage.

Le dosage a été effectué sur les extraits bruts dilués dans le méthanol à une concentration de 1 mg.mL^{-1} , et fut réalisé comme suit : un volume de 1mL de réactif de Folin - Ciocalteu, préalablement dilué au 1/10 dans le méthanol, a été ajouté à 200 μL de chaque extrait et laissés réagir 4min. Puis, 800 μL de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% ont été rajoutés. Ainsi, cette même solution sans extrait a été retenue comme blanc.

Le mélange a ensuite été maintenu pendant 2h dans l'obscurité à une température ambiante. Enfin, l'absorbance a été mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Optizen Pop). La concentration en composés polyphénoliques totaux a été estimée en triplicata, à l'aide d'une droite d'étalonnage qui a été établie avec de l'acide gallique à une gamme de concentration de [0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, mg.L^{-1}].

Des analyses statistiques seront effectuées afin de traiter les résultats expérimentaux obtenus.

2.5. Criblage des activités biologiques de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

2.5.1. Criblage *in vitro* de l'activité antiparasitaire des produits extractibles

Le criblage biologique préliminaire de l'activité antiparasitaire a été mené sur les extraits bruts aqueux, méthanolique et éthéropétrolique, ainsi que sur l'huile essentielle. Pour ce faire, deux tests ont été réalisés, et ce, suivant les procédures opératoires internes du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations, appartenant à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) : le **test d'évaluation de l'effet inhibiteur** de ces quatre produits extractibles sur la croissance *in vitro* des leishmanies et le **test d'estimation de la cytotoxicité** des produits, ayant présenté un effet antileishmanien, sur la lignée monocyttaire humaine THP-1. L'Indice de Sélectivité (IS) des produits bioactifs a également été évalué (124).

2.5.1.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la croissance leishmanienne

Lors de ce test préliminaire *in vitro*, cinq souches référencées appartiennent à quatre différentes espèces de *Leishmania*, ont été utilisées :

- ***Leishmania infantum*** Réf. : MCAN/DZ/2006/LEM 5285, zymodème MON-281 ;
- ***Leishmania donovani*** Réf. : MHOM/IN/80/Ldd 8, zymodème MON-2;
- ***Leishmania killicki*** Réf. : MHOM/DZ/2011/LIPA 281, zymodème MON-301 ;
- ***Leishmania major*** Réf. : LIPA 32/06, zymodème MON-25 ;
- ***Leishmania major*** Réf. : MHOM/DZ/2009/LIPA 100, zymodème MON-25.

2.5.1.1.1. Culture *in vitro* de leishmanies au stade promastigote

La culture *in vitro* des différentes souches de leishmanies au stade promastigote a été assurée en continue, par repiquage successifs suivant la nécessité, sur milieu biphasique NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) à base de gélose au sang de lapin et avec

un pH de 7,2. Puis, les parasites ont été transférés (en conditions axéniques) progressivement dans des flasques stériles contenant le milieu complet RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Foetal (décomplémenté à 56°C pendant 30 min). Durant la culture, les parasites ont été incubés dans une étuve à 25°C ± 1°C, et vérifiés systématiquement en microscopie photonique à grossissement x 40 afin de surveiller toute contamination possible (**voir appendice C**).

2.5.1.1.2. Cinétique de croissance leishmanienne

La cinétique de croissance *in vitro* d'un inoculum parasitaire (10^6 parasite.mL⁻¹, forme promastigote) de chaque souche étudiée a été évaluée durant cinq jours sur un milieu RPMI non renouvelable. En effet, les cultures leishmanienne ont été dénombrées tous les jours à la même heure, et ce, par le comptage des parasites, préalablement fixés en présence de 10% de formol, au microscope photonique à l'aide d'un hématimètre (compte cellule) de Thoma (**voir appendice D**). Puis, La densité parasitaire de chaque souche a été estimée, et enfin, une courbe des concentrations parasitaires a été tracée en fonction du temps, avec notamment la détermination de certains paramètres caractéristiques de la cinétique de croissance étudiée : le taux de croissance parasitaire (μ_{max}) et la concentration parasitaire maximale (C_{max}).

2.5.1.1.3. Test d'évaluation de l'activité inhibitrice

Tout d'abord, tous les produits extractibles de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl. ont été soumis à un criblage initial de l'activité antileishmanienne à une concentration de 250 µg.mL⁻¹. Ensuite, L'effet antileishmanien des produits testés ayant présentés une inhibition de croissance parasitaire supérieure à 95 % a été évalué (à 12,5 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 150 µg.mL⁻¹ et 200 µg.mL⁻¹) en Concentration Inhibitrice qui réduit la croissance parasitaire de 50% (CI_{50}) par rapport au témoin négatif.

Les extraits végétaux à tester ont été préparés, à une concentration de 2,5 mg.mL⁻¹, dans le milieu de culture RPMI (à l'exception de l'extrait brut aqueux qui a été préparé dans l'eau distillée). Cependant, les extraits méthanolique,

MATERIELS ET METHODES

éthéropétrolique et l'huile essentielle ont préalablement été solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration ne dépassant pas 1% au final (168).

La culture parasitaire, ayant atteint la phase de croissance exponentielle, a été centrifugée à une vitesse de 2500 tours/min, le culot contenant les parasites a été repris et resuspendu dans un volume neuf du milieu RPMI, la charge parasitaire a été ensuite estimée et ajustée à raison de 10^6 parasites. mL⁻¹.

Dans des microplaques de 96 puits à fond plat, 90 µL de l'inoculum parasitaire, préparé pour chaque souche, ont été additionnés (10^6 parasites/puits) à 10 µL de chaque extrait déjà déposés après homogénéisation à l'aide du vortex. Un témoin positif a été réalisé avec de l'amphotéricine B ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à la place des extraits. Des puits du témoin négatif ont été également préparés, comprenant 90µL des suspensions parasitaires et 10µl de milieu de culture seul. Le milieu de culture contenant 0,5% et 1% du DMSO, ayant servis à dissoudre les extraits, a ainsi été testé afin d'éliminer tout effet éventuel.

Toutes les mesures ont été faites en quadriplicata et menées sous conditions stériles dans une hotte à flux laminaire. Enfin, les microplaques ainsi réalisées ont été incubées à $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durant 72 h.

Après ce temps, la viabilité parasitaire a été déterminée par numération au bleu de trypan, ce réactif possède la propriété de colorer uniquement les cellules mortes. Le pourcentage d'inhibition de la viabilité du *Leishmania* a ensuite été calculé (pour chaque produit extractible) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (C_0 - C_n) / C_0 \times 100$$

C₀ : concentration parasitaire initiale en parasites/mL

C_n : concentration estimée en parasites/mL

Détermination des Concentrations Inhibitrices médianes (CI₅₀)

Les Concentration Inhibitrice à 50% (CI₅₀) des extraits bioactifs et de l'amphotéricine B (testée sur une gamme de concentration de $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été déterminées en traçant la

courbe de pourcentage d'inhibition parasitaire en fonction du logarithme de chaque concentration de produits actifs testée.

2.5.1.2. Évaluation de l'activité cytotoxique sur les cellules THP-1 différenciées

100 μ L de suspension de cellules humaines monocytaires THP-1 ont été incubés (dans une microplaque à 96 puits) à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹ de milieu RPMI (à 10% de SVF), en présence de 20 ng.mL⁻¹ de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate). Après 24h à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO₂ (**voir appendice E**). Les monocytes adhérents et différenciés en macrophages ont été ré-incubés durant 72 h avec du milieu RPMI frais contenant les extraits à tester (en triplicata) sur une gamme de cinq concentrations de [25, 50, 100, 200 et 250 μ g.mL⁻¹]. Les macrophages incubés dans les puits témoin n'ont pas été exposés aux extraits. La microplaque a été examinée régulièrement au microscope optique à inversion (Gr \times 20 PH) durant la période d'incubation. Le pourcentage de viabilité des cellules exposées aux extraits a été déterminé par rapport au témoin de viabilité.

Enfin, les résultats ont été exprimés en Concentrations Cytotoxiques à 50% d'inhibition cellulaire (CC₅₀).

Des analyses statistiques seront effectuées afin de traiter les résultats expérimentaux obtenus.

2.5.1.3. Analyses chromatographiques par GC/MS

2.5.1.3.1. Analyse de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

Le profil chimique de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. a été identifié par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/SM).

Conditions opératoires

L'analyse a été menée à l'aide d'un chromatographe de type Hewlett Packard, série HP6890, doté d'un injecteur automatique et une colonne apolaire HP- 5 ms (5%

Phenyl 95% dimethylpolysiloxane, de 30m de long, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 μm d'épaisseur), La colonne a été parcourue par de l'hélium comme gaz vecteur avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La température de l'injecteur a été de 250°C. 1 μl de l'huile essentielle, préalablement diluée deux fois dans l'hexane, a été injecté suivant une programmation de température variant de 60°C à 240°C selon un gradient de 2°/min avec 8 min d'isotherme initiale.

Le chromatographe est couplé à un spectromètre de masse de type Agilent technologie, série 7683B utilisant le mode Impact électronique à balayage avec un potentiel d'ionisation de 70eV, et avec une gamme de m/z comprise entre 34 et 550. Un standard externe composé d'un mélange des n-alcane C₉-C₂₈ a été injecté, au même temps que l'huile essentielle, dans les mêmes conditions chromatographiques.

Identification des constituants de l'huile essentielle

Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par le matching de leurs données spectrales avec celles des composés répertoriés dans les bibliothèques électroniques de spectres de masse (WILEY 7^{ème} édition et NIST, 2002). De plus, le calcul des Indices de rétention de Kovats (IK) des spectres cibles, à l'aide de l'analyse du mélange des n-alcane injectée, et leur comparaison avec ceux repérés dans la littérature (Adams, 1995 ; Adams, 2007), ont permis ainsi l'authentification des composants de l'huile essentielle identifiés (169).

L'indice de rétention de Kovats a été calculé comme suit :

$$IR_x = 100n + 100 [(tr)_x - (tr)_n] / [(tr)_{n+1} - (tr)_n] \quad (170)$$

IR_x : indice de rétention de Kovats du composé x ;

(tr)_x : temps de rétention correspondant au composé x ;

(tr)_n : temps de rétention correspondant à l'alcane (possédant **n** atome de carbone) élué avant le composé x ;

(tr)_{n+1} : temps de rétention correspondant à l'alcane (possédant **n+1** atome de carbone) élué après le composé x.

2.5.1.3.2. Dérivation par estérification de l'extrait bioactif

Avant de procéder à l'analyse par GC/MS, l'extrait ayant présenté un effet antiparasitaire a été soumis à une dérivation chimique par réaction d'estérification selon la méthode décrite par STEFANOUDAKI et al. (1999)(171), qui consiste à remplacer un hydrogène plus ou moins mobile sur un groupement acide carboxylique par un radical alkyl (**figure 2.16**) (172).

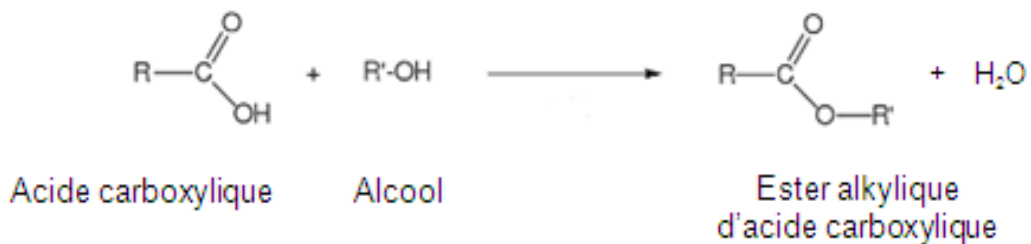


Figure 2.16 : Réaction d'estérification (173).

Une prise d'essai de 25 mg d'extrait dissoute dans 5 mL d'hexane a été introduite dans un tube à essai avec 0,5 mL de la solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2N), et laissés réagir 15 min à $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.5.1.3.3. Caractérisation des composés majoritaires de l'extrait bioactif estérifié

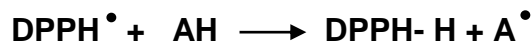
L'analyse de l'extrait prétraité a été exécutée sur un appareil de GC/MS identique à celui qui a été utilisé pour l'analyse de l'huile essentielle. Toutefois, la température de l'injecteur a été de 280°C . 1 μL de l'extrait estérifié a été injecté en mode split (1:20), avec un débit de l'hélium de $1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, selon la programmation suivante : une isotherme initiale de 8min à 70°C , puis de 70°C à 220°C à raison de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, tenue isotherme pendant 15min, ensuite de 220°C à 300°C à raison de $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, et enfin une dernière isotherme de 1min à 300°C . Le logiciel d'acquisition des données spectrales a été de type ChemStation Agilent.

WILEY et NIST ont été utilisés afin d'identifier les composés majoritaires de l'extrait analysé (168).

2.5.2. Criblage *in vitro* de l'activité antioxydante par le test de réduction du DPPH

2.5.2.1. Test d'évaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des extraits bruts et de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. a été déterminé *in vitro* selon la méthode de BRAND-WILLIAMS et al. (1995) qui été modifiée par ZHANG et al. (2009) (174,175). Cette méthode est fondée sur l'évaluation de la capacité antiradicalaire par piégeage de radicaux libres à l'aide de 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), qui est un radical libre très stable à l'état solide et en solution, possédant un électron délocalisé et non apparié. Le DPPH est caractérisé par une coloration violette, toutefois il devient jaune en perdant l'état radicalaire sous l'effet d'un antioxydant qui piège notamment l'électron libre en libérant un hydrogène au profit du DPPH. Ainsi, l'efficacité de l'antioxydant est exprimée en pourcentage d'inhibition de DPPH.



Le test du pouvoir antioxydant a été réalisé sur microplaque à 96 puits à l'aide d'un lecteur de microplaque (de marque BIO RAD, PR 3100 TSC).

La linéarité du DPPH a été vérifiée, en premier lieu, en réalisant une courbe de calibration pour un éventail de concentration allant de 1,562 μM jusqu'à 200 μM .

En second lieu, un volume de 100 μL de la solution méthanolique de DPPH, à 78,864 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (200 μM), ont été déposés dans les puits contenant un volume équivalent en échantillons à évaluer sur une gamme de concentration (préparée selon une série de dilution au demi dans le méthanol) de [3,906 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] pour les extraits bruts (aqueux, méthanolique et éthéropétrolique), et de [31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] pour l'huile essentielle. Puis, deux blancs ont été préparés, un blanc d'échantillon pour chaque concentration (100 μL de méthanol à la place du DPPH), et un blanc solvant (200 μL de méthanol).

De plus, le DPPH a été introduit (à raison de 100 μL) dans les puits correspondant aux témoins positifs, contenant respectivement 100 μL de la vitamine C et de la quercétine diluées de moitié dans du méthanol à des concentrations allant de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ jusqu'à 0,781 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de même qu'aux puits relatifs au témoin négatif, contenant au départ 100 μL de méthanol.

Chaque puits a notamment été réalisé en triplicata. Les microplaques ont ensuite été recouvertes puis laissées à incuber pendant 40 min à une température ambiante. Cependant, le pourcentage d'inhibition du DPPH pour chaque concentration d'échantillon traité a été calculé, par mesure d'absorbance à 550 nm, selon la formule suivante (176) :

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \frac{100 \times [\text{Abs (Echantillon + DPPH)} - \text{Abs (Blanc échantillon)}]}{[\text{Abs (DPPH)} - \text{Abs (Solvant)}]}$$

Enfin, le tracé du graphe, représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction du logarithme de différentes concentrations, a permis d'estimer la CI_{50} des échantillons testés, qui correspond à la Concentration Inhibitrice de 50% du DPPH.

2.5.2.2. Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques totaux

Une analyse de corrélation a été effectuée afin d'examiner, au moyen du coefficient de corrélation (r), le lien existant entre la teneur en composés polyphénoliques totaux et le potentiel antioxydant des extraits bruts testés.

Les seuils du coefficient de corrélation (r) sont regroupés en quatre catégories possibles (177) :

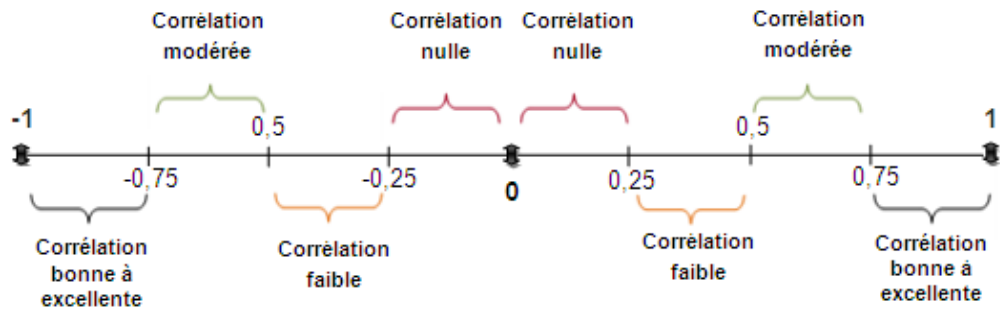


Figure 2.17 : Seuils du coefficient de corrélation déterminant le lien corrélationnel.

Des analyses statistiques seront effectuées afin de traiter les résultats expérimentaux obtenus.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Détermination de la teneur en eau et du rendement d'extraction

La teneur en eau obtenue de la poudre végétale, séchée et finement broyée, a été exprimée en moyenne de pourcentage \pm Standard Erreur de la Moyenne (SEM).

$$\text{Teneur en eau (\%)} = 9,29 \pm 0,25 \% < \text{à } 10\%$$

Les taux de rendement en produits extractibles de *Fraxinus angustifolia* Vahl. obtenus ainsi que leurs caractéristiques sont rapportés au **tableau** suivant :

Tableau 3. 4 : Rendement en produits extractibles et leurs caractéristiques.

Produits extractibles	Type d'extraction	Rendement (%)*	Caractéristiques (couleur / consistance)
Extrait aqueux	Décoction	43,03 \pm 0,9	brun /poudreuse
Extrait méthanolique	Soxhlet	33,82 \pm 0,62	Vert sombre/pâteuse
Extrait éthéropétrolique	Soxhlet	03,16 \pm 0,06	Vert sombre/pâteuse gluante
Huile essentielle	Hydrodistillation	0,03 \pm 0,005	Jaune verdâtre/très visqueuse

* pourcentage exprimé en moyenne \pm Standard Erreur de la Moyenne.

Les rendements d'extraction représentés sur la figure 3.18 ont été analysés statistiquement au moyen du logiciel IBM SPSS v. 20. Leur comparaison par l'analyse de variance (ANOVA) à une voie, suivie du test post-hoc de Tukey (avec un degré de significativité P = 0,05%), a montré une différence statistique extrêmement significative (P < 0,001). Le meilleur rendement a été obtenu avec le décocté aqueux.

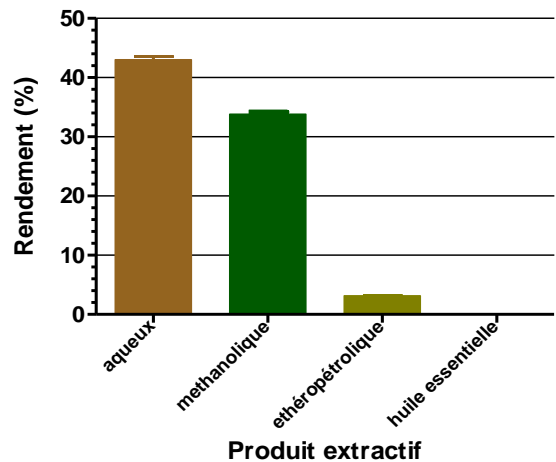


Figure 3.18 : Représentation des rendements d'extraction.

En ce qui concerne les extraits obtenus par soxhlet, une différence notable a été observée, le rendement de l'extrait méthanolique étant statistiquement plus élevé que celui de l'extrait éthéropétrolique. Pour ce qui est de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl., elle a été obtenue avec un rendement faible de l'ordre de 0,03%.

3.2. Criblage phytochimique préliminaire des extraits bruts

Les résultats obtenus lors du criblage phytochimique des extraits bruts de *Fraxinus angustifolia* Vahl. sont indiqués dans le **tableau 3.5**.

Tableau 3.5 : Résultats du criblage phytochimique préliminaire des extraits bruts.

Tests phytochimiques	Observations obtenues	[1]	[2]	[3]
Tanins				
- Test au chlorure ferrique	- Formation d'un précipité brun verdâtre.	+	+	+
Flavonoïdes				
- Test de shinoda	- Apparition d'une coloration rouge ; - Aucune coloration.			
- Test à hydroxyde de sodium	- Disparition de la coloration jaune; - La coloration jaune n'a subi aucun changement.	+	+	-
Alcaloïdes				
- Test de Dragendorff	- Aucun précipité n'a été obtenu.	-	-	-
- Test de Hager	- Aucun précipité n'a été obtenu.			
Saponosides				
- Test de mousse	- Formation d'une mousse persistante ; - Aucune mousse n'a été obtenue.	+	+	-
Glycosides cardiotoniques				
- Test de Keller-Kiliani	- Apparition d'une coloration bleu-vert de la phase acétique.	+	+	+
Composés réducteurs				
- Test de Fehling	- Formation d'un précipité rouge brique (orangé).	+	+	+
Mucilages				
- Test de mucilage	- formation d'un précipité blanchâtre et floconneux.	+	/	/

[1] : extrait aqueux, [2] : extrait méthanolique, [3] : extrait éthéropétrolique, + : réaction positive, - : réaction négative.

D'après nos résultats, les extraits bruts ayant fait l'objet de cette estimation qualitative préliminaire, ont décelé la présence de différents constituants bioactifs. A l'inverse, des alcaloïdes qui n'ont pu être caractérisés, les tanins, les glycosides cardiotoniques et les composés réducteurs ont été détectés dans l'ensemble des extraits testés. Les flavonoïdes et les saponosides ont toutefois été mis en évidence seulement dans les extraits aqueux et méthanolique. Enfin, ce criblage a révélé également la présence de mucilages dans l'extrait brut aqueux exclusivement testé.

3.3. Détermination de la teneur en composés polyphénoliques totaux

Les teneurs en composés polyphénols totaux des extraits bruts de *Fraxinus angustifolia* Vahl. ont été déterminées à l'aide de l'équation de la courbe d'étalonnage linéaire tracée avec de l'acide gallique comme référence (figure 3.19) (178). Les teneurs obtenues ont été exprimées en milligramme d'équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait) (figure 3.20).

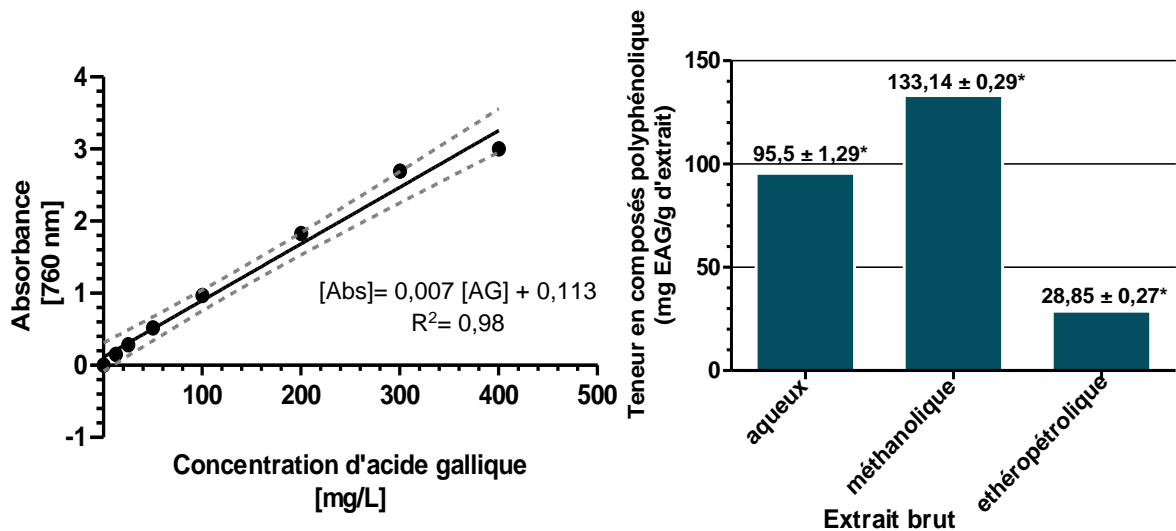


Figure 3.19 : Représentation graphique de la courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique.

* valeurs exprimées en moyenne ± Standard Erreur de la Moyenne (SEM).

Figure 3.20 : Représentation graphique des teneurs en composés polyphénoliques obtenues pour les extraits bruts de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

La signification statistique des différences observées a été évaluée au moyen du test *t* de Student (au seuil de risque $\alpha = 0,05$). Sur la base des résultats obtenus, la teneur en composés polyphénoliques a varié d'une manière extrêmement significative ($P < 0,001$) d'un extrait brut à un autre. De fait, le dosage de ces composés a révélé une teneur significativement plus élevée dans l'extrait brut méthanolique, qui a été évaluée à $133,14 \pm 0,29$ mg EAG/g, que celle de l'extrait aqueux estimée à $95,5 \pm 1,29$ mg EAG/g, cependant, l'extrait éthéropétrolique avec une teneur de $28,85 \pm 0,27$ mg EAG/g s'est montré significativement le moins riche en ces composés.

3.4. Discussion

Une drogue végétale correctement séchée devrait contenir une teneur en eau inférieure à 10% afin d'assurer sa stabilisation et de limiter tout développement microbien. (179, 180). De plus, l'excès de cette teneur diminue la diffusivité du solvant en affectant ainsi le processus de transfert de masse lors de l'extraction entre les deux phases liquide-solide (solvant - poudre végétale). Toutefois, une faible humidité est souvent souhaitable, une dessiccation trop poussée pouvant altérer les constituants bioactifs (1,181).

Les résultats des rendements obtenus en extraits bruts aqueux et méthanolique ne se rapprochent pas de ceux déjà rapportés dans les travaux précédents avec l'utilisation d'autres méthodes d'extraction, en effet, les travaux de FALE et al. 2013 ont montré que l'infusé des feuilles a présenté un rendement de 9,85% étant nettement plus inférieur que celui obtenu dans la présente étude. De plus, les travaux réalisés par AYOUNI et al., 2016 ainsi que les travaux de BERBOUCHA et al., 2009 ont rapporté des rendements de macérats alcooliques estimés respectivement à 19.84 % et 12.72% montrant ainsi un faible taux comparé à l'extrait méthanolique obtenu au cours de cette étude (48, 182, 183).

Cependant, il est à mentionner qu'aucune étude n'a pu être relevée dans la littérature scientifique portant sur l'extrait éthéropétrolique ainsi que sur l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

RESULTATS ET DISCUSSION

En effet, les rendements en huile essentielle, chez les plantes, sont généralement compris entre 0,005 et 10% (184), le rendement obtenu pour *Fraxinus angustifolia* Vahl. (0,03%) est faible comparé à celui obtenu à partir des graines de l'espèce du même genre *Fraxinus dimorpha* Coss. et Dur qui est de 1.15% à 1.42% (185).

Enfin, l'ensemble de ces résultats suggère que le rendement d'extraction dépend de nombreux facteurs comprenant notamment : la nature du solvant (polaire, peu polaire ou apolaire), la méthode d'extraction et la matrice végétale étudiée.

Les résultats obtenus, lors du dosage colorimétrique des composés polyphénoliques dans les extraits bruts de *Fraxinus angustifolia* Vahl., ont été évalués selon le classement retenu par MAISUTHISAKUL et al, qui a permis notamment de définir une échelle fondées sur le contenu en composés phénoliques totaux dans les extraits végétaux (186). Dans ladite échelle la teneur en polyphénols peut être répartie en trois catégories :

- faible pour une teneur inférieure à 10 mg EAG/g d'extrait ;
- modéré pour une teneur comprise entre 10 et 20 mg EAG/g d'extrait ;
- élevé pour une teneur supérieure à 40 mg EAG/g d'extrait.

De ce fait, les extraits bruts méthanolique et aqueux ont présenté une teneur élevée en composés polyphénoliques, tandis que la teneur contenue dans l'extrait éthéropétrolique a été jugée modérée.

Cependant, la comparaison statistique a montré précédemment une différence hautement significative entre ces trois extraits bruts issus notamment de la même drogue végétale d'une même plante par le biais de différents solvants (polaire et apolaire), ceci pourrait indiquer que cette plante renferme principalement des composés phénoliques de nature polaires. Ces résultats sont cohérents avec ceux des travaux d'AYOUNI et al. (2016) constatant que cette même espèce contient une quantité appréciable de composés phénoliques polaires et moyennement polaires. Cela signifie que devant la multitude de facteurs influant cette variabilité de la teneur obtenue en composés phénoliques, la solubilité différentielle de ces derniers, régie par le degré d'affinité entre leur nature chimique et la polarité du solvant extracteur (187), semble être le facteur dominant.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'estimation des teneurs en composés phénoliques obtenue ne s'éloigne pas des résultats des études antérieures sur le *F. angustifolia* Vahl., les travaux d'AYOUNI et al. (2016) (cités précédemment) et de MEDJAHED et al. portant sur l'extrait brut ethanologique des feuilles ont montré une teneur en polyphénols totaux estimée respectivement à 96.12 ± 4.30 mg EC/mg et 194.05 ± 14.08 mg EC/g, toutefois, cette comparaison reste non significative compte tenu du fait que la teneur en composés polyphénoliques a été exprimée en fonction de différent phénol de référence.

Enfin, le dosage colorimétrique par le réactif du Folin - Ciocalteu ne permet pas de fournir une quantification des composés polyphénoliques absolue mais plutôt une estimation globale au vu de nombreuses interférences, dues à la non spécificité de ce réactif, qui sont en effet susceptibles de surgir lors du dosage (167).

3.5. Résultats du criblage biologique de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

3.5.1. Criblage *in vitro* de l'activité antiparasitaire des produits extractibles

3.5.1.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la croissance des leishmanies

3.5.1.1.1. Résultats de la cinétique de croissance leishmanienne

Le suivi de la cinétique de croissance des cinq souches parasitaires étudiées, a permis de tracer les courbes d'évolution *in vitro* de leur concentration en fonction du temps, ainsi d'identifier leurs phases et taux de croissance (**figure 3.21**).

Les paramètres estimés au cours de la cinétique de croissance parasitaire sont résumés dans le **tableau** ci-dessous, Le taux de croissance maximal (μ_{max}) de chaque souche a été déterminé en calculant la pente (dC /dt) de la phase de croissance exponentielle après son ajustement linéaire par le tracé de :

$$\ln(C_{parasitaire}) = f(t).$$

Tableau 3.6 : Paramètres caractéristiques estimés de la cinétique de croissance des cinq souches leishmanienne.

Souches	Taux de croissance (μ_{max})*	Concentration maximale (C_{max})	Coefficient de détermination (R^2)
LIPA 100	$0,032 \pm 0,01h^{-1}$	$6,48 \times 10^6$ parasite.mL ⁻¹	0,98
LIPA 32/06	$0,04 \pm 0,02h^{-1}$	$4,08 \times 10^6$ parasite.mL ⁻¹	0,98
LDD8	$0,11 \pm 0,006h^{-1}$	$18,08 \times 10^6$ parasite.mL ⁻¹	0,99
LEM 5285	$0,11 \pm 0,003h^{-1}$	$17,92 \times 10^6$ parasite.mL ⁻¹	0,99
LIPA 281	$0,07 \pm 0,01h^{-1}$	$8,16 \times 10^6$ parasite.mL ⁻¹	0,99

*Taux de croissance (μ_{max}) exprimé en moyenne \pm Standard Erreur de la Moyenne (SEM).

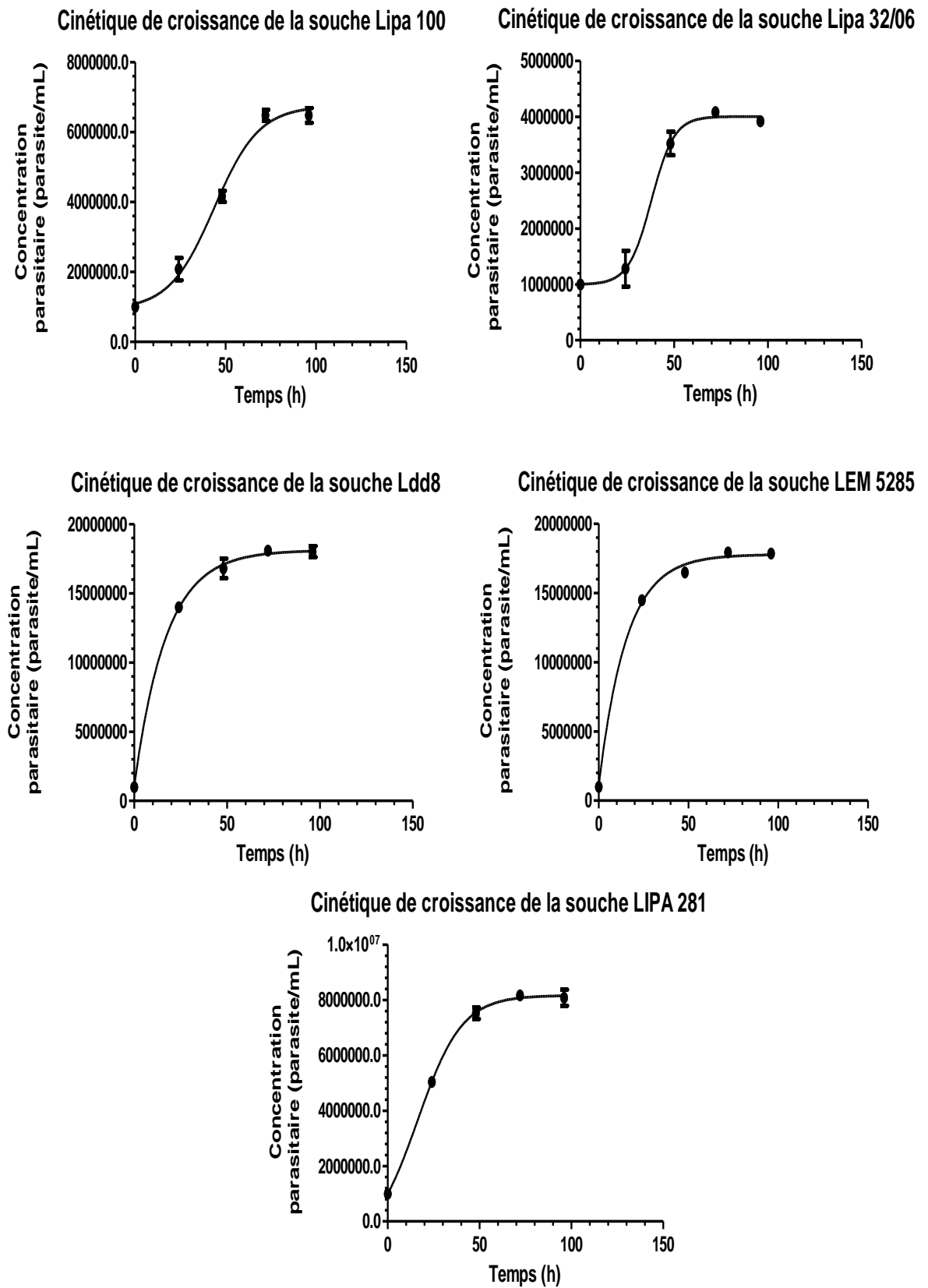


Figure 3.21 : Représentations graphiques de l'évolution de la cinétique de croissance des cinq souches leishmaniennes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de la cinétique de croissance leishmanienne ont été analysés au moyen du logiciel IBM SPSS v. 20, les comparaisons entre les différents taux de croissance parasites ont été réalisés par l'analyse de variance (ANOVA) à une voie, suivi du test post-hoc de Tukey (en fixant le seuil α à 0,05 pour l'ensemble des comparaisons).

Les courbes de cinétique obtenues ont présenté notamment des profils assez différents (**figure 3.21**). Celles des deux souches LIPA 100 et LIPA 32/06, dont l'allure est sigmoïdale, ont fait apparaître trois phases de croissance principales : la phase de latence très réduite étant la première, s'ensuit une phase de croissance exponentielle correspondant à une phase de prolifération intense et enfin une phase de croissance stationnaire en plateau. En effet, L'estimation du taux de croissance au cours de la phase exponentielle n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les deux souches ($P=0,940$).

Par ailleurs, les courbes exponentielles obtenues des trois souches LDD8, LEM 5285 et LIPA 281 ont été caractérisées par une cinétique principalement biphasique réparties sur une phase de croissance exponentielle où la prolifération parasite a été déclenchée sans phase de latence et ainsi sur une phase de croissance stationnaire.

Des différences significatives ont toutefois été relevées entre l'ensemble des paramètres de la cinétique de croissance obtenus pour chaque souches étudiées, tant au niveau du taux de croissance parasite qu'au niveau de la concentration maximale. En effet, Les souches leishmaniennes LDD8 et LEM 5285, ayant un taux de croissance équivalent, ont présenté une prolifération cellulaire plus intense que la souche LIPA 281 ($P = 0,01$), LIPA 100 ($P=0,001$) et LIPA 32/06 ($P=0,001$) pour atteindre une concentration parasite maximale significativement supérieure. Néanmoins, la concentration maximale étant atteinte en phase stationnaire a différé très significativement ($P=0,001$) d'une souche à une autre.

Les représentations graphiques de la cinétique de croissance ont servi à **déterminer le temps de récolte** des Leishmanies en **phase exponentielle** de croissance.

Tableau 3.7 : Temps de récolte des promastigotes en phase exponentielle.

Souches (promastigotes)	Temps de récolte
LIPA 100	48h
LIPA 32/06	48h
LDD8	24h
LEM 5285	24h
LIPA 281	24h

3.5.1.1.2. Résultats du test d'évaluation de l'activité inhibitrice

L'effet inhibiteur de chaque produit extractible testé sur les différentes souches leishmaniennes a été déterminé et comparé par rapport au témoin négatif. Toutefois le criblage parasitaire de l'huile essentielle n'ayant porté que sur trois souches leishmaniennes : **LIPA 100, LDD8 et LEM 5285**.

Les résultats obtenus exprimés en pourcentage d'inhibition du taux de croissance leishmanienne (moyenne de pourcentage \pm Standard Erreur de la Moyenne), sont récapitulés dans le **tableau 3.8** et présentés sous forme d'histogramme à la **figure 3.22**.

Tableau 3.8 : Résultats préliminaires du criblage antileishmanien *in vitro* des produits extractibles de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl.

	LIPA 100	LIPA 32/06	LDD8	LEM 5285	LIPA 281
(Aq)	30,01 \pm 3,9%	2,7 \pm 0,08%	29,47 \pm 0,47%	30,7 \pm 0,23%	-1,57 \pm 0,84%
(MeOH)	32,97 \pm 6,02%	-8,82 \pm 2,84%	23,63 \pm 0,43%	43,26 \pm 0,49%	-8,16 \pm 1,41%
(Ethp)	95,06\pm1,42%	100%	100%	100%	96,30\pm0,52%
HE	100%	Nd	100%	100%	Nd
DMSO	0%	18,04 \pm 1,44%	0,54 \pm 0,01%	0%	4,39 \pm 1,41%
T₀	0%	0%	0%	0%	0%
AmB	100%	100%	100%	100%	100%

(Aq) : extrait aqueux ; **(MeOH)** : Extrait méthanolique ; **(Ethp)** : Extrait éthéropétrolique ; **HE** : Huile essentielle ; **DMSO** : Diméthylsulfoxyde ; **T₀** : Témoin négatif ; **AmB** : Amphotéricine B (témoin positif). Nd : Non déterminé.

RESULTATS ET DISCUSSION

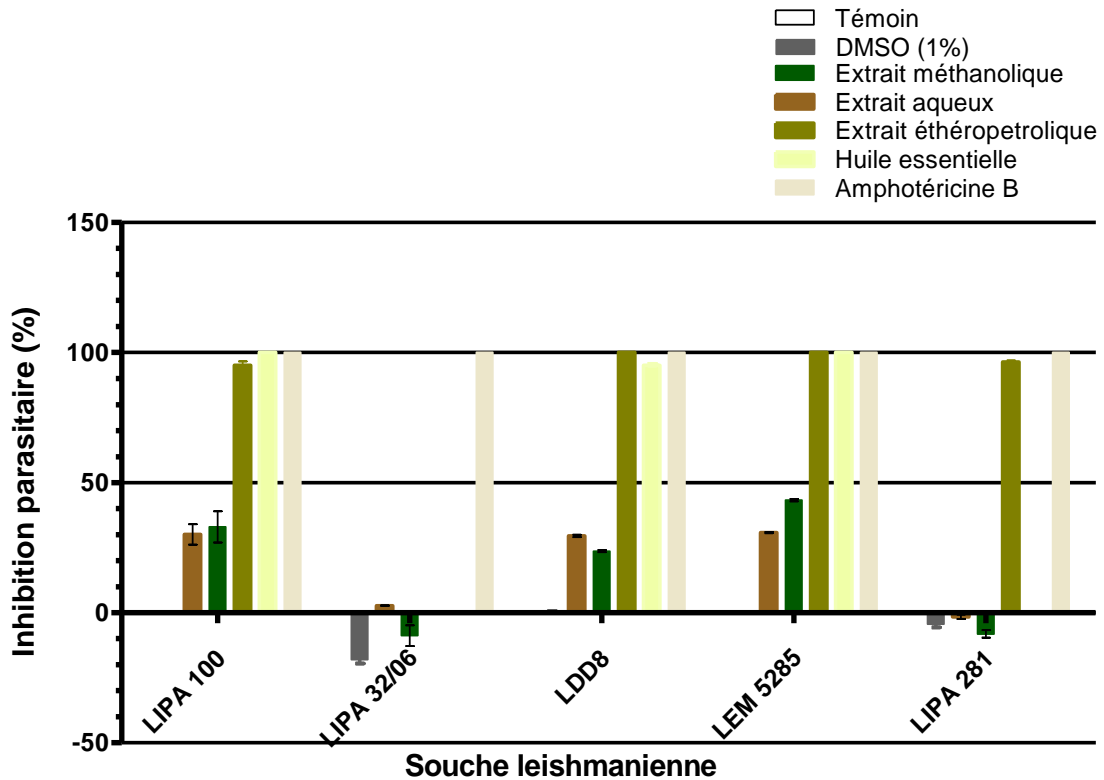


Figure 3.22 : Histogramme montrant l'effet inhibiteur des produits extractibles de *Fraxinus angustifolia* Vahl. sur les souches leishmaniennes testées.

Ces résultats préliminaires ont montré de différents taux d'inhibition de croissance parasitaire. L'effet inhibiteur des extraits bruts aqueux et méthanolique a varié en fonction des souches leishmaniennes, d'une part, ils ont montré un effet inhibiteur extrêmement significatif (comparé au témoin négatif, $p < 0,001$) vis-à-vis des trois souches LIPA 100, LDD8 et LEM 5285, qui reste néanmoins inférieur à 50% d'inhibition ($p < 0,01$). D'autre part, ils n'ont montré aucun effet inhibiteur statistiquement significatif de la survie des souches LIPA 32/06 et LIPA 281 ($p > 0,05$).

Par ailleurs, l'extrait éthéropétrolique ainsi que l'huile essentielle ont démontré un effet sans équivoque extrêmement significatif ($p < 0,001$) en inhibant, sans différence comparés à l'amphotéricine B, la croissance parasitaire de l'ensemble des souches testées.

Le pourcentage maximal du DMSO testé à 1% s'est avéré exempt de toute activité antileishmanienne, et qui par conséquent a éliminé l'effet de son action.

Détermination de l'CI₅₀

À la lumière des résultats obtenus lors du criblage préliminaire, il a été proposé, dans un second lieu, d'évaluer la Concentration Inhibitrice médiane (CI₅₀) de l'**extrait éthéropétrolique** et de l'**huile essentielle** qui ont présenté le **meilleur potentiel antileishmanien**. Les valeurs de CI₅₀ présentées ci-dessous (**tableau 3.9**) ont été déterminées graphiquement par le logiciel GraphPad Prism[®], à partir des courbes de pourcentages d'inhibition de croissance parasitaire en fonction du logarithme de la concentration testée (**figures 3.23 et 3.24**). Ces représentations graphiques ont également permis de mettre en exergue une inhibition avec effet dose-dépendant sur la croissance leishmanienne.

Tableau 3.9 : Valeurs des concentrations inhibitrices CI₅₀ des produits bioactifs testés sur les souches leishmaniennes étudiées.

Souches parasitaires	Extrait éthéropétrolique		Huile essentielle	
	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)*	R ²	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)*	R ²
LIPA 100	110,2±3,9	0,92	52,49±10,7	0,99
LIPA 32/06	103,5±5,5	0,98	Nd	Nd
LDD8	77,4±12,6	0,99	96,78± 3,22	0,99
LEM 5285	119,6±2	0,99	82,59±14,26	0,98
LIPA 281	91,6±3,4	0,99	Nd	Nd

* CI₅₀ exprimé en moyenne ± Standard Erreur de la Moyenne (SEM), Nd: Non déterminée.

Les comparaisons statistiques de l'inhibition parasitaire exercée par ces deux produits extractibles ont été effectuées par le test *t* de Student au seuil de risque de 5%. En effet, Les valeurs de CI₅₀ de l'huile essentielle déterminées pour les souches LIPA 100 et LEM 5285 ont fait preuve d'un effet inhibiteur significativement supérieur à celui obtenu par l'extrait éthéropétrolique (P=0,001 et P=0,04 pour LIPA 100 et LEM 5285 respectivement). En revanche, en comparant les CI₅₀ correspondant aux deux produits testés sur la souche LDD8, aucune différence significative d'effet n'a été constatée. Les souches LIPA 100 (avec CI₅₀ =52,49 µg.mL⁻¹), LDD8 (avec CI₅₀ de l'extrait éthéropétrolique = 77,4 µg.mL⁻¹) et LEM 5285 (avec CI₅₀ de l'huile essentielle = 82,59 µg.mL⁻¹) se sont avérées

RESULTATS ET DISCUSSION

significativement les plus sensibles. Il est toutefois important de rappeler qu'au cours de cette étude, le criblage parasitaire de l'huile essentielle n'a pas pu être effectué sur les souches LIPA 32/06 et LIPA 281.

Les CI_{50} du témoin positif (amphotéricine B) ont été estimées inférieures à $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ sur les cinq (05) souches testées (**voir appendice. J**).

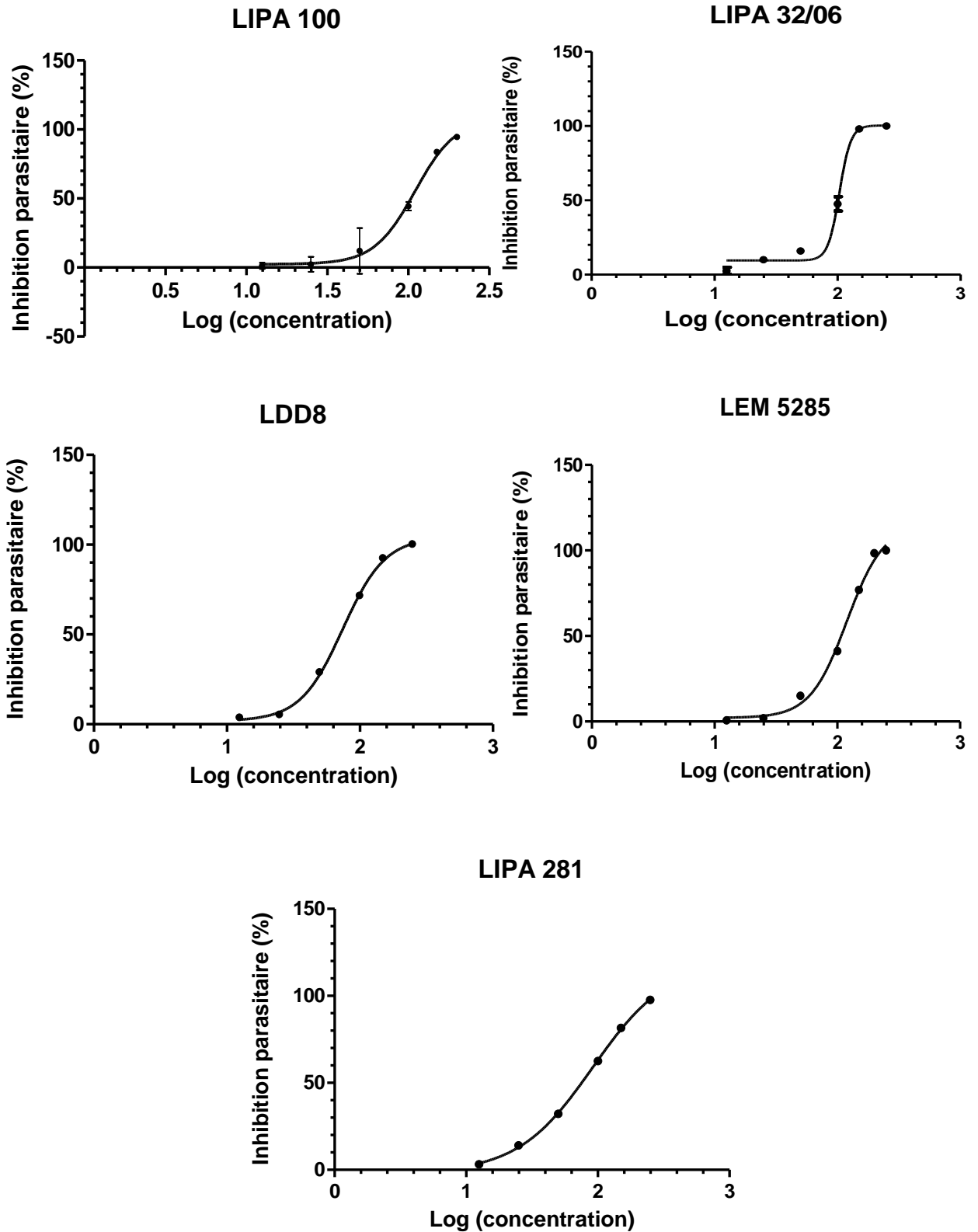


Figure 3.23 : Représentations graphiques du pourcentage d'inhibition parasitaire des souches étudiées en fonction de la concentration de l'extrait éthéropétrolique testées.

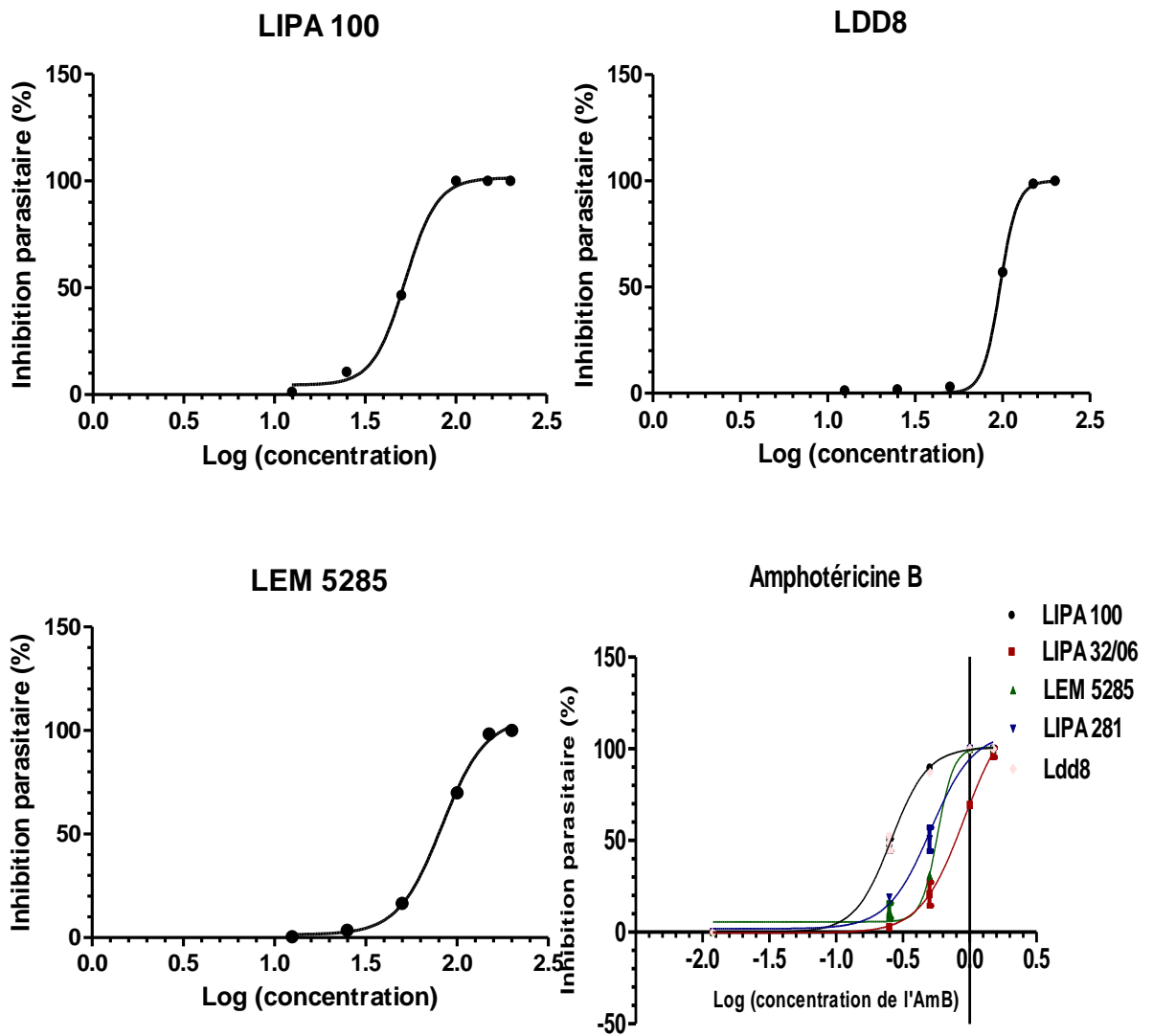
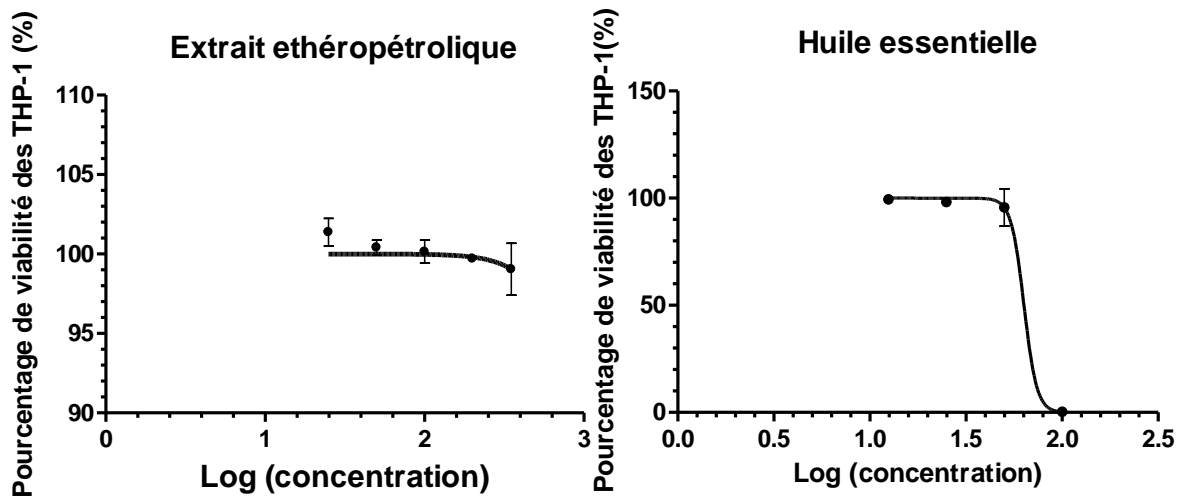


Figure 3.24 : Représentations graphiques du pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et l'Amphotéricine B sur les souches étudiées en fonction de la concentration testée.

3.5.1.2. Test de l'activité cytotoxique sur les cellules THP-1

La mise en évidence de l'activité cytotoxique de l'huile essentielle et l'extrait éthéropétrolique de *Fraxinus angustifolia* Vahl. sur les cellules THP 1 a été évaluée afin d'assurer la sélectivité de l'activité antileishmanienne.

L'analyse des résultats obtenus lors du test ont permis de tracer les courbes de survie cellulaire exprimée en pourcentages de viabilité des THP-1 en fonction de la concentration testée (figure 3.25), utilisées ainsi pour déterminer graphiquement (à l'aide du logiciel GraphPad Prism®) la Concentration Cytotoxique diminuant la viabilité cellulaire de 50% par rapport au témoin négatif (CC₅₀). Le tableau 3.10 reporte les valeurs de CC₅₀ obtenues.



Les barres d'erreurs représentent la SEM.

Figure 3.25 : Représentations graphiques de l'effet cytotoxique de l'extrait éthéropétrolique et l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. testés sur la lignée cellulaire THP 1.

Tableau 3.10 : Valeurs des concentrations Cytotoxiques CC₅₀ des produits bioactifs testés sur la lignée cellulaire THP 1.

Produits extractibles testés	CC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	R ²
Extrait éthéropétrolique	>250	Nd
Huile essentielle	63,4±1,6*	0,98

*CC₅₀ exprimée en moyenne ± Standard Erreur de la Moyenne (SEM), Nd : Non déterminé

RESULTATS ET DISCUSSION

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il est apparu que l'extrait éthéropétrolique n'a présenté aucun effet cytotoxique (environ 99,05% de survie cellulaire comparé à 100% de celle du témoin négatif) à l'égard de la lignée cellulaire THP-1 à la concentration maximale testée (250 µg.ml⁻¹) et ceci a bien été confirmé par l'analyse statistique réalisée au moyen du test *t* de Student ($P = 0,07$). La survie médiane de l'extrait éthéropétrolique n'a malencontreusement pas pu être déterminée lors de cette étude, néanmoins, sa CC_{50} a été estimée supérieure à 250 µg.ml⁻¹.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'huile essentielle, une diminution de la survie cellulaire des THP-1 a été observée au delà de 50 µg.mL⁻¹, ainsi, un effet cytotoxique statistiquement significatif (exprimé par un pourcentage de viabilité de 0,26% comparé au témoin négatif, $P < 0,001$) a été enregistré à 100 µg.ml⁻¹.

Enfin, pour chaque produit bioactif testé un Indice de Sélectivité (IS), qui est égal au rapport de la valeur de la CC_{50} de la cytotoxicité estimée divisée par celle de l'activité antileishmanienne (CI_{50}) ($IS = [CC_{50} / CI_{50}]$), a été évalué et présenté dans le **tableau** récapitulatif ci-dessous.

Tableau 3.11 : Récapitulatif des résultats du criblage antileishmanien.

Souches parasitaires	Extrait éthéropétrolique			Huile essentielle		
	CI_{50}^1	CC_{50}^2	IS^3	CI_{50}^1	CC_{50}^2	IS^3
LIPA 100	110,2±3,9		> 2,27	52,49±10,7		1,2
LIPA 32/06	103,5±5,5	>250	> 2,41	Nd	63,4±1,6	Nd
LDD8	74,2±12,6		> 3,37	96,78±3,22		0,65
LEM 5285	119,6±2		> 2,09	82,59±14,26		0,77
LIPA 281	91,6±3,4		> 2,73	Nd		Nd

¹Concentration Inhibitrice médiane (en µg.mL⁻¹) ; ²Concentration Cytotoxique médiane (en µg.mL⁻¹) ; ³ Indice de Sélectivité. Nd : Non déterminé.

Les résultats décrits ci-dessus ont montré que l'huile essentielle a présenté un Indice de Sélectivité supérieur à 1 seulement contre la souche LIPA 100, elle a exhibé un effet sélectif statistiquement différent (déterminé à l'aide du test *t* de Student avec un risque $\alpha = 0,05$, $P < 0,003$) vis-à-vis des trois souches testées. Quant à l'extrait éthéropétrolique, il semble avoir un indice de sélectivité plus important sur l'ensemble des souches parasitaires.

3.5.1.3. Résultats des analyses chromatographiques par GC/MS

3.5.1.3.1. Analyse de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

L'analyse GC/MS du profil chimique de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. a mis en évidence la présence de plus de 109 constituants, parmi ceux-ci 23 composés, énumérés au **tableau 3.12** selon leur ordre d'élution sur colonne, ont pu être identifiés sans ambiguïté (chromatogramme montré en **appendice J**).

Tableau 3.12 : Composés identifiés par GC /MS dans l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

n ^o	Composés	Tr (min) ⁽¹⁾	IK ⁽²⁾	Abondance (%)
1	α -Pinène	5,6	926	0,007
2	Limonène	10,36	1024	0,007
3	Cis-Linalooloxyde	13,26	1069	0,03
4	Trans-Linalooloxyde	14,32	1086	0,027
5	Nonanal	15,51	1104	0,04
7	Décanal	22,50	1205	0,034
8	Décénal (E)	26,24	1261	0,033
9	Acide nonanoïque	27,53	1280	0,057
10	Décadienal (E.Z)	27,94	1286	0,045
11	β -Damascenone	34,04	1380	0,113
12	α -Ionone	36,29	1415	0,118
13	Geranyl acetone	38,52	1452	0,118
14	β -Ionone	40,28	1481	0,227
15	α -Muuroène	41,03	1493	0,046
16	Acide dodécanoïque	45,73	1573	0,4
17	α -Cadinol	49,06	1633	0,126
18	Cyclotétradécane	54,42	1733	0,044
19	α -Hexylcinnamaldehyde	54,82	1741	0,172
20	Benzoate de Benzyle	55,32	1750	0,09
21	Acide tétradécanoïque	56,56	1774	2,53
22	Hexahydroxyfarnesyl acetone (phytone)	60,12	1844	0,841
23	Acide hexadécanoïque	67,41	1996	42,84
24	Octadécatrienol	74,79	2161	18,23

⁽¹⁾ Temps de rétention exprimé en minute, ⁽²⁾ Indice de Kovats.

Ces composés représentent près de 66,21% de la composition globale de l'huile essentielle étudiée.

Plusieurs molécules n'ont pu être identifiées avec certitude, quand le Temps de rétention (Tr) et l'Indice de Kovats (IK) ne concordent pas avec les données des bases bibliographiques (Adams, 1995 et Adams 2007) (**voir appendice L**).

3.5.1.3.2. Analyse chromatographique de l'extrait éthéropétrolique

La dérivation par estérification de l'extrait éthéropétrolique a permis de faciliter l'analyse GC/MS de ses constituants non volatils qui ne peuvent être directement analysés (composés à point d'ébullition trop élevé, composés possédant une forte

RESULTATS ET DISCUSSION

polarité ou autres), les dérivés obtenus après cette réaction sont plus volatils et moins polaires que les constituants de départ (157,173). Les principaux composés identifiés de l'extrait éthéropétrolique sont reportés (chromatogramme montré en **appendice K**), selon leur ordre d'élution sur colonne, dans le **tableau** ci-dessous.

Tableau 3.13 : Principaux composés identifiés de l'extrait éthéropétrolique estérifié.

n ^o	Composés	Tr ^(*) (min)	Non commun	Abondance (%)
1	Acide dodécanoïque, méthyl ester	18,07	Ester méthylique de l'acide laurique	0,65%
2	Acide 9,12- octadecadiénoïque, méthyl ester	22,33	Ester méthylique de l'acide linoléique	6,62%
3	Acide 9, 12,15- octadécatriénoïque, méthyl ester	22,46	Ester méthylique de l'acide α-linolénique	46,16%
4	Acide octadécanoïque, méthyl ester	22,78	Ester méthylique de l'acide stéarique	3,80%
7	Acide eicosanoïque, méthyl ester	27,13	Ester méthylique de l'acide arachidique	1,03%
5	Acide docozanoïque, méthyl ester	35,04	Ester méthylique de l'acide béhénique	1,54%
6	Acide tétracosanoïque, méthyl ester	42,63	Ester méthylique de l'acide lignocérique	2,80%
8	(E)2,6,10,15,19,23-Hexaméthyl-2,6,10,14,18,22-tétracosahexène	45,05	Squalène	1,43%
9	Acide hénacosanoïque, méthyl ester	47,63	Ester méthylique de l'acide cérotique	0,76%

(¹) Temps de rétention exprimé en minute.

Sur un total de 25 constituants détectés, 09 ont été identifiés représentant un pourcentage de 64,79 % de la fraction analysée.

3.5.1.4. Discussion

Les données expérimentales de la cinétique de croissance obtenues *in vitro*, pour les souches leishmaniennes testées en forme promastigote, ont montré une prolifération cellulaire active atteignant, selon l'espèce, différente densité parasitaire maximale en période variable. Ces données ont permis de récolter des parasites provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle, en assurant leur **état physiologique semblable**. La croissance rapide et exempte de période de latence des souches *Leishmania donovani*, *L. infantum* et *L. killicki* diffère considérablement de celle des souches *Leishmania major* LIPA 100 et LIPA 32/06. Cette variabilité est attribuée à un certain nombre de causes, au premier rang desquelles s'inscrirait l'état physiologique de l'inoculum parasitaire qui peut être peu favorable (provenant d'une culture en phase stationnaire ou en phase de déclin), les besoins différentiels en métabolites, le degré de fitness de chaque souche ou le différent taux de croissance individuel (188, 189).

Selon la littérature, très peu d'études scientifiques ont été effectuées antérieurement pour démontrer l'efficacité du genre *Fraxinus* contre les leishmanies, citons, néanmoins, les travaux de recherche de MACAHIG et *al.* qui ont étudié l'effet de quelques sesquiterpènes isolées à partir des feuilles de *Fraxinus griffithii* sur l'espèce *Leishmania major* (190). Cependant, L'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. n'a fait l'objet jusqu'à aujourd'hui d'aucune étude de criblage d'activité antileishmanienne.

En effet, l'évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro* d'un produit extractible est dictée par son efficacité jugée sur son aptitude à inhiber 50 % de la charge parasitaire (CI₅₀) comparé au contrôle négatif, d'une part, et par sa toxicité vis-à-vis des cellules hôtes du parasite (CC₅₀), d'autre part. Sans qu'il n'y ait de règle fixe, un produit extractible a été jugé actif s'il présentait une **CI₅₀ < 100 µg.mL⁻¹** (191).

Le criblage préliminaire de l'activité antileishmanienne de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. a notamment permis de sélectionner les produits extractibles les plus actifs afin d'évaluer leur potentialités d'inhibition de la croissance parasitaire. Les extraits bruts aqueux et méthanolique se sont révélés pourvus d'activité antileishmanienne qui semble peu encourageante *in vitro* (CI₅₀ > 250 µg.mL⁻¹) contre les souches *Leishmania major* LIPA 100, *Leishmania donovani* et

RESULTATS ET DISCUSSION

Leishmania infantum, et aussi complètement inactifs contre *Leishmania major* LIPA 32/06 et *Leishmania killicki*. De toute évidence, ces extraits ont agi avec une similitude significative ($p= 0,65$), notamment contre toutes les souches testées. Cependant, ces résultats ont exclu, lors de ce travail, ces deux extraits de candidats potentiels contre les leishmanies.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. s'est avérée avoir une activité antileishmanienne prometteuse sur les trois souches testées, il n'est apparu aucune différence significative ($P=0,2$) entre cette activité sur la souche *Leishmania donovani* ($CI_{50} = 96,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et celle obtenue sur *L. infantum* ($CI_{50} = 82,59 \mu\text{g.mL}^{-1}$), elle s'est révélée, par contre, significativement plus supérieure sur la souche *L. major* LIPA 100 ($CI_{50} = 52,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$). En outre, l'extrait éthéropétrolique a fait preuve, à son tour, d'une efficacité antileishmanienne intéressante contre les souches *L. donovani* et *L. killicki* avec une CI_{50} respectivement de $74,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $91,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($P= 0,13$). Par ailleurs, l'extrait a été moins actif, sans aucune différence significative, vis-à-vis des souches de *L. major* LIPA 100, *L. major* 32/06 et *L. infantum* dont les CI_{50} sont respectivement de $110,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $103,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $119,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\geq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A l'heure actuelle, aucune étude portant sur la cytotoxicité de l'huile essentielle et l'extrait éthéropétrolique de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. n'a été identifiée dans la littérature scientifique. Toutefois, le criblage *in vitro* de l'activité antiparasitaire, dans la présente étude, a servi notamment à réaliser une évaluation préliminaire de la toxicité de ces produits extractibles testés sur la lignée cellulaire humaine monocyttaire THP-1 différenciée en macrophages.

L'huile essentielle ayant une $CC_{50} = 63,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été considérée comme non cytotoxique selon les critères de l'Institut National Américain du Cancer ($CC_{50} > 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ainsi, l'extrait éthéropétrolique s'est montré non cytotoxique à une concentration supérieure ($CC_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur les cellules testée THP-1(192, 193).

Dans ce qui suit, Il est important de noter que l'Indice de Sélectivité (SI) est une valeur arbitraire indiquant la spécificité de l'effet attendu, plus cet indice est supérieur à 1, plus l'effet sur les parasites est plus sélectif et sauf (124).

RESULTATS ET DISCUSSION

L'extrait éthéropétrolique a montré une activité antileishmanienne plus sélective, contre l'ensemble des souches testées, par rapport à sa toxicité sur la lignée cellulaire THP-1. De surcroit, cette sélectivité a été trois fois plus supérieure vis-à-vis de la souche *Leishmania donovani* que sur les THP-1 et deux fois plus sélectif vis-à-vis des souches *L. killicki*, *L. major* LIPA 32/06, *L. major* LIPA 100 et *L. infantum*. L'huile essentielle a présenté, quant à elle, des Indices de Sélectivité inférieurs à 1 contre les souches *Leishmania donovani* et *L. infantum*, indiquant ainsi une sélectivité à l'égard des cellules THP-1, elle a montré par ailleurs un effet sélectif supérieur à 1 contre la souche *L. major* LIPA 100.

Il est à noter, cependant, qu'un même produit extractif a présenté une activité antileishmanienne significativement différente contre quelques espèces testées. Selon la littérature scientifique, cette variation n'étant pas encore clairement interprétée, elle pourrait être due à une sensibilité intrinsèque variable d'une espèce à une autre et même d'une souche à une autre (194).

Enfin, la sensibilité constatée vis-à-vis de l'huile essentielle et de l'extrait éthéropétrolique a également différencié significativement chez la même souche, ce qui est due probablement à la différence dans la composition chimique de ces deux produits ainsi qu'à leur richesse en métabolites bioactifs.

L'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl. s'est révélée un mélange complexe de différents constituants dont les composés prédominants identifiés sont : l'**acide carboxylique** hexadécanoïque et l'alcool linoléyl. En outre, de nombreux autres constituants minoritaires ont pu être déterminés, notamment, les acides carboxyliques tétradécanoïque, dodécanoïque et nonanoïque (acide pélargonique), les **monoterpènes**, comme : le α -pinène, limonène, cis-Linalooloxyde et trans-Linalooloxyde, les **sesquiterpènes**, comme : le α -Muuroène et α -cadinol (sesquiterpènes alcoolique), les **C₁₃-norisoprénoides**, comme: β -damascenone, α - et β -Ionone, les **aldéhydes**, comme : le décanal, nonanal, décénal et décadienal, les **cétones**, comme : la phytone, la **cétone monoterpénique** géranyl acétone, l'**ester benzylique** : benzoate de benzyle, et autres.

Selon la littérature, l'analyse chromatographique par GC/MS de l'huile essentielle de *Fraxinus dimorpha* Coss. et Dur. a montré une prédominance avec 89,4 - 94,8%

RESULTATS ET DISCUSSION

(sur un totale de 93.6 à 96.9 % identifié) des composés sesquiterpéniques suivant : E-néolidol (72,2-79%), δ -cadinène (2,8 - 3,7%), farnésol (1,7-3,3%) et γ -muurolène (2,2-2,8%) (184), en revanche, l'huile essentielle obtenue, au cours de cette étude, renferme environ de 0,2% (sur un total de 66,21% identifié) de composés sesquiterpéniques.

De nombreux facteurs font varier le profile chimique d'une huile essentielle, qui est caractéristique d'un individu végétal donné, en premier lieu figurent : les variations intraindividuelles entre les différents organes de la même plante, le stade ontogénétique de la plante dans son entier et de l'organe soumis à l'extraction, le génotype de la plante, la présence des chémotypes, les divers facteurs environnementaux (principalement climatiques, édaphiques, saisonniers, stress biotique et abiotique), le séchage et la procédure d'extraction (195).

L'analyse de l'extrait éthéropétrolique estérifié de *Fraxinus angustifolia* Vahl. par GC/MS a révélé un nombre de composés moins élevés que celui de l'huile essentielle, huit esters méthyliques d'acide gras ont été caractérisés dont les esters méthyliques des acides gras polyinsaturés α - **linoléique** (oméga3) et **linoléique** (oméga 6) sont respectivement les plus abondants (52.78%), tandis que les esters méthyliques des acides gras saturés (stéarique, lignocérique, béhénique, arachidique, cérotique et laurique) ont présenté 10,58% du total identifié. L'analyse GC/MS du profile lipidique de l'espèce *Fraxinus dimorpha* Coss. et Dur. a montré une composition proche à celle de l'extrait analysé, notamment avec la présence majoritaire de l'acide linoléique (55,72-55,90%) (185). Un autre composé de nature triterpénique a également été identifié, **le squalène**, qui est parmi les composés les plus actifs de l'huile végétale d'olive de l'espèce *Olea europaea* (famille des Oléaceae) (196).

3.5.2. Criblage *in vitro* de l'activité antioxydante par le test de réduction du DPPH

3.5.2.1. Résultats du test d'évaluation de l'activité antioxydante

Le tracé représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration croissante du DPPH (**figure 3.26**) a révélé une droite de régression (ayant pour équation $[Abs] = 0,001 [DPPH] - 0,0003$) démontrant une excellente corrélation linéaire sur la plage de concentrations testée (avec un coefficient de corrélation $r = 0,99$), et illustrant ainsi la relation positive de proportionnalité entre ces deux variables (concentration et son absorbance mesurée).

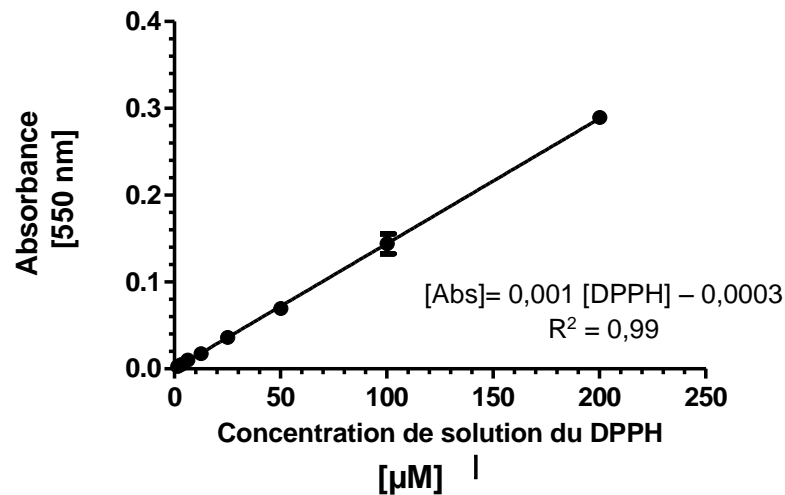


Figure 3.26 : Représentation graphique de la droite de calibration du DPPH.

Les représentations graphiques du profil d'activité antioxydante relative aux produits extractibles ayant présenté un effet antiradicalaire ainsi qu'aux composés de référence, exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction du logarithme de la concentration, ont montré que ladite activité est proportionnelle à la concentration testée (jusqu'à l'obtention d'une phase plateau dans le cas de l'acide ascorbique et de la quercétine) (**figure 3.27**).

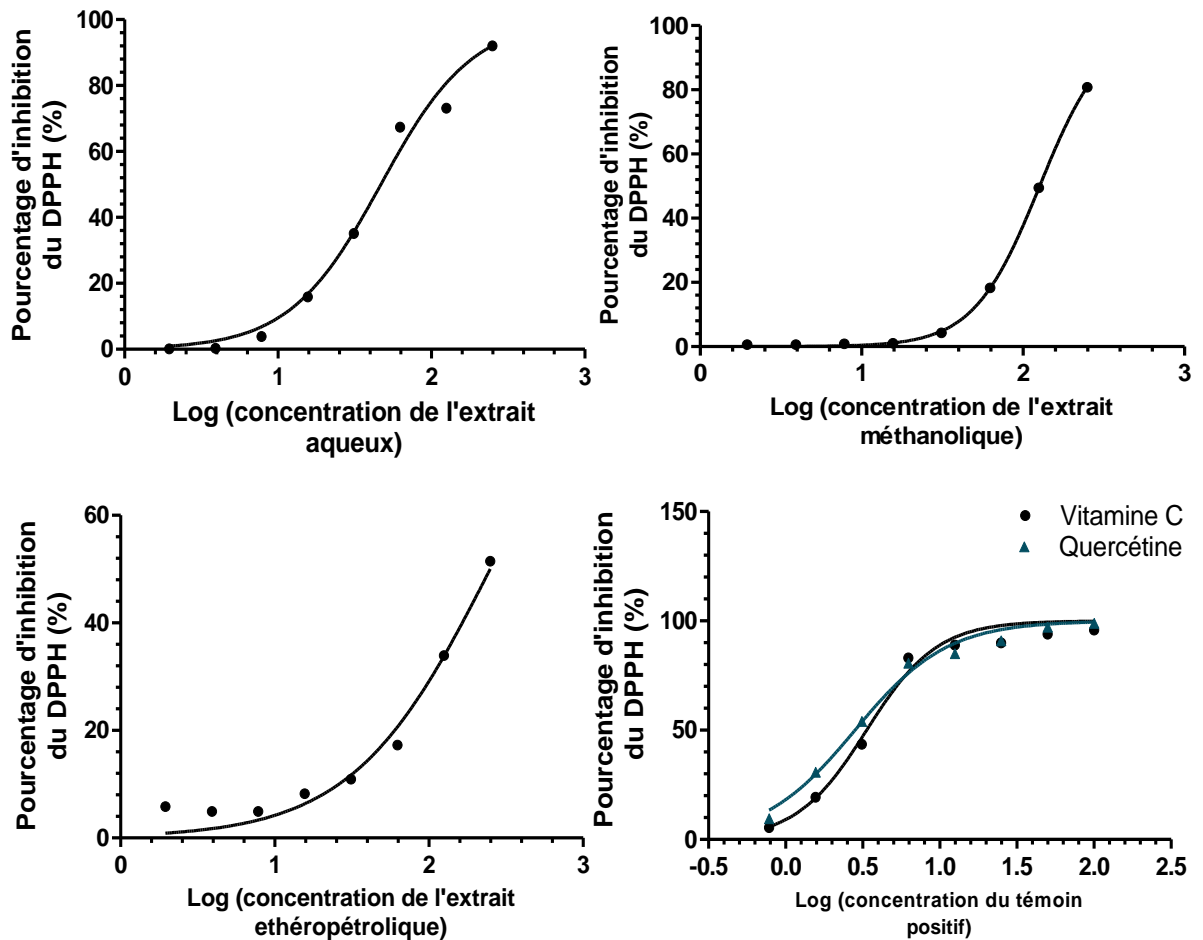


Figure 3.27 : Représentations graphiques de l'effet antiradicalaire des extraits testés.

Ces courbes log dose - effet ont également permis d'évaluer le potentiel antioxydant des produits extractibles de *Fraxinus angustifolia* Vahl. en fonction des valeurs de Concentration Inhibitrice à 50 % (CI_{50}) du radical DPPH déterminées, graphiquement, au moyen du logiciel GraphPad Prism[®] version 5.0 (Microsoft, USA) en utilisant le modèle de régression non linéaire « log (inhibitor) vs. normalized response- nonlinear regression », plus cette valeur de CI_{50} déterminée est faible plus l'activité en question est forte. Le **tableau 3.14** reprend les résultats obtenus pour les produits testés.

Tableau 3.14. Valeurs des CI_{50} de l'activité antioxydante estimées par le test au DPPH.

Echantillons testés	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	R^2
Extrait aqueux	$46,84 \pm 1,14$	0,98
Extrait méthanolique	$126,7 \pm 0,81$	0,99
Extrait éthéropétrolique	$249,5 \pm 0,4$	0,97
Huile essentielle	>2000	Nd
Acide ascorbique	$3,35 \pm 0,72$	0,98
Quercétine	$2,81 \pm 0,49$	0,99

*Concentration Inhibitrice à 50% du DPPH exprimée en moyenne \pm Erreur Standard de la Moyenne (SEM), Nd : Non déterminé.

Afin de comparer les CI_{50} obtenues de l'activité antioxydante, une analyse de variance (ANOVA) à une voie a été effectuée au moyen du logiciel IBM SPSS v. 20, suivie du test post-hoc de Tukey (qui a servi à comparer deux à deux les résultats des produits testés).

Au regard des résultats obtenus, l'extrait aqueux détient le plus fort potentiel antioxydant ($CI_{50} = 46,84 \pm 1,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$) suivi de l'extrait méthanolique ($CI_{50} = 126,7 \pm 0,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et enfin, l'extrait éthéropétrolique ($CI_{50} = 249,5 \pm 0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La différence entre ces trois extraits a été statistiquement extrêmement significative ($P < 0,001$), néanmoins leur effet reste très significativement moindre ($P < 0,001$) que celui de l'acide ascorbique et de la quercétine (sachant qu'aucune différence d'activité n'a été décelée entre ces deux composés de référence $P=0,84$).

Enfin, Il a été montré que l'huile essentielle ne présente aucun effet antiradicalaire en atteignant une concentration de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.5.2.2. Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques

Les résultats statistiques obtenus via le logiciel SPSS sont reportés dans le **tableau 3.15**.

Tableau 3.15 : Résultats statistiques de l'analyse de la corrélation linéaire.

Coefficient de corrélation	P-valeur
-0,5	0,67

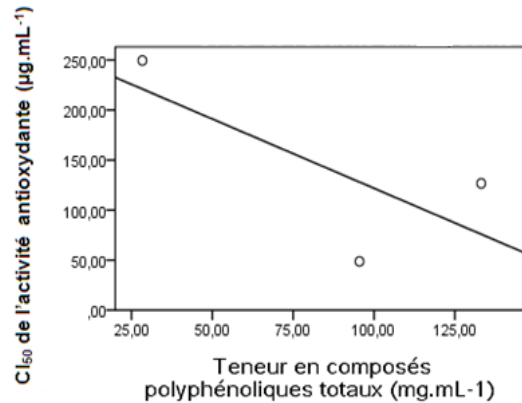


Figure 3.28 : Illustration graphique de l'analyse du lien entre les deux variables étudiées par SPSS.

3.5.2.3. Discussion

L'activité antioxydante de chaque extrait brut testé a été jugée au moyen d'une échelle d'évaluation à trois catégories définies selon des critères seuils évoqués par KUETE et al. 2010 (197) comme suit :

- une Cl_{50} inférieure à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ présentant une forte activité antioxydante;
- une Cl_{50} comprise entre 50 et $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ présentant une activité antioxydante modérée;
- une Cl_{50} supérieure à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ présentant une faible activité antioxydante.

Seul l'extrait aqueux a montré une forte activité antioxydante dont la Cl_{50} est significativement inférieure à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, les extraits méthanolique et éthéropétrolique ont démontré un faible potentiel antioxydant avec des Cl_{50} significativement supérieures à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Il semble cependant que l'extrait aqueux étant plus polaire a révélé une activité antioxydante plus prononcée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Ayouni et al., 2016, qui ont montré que les fractions aqueuses de l'extrait d'acétate éthylique et de l'extrait chloroformique ont exercé un effet antioxydant plus important que l'extrait éthanolique.

Les travaux précédents qui ont été menés sur le potentiel antioxydant de *Fraxinus angustifolia* Vahl. ont révélé une plus forte activité comparée à celle obtenue au cours de cette étude, notamment dans les travaux de FALE et al., 2013 qui ont montré que l'extrait aqueux, obtenu par infusion des feuilles, est environ deux fois plus antioxydant dont la $CI_{50} = 22.2 \pm 0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les travaux de MOULAOUÏ et al., 2015 ont également démontré que l'extrait éthanolique, obtenu par macération des feuilles, a manifesté, à une concentration de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, un effet inhibiteur du radical DPPH de $74 \pm 2 \%$ (exprimé en $\% \pm SD$), indiquant ainsi une CI_{50} inférieure à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En outre, il est à noter que l'extrait méthanolique de *F. angustifolia* Vahl. a été significativement moins actif ($126,7 \pm 0,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $P < 0,001$ selon le test *t* de Student en fixant $\alpha = 0,05$) que l'extrait méthanolique obtenu des feuilles de son espèce proche *F. excelsior* par extraction au Soxhlet ($CI_{50} = 13,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (198).

Enfin, l'évaluation de la valeur du coefficient de corrélation (*r*) exprimant la corrélation entre la teneur en composés polyphénoliques totaux et l'activité antioxydante a été effectuée en tenant compte des valeurs seuil de (*r*) (177).

Le coefficient de corrélation ($r = -0,5$) obtenu tente de démontrer l'existence d'un lien corrélationnel modéré et positif entre les deux variables étudiées, cependant, le degré de signification du test de corrélation P-valeur a montré que le *r* est statistiquement non significatif.

Dans un souci de rigueur scientifique, il est impossible de se prononcer, au vu de ces résultats, sur la présence d'une corrélation ou non entre la teneur en composés polyphénoliques totaux et l'activité antioxydante des extraits bruts évalués au cours de cette étude.

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ce travail, une étude phytochimique préliminaire a été menée sur les trois extraits bruts de *Fraxinus angustifolia* Vahl. ainsi que sur son huile essentielle. Il est à noter qu'à ce jour, aucune publication relative à la composition et/ou aux activités de ladite l'huile essentielle n'est mentionnée.

Tout d'abord, la teneur en eau de la drogue végétale séchée employée a été estimée inférieure à 10% assurant ainsi une bonne diffusivité du solvant employé lors de l'extraction (199). Trois types d'extractions ont ensuite été effectuées : extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation, extraction par décoction à 5% de l'extrait brut aqueux et extraction par soxhlet à 5% des extraits bruts méthanolique et éthéropétrolique. L'extrait aqueux a donné le plus fort rendement d'extraction (43,03%), suivi de l'extrait méthanolique (33,82%), cependant, les plus faibles rendements d'extraction ont été obtenus avec l'extrait éthéropétrolique 3,16% et avec l'huile essentielle 0,03%.

Le criblage phytochimique réalisé ensuite par les réactions de caractérisation sur les trois extraits aqueux, méthanolique et éthéropétrolique a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes chimiques : Polyphénols totaux, tanins, flavonoïdes, saponosides, glycosides cardiotoniques, composés réducteurs et mucilages. Il est à mentionnée, qu'aucune données sur le criblage phytochimique par réactions de caractérisation sur l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. n'a pu être retrouvé dans la littérature scientifique.

En outre, Un criblage biologique préliminaire *in vitro* a été réalisé sur les extraits bruts et l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

En ce qui concerne l'activité antiparasitaire, le criblage préliminaire à une concentration de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a montré l'extrait éthéropétrolique et l'huile essentielle comme seuls candidats prometteurs contre les Leishmanies (forme promastigote) en manifestant une inhibition parasitaire supérieure à 95% contre l'ensemble des souches testées, par ailleurs, l'inhibition exercée par les deux

extraits bruts méthanolique et éthéropétrolique a varié d'une souche à une autre sans atteignant la Concentration Inhibitrice de 50% de croissance parasitaire (CI_{50}).

L'huile essentielle a fait ressortir une activité antileishmanienne avec des $CI_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre les trois souches testées : *Leishmania major* LIPA 100, *L. donovani* et *L. infantum*. Tandis que l'extrait éthéropétrolique a présenté des $CI_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre deux souches seulement : *Leishmania donovani* et *L. killicki*.

Néanmoins, l'évaluation de la cytotoxicité de l'huile essentielle et l'extrait éthéropétrolique sur les cellules hôtes des parasites est un point majeur pour assurer la sélectivité de l'activité antiparasitaire. Les résultats émanant de cette évaluation n'ont montré aucune cytotoxicité vis-à-vis la lignée cellulaire humaine monocyttaire THP-1.

A cet effet, l'extrait éthéropétrolique a présenté une capacité à inhiber sélectivement la croissance parasitaire des cinq souches leishmaniennes testés, toutefois l'huile essentielle a inhibé sélectivement la souche *Leishmania major* LIPA 100.

Le profil chromatographique obtenu de l'huile essentielle, à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, a révélé la présence de 25 molécules identifiées représentant 68,77% du volume total, dont les acides gras sont majoritaires, une minorité de molécules bioactifs a été également identifiée, citons les terpènes tels que les monoterpènes : alpha pinène, limonène et les sesquiterpènes comme le alpha cadinol ainsi que les cétones, les aldéhydes, les acides et hydrocarbures. Cependant l'estérification de l'extrait éthéropétrolique a permis de caractériser sa fraction lipidique par la GC/MS, 08 acides gras ont été identifiés représentant 63,36 % (de la fraction analysée) : acide laurique, acide linoléique, acide α -linoléique, acide stéarique, acide arachidique, acide béhénique, acide lignocérique et l'acide cérotique. Enfin, le squalène est le neuvième composé bioactif qui a été identifié avec un pourcentage de 1.43%, ce dernier est un triterpène qui possède un large spectre thérapeutique (200).

En effet, de nombreux composés d'origine végétale appartiennent aux différentes classes chimiques ont déjà démontré des propriétés antileishmaniennes, tels que :

les flavonoïdes, les monoterpènes, les diterpènes, les triterpènes et saponines (201) Ainsi, d'après la littérature scientifique, plusieurs acides carboxyliques identifiés dans la présente étude sont déjà supposés être des composés antileishmaniens comme : l'acide linolénique, l'acide palmitique et l'acide linoléique (202).

En revanche, les résultats du criblage antioxydant ont décelé un fort potentiel antiradicalaire significatif uniquement pour l'extrait brut aqueux $Cl_{50} = 46,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les extraits méthanolique et éthéropétrolique ont présenté des $Cl_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ indiquant un faible potentiel antioxydant. L'étude récente d'Ayouni et al., 2016, a suggéré que les deux composés sécoiridoïdes oleuropéine et ligstroside ainsi que les flavonoïdes glycosylés : kaempférol 3-O-rutinoside, isoquercétine (quercétine 3-O-glucoside) et rutine (quercétine 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-1-6-glucopyranose) sont fortement impliqués dans le potentiel antioxydant des feuilles de *Fraxinus angustifolia*. En effet, de nombreuses phytomolécules sont dotées d'avoir un pouvoir antioxydant comme : les acides gras insaturés, le β carotène et autres caroténoïdes, l'acide ascorbique, le tocophérol, les stérols et les polyphénols (203). Cependant, le lien corrélationnel entre la teneur en composés polyphénoliques et l'activité antioxydante des extraits bruts testés n'a pu être déterminé.

Ces activités antileishmanienne et antioxydante peuvent être attribuées soit à la présence de constituants majoritaires actifs, de constituants mineurs possédant une forte potentialité antileishmanienne et /ou antioxydante ou encore à la synergie entre l'ensemble des constituants présents. De surcroît, l'activité de ces composés bioactifs a été fortement influencée par le mode de leur obtention (nature du solvant, méthode d'extraction). Enfin, tous les composés bioactifs assimilés d'une plante médicinale peuvent être : soit actifs sans être métabolisés et auront ainsi une activité *in vitro* et *in vivo* ; soit actifs après métabolisation et dans ce cas ils seront inactifs *in vitro* et actifs *in vivo* ; soit active *in vitro* et inactive *in vivo* après métabolisation (204, 205). L'effet d'une drogue végétale est donc toujours complexe et il importe de bien connaître les différents constituants qui interviennent (1).

DISCUSSION GENERALE

De ce fait, nos résultats émanant du présent travail de recherche constituent une étape préliminaire importante dans la mise en évidence des propriétés antileishmanienne et antioxydante de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif poursuivi lors de ce travail de recherche était d'**identifier de nouveaux potentiels thérapeutiques** de la plante *Fraxinus angustifolia* Vahl. en vue de la valoriser comme étant une essence forestière à vertus médicinales.

En effet, cette espèce a été le sujet d'un nombre relativement restreint d'études de criblage biologique. De plus, aucune étude *in vitro* ou *in vivo* n'a été élaborée pour évaluer son effet antileishmanien.

Dans une première étape, quatre (04) produits extractibles de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. ont été obtenus, trois extraits bruts et une huile essentielle. Ceci en effectuant trois types d'extraction, à savoir décoction, extractions au Soxhlet par le méthanol et l'éther de pétrole et extraction par hydrodistillation classique. Les extraits bruts aqueux, méthanolique et éthéropétrolique obtenus respectivement à des rendements de 43,03%, 33,82% et 3,16% ont ensuite été soumis à une exploration chimique préliminaire permettant tout d'abord de caractériser par les tests colorimétriques la présence de grandes familles chimiques, notamment des tanins, des glycosides cardiotoniques et des composés réducteurs dans l'ensemble de ces extraits, en plus des flavonoïdes et des saponosides dans les extraits bruts aqueux et méthanolique et enfin des mucilages dans l'extrait aqueux. Puis, la détermination de la teneur en composés polyphénoliques des extraits bruts, par le dosage colorimétrique par le réactif Folin – Ciocalteu, a suggéré la richesse des extraits aqueux et méthanolique en molécules appartenant à la famille des polyphénols totaux, tout en montrant également une teneur modérée dans l'extrait éthéropétrolique.

Le potentiel bioactif de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. a ensuite été évalué, en mesurant *in vitro* l'activité antiparasitaire de l'ensemble de ses produits extractibles ainsi que le potentiel antioxydant de ses extraits bruts.

Lors d'un premier criblage antiparasitaire, l'extrait éthéropétrolique et l'huile essentielle présentaient les résultats les plus intéressants, en démontrant un potentiel antileishmanien supérieur à 95% sur l'ensemble des souches testées, méritant ainsi l'évaluation approfondie de leur effet par la détermination de leur Concentrations Inhibitrices médianes (CI₅₀) et leur Concentrations Cytotoxiques

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

médianes (CC₅₀) sur la lignée cellulaire humaine monocyttaire THP-1 transformées en macrophages. Ces deux paramètres ont permis d'estimer l'Indice de Sélectivité (IS) de l'extrait éthéropétrolique et de l'huile essentielle vis-à-vis des souches leishmaniennes.

La présente étude a apporté, en outre, une nouvelle connaissance concernant les profils chimiques de l'huile essentielle (obtenue à un rendement de 0,03%) et de l'extrait éthéropétrolique de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

De plus, l'évaluation *in vitro* du potentiel antioxydant des extraits bruts par le test de réduction du DPPH a montré l'extrait aqueux comme étant le plus actif, les extraits bruts méthanolique et éthéropétrolique, quant à eux, ont été montrés faiblement actifs. Tandis que l'huile essentielle n'a manifesté aucun effet à une concentration de 2000 µg.mL⁻¹.

Les résultats prometteurs de cette étude confirment que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* Vahl. contiennent des composés bioactifs, qui offrent un outil pharmacologique pour le développement de nouveaux médicaments potentiels contre la leishmaniose, qui représente un véritable problème de santé publique, faisant partie des maladies réémergentes négligées pour l'OMS, ainsi contre le stress oxydatif, qui est un mécanisme intervenant dans le processus de multiples pathologies sévères.

Cette étude a été menée sur les cultures *in vitro* de formes promastigotes de cinq (05) souches appartenant aux espèces *Leishmania major*, *L. donovani*, *L. infantum* et *L. killicki*, afin de poursuivre cette recherche sur l'activité antileishmanienne de *Fraxinus angustifolia* Vahl., il serait pertinent d'évaluer davantage son effet sur d'autres souches et espèces de leishmanie, ainsi que sur un deuxième modèle expérimental basé sur la culture *in vitro* des macrophages infectés de leishmanies en forme amastigotes, en imitant par ce modèle l'environnement cellulaire chez l'hôte vertébré.

La validation de son efficacité biologique *in vitro* permettra ensuite d'amorcer les essais précliniques *in vivo* et de confirmer un probable agent thérapeutique qui

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

pourrait être amélioré par l'emploi de nouvelles approches scientifiques notamment la nanotechnologie.

Toutefois, il est important de rappeler que les données disponibles sur la pharmacovigilance de l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. restent relativement limitées, il paraît donc nécessaire d'élaborer de nouvelles données, sur la toxicité de ses produits extractibles, en déterminant leur Dose Létale moyenne (DL50).

Enfin, pour approfondir plus les connaissances sur l'espèce *Fraxinus angustifolia* Vahl. un fractionnement bioguidé pourrait être préconisé afin de déterminer les composés bioactifs responsables de ses activités biologiques testés et déceler également d'autres composés d'intérêt thérapeutique non encore prouvé ou décrit.

A ce jour, cette plante, demeure une source de molécules candidats-agent thérapeutiques loin d'être complètement exploitée. Toutefois, sa valorisation comme étant une essence forestière à vertus médicinales, impose nécessairement l'acquisition préalable d'une meilleure connaissance, notamment de son profil chimique. La **biotechnologie végétale**, au moyen de la mise en œuvre de cultures expérimentales des cellules végétales *in vitro* de *Fraxinus angustifolia* Vahl., pourrait contribuer efficacement à son exploitation rationnelle et servir ainsi à couvrir les besoins en connaissances en vue de sa valorisation durable.

LISTE DES APPENDICES

- Appendice. A** Posologie traditionnelle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.
- Appendice. B** Représentation schématique des formes amastigote et promastigote de *Leishmania infantum*.
- Appendice. C** Préparation du réactif de Dragendorff (révélateur des alcaloïdes).
- Appendice. D** Préparation des milieux de culture.
- Appendice. E** Numération de leishmanies au microscope photonique.
- Appendice. F** Révélation des cellules macrophages par la coloration au bleu de trypan.
- Appendice. G** Différentiation des cellules humaines monocytaires THP-1 en macrophages.
- Appendice. H** Quelques images photographiques relatives au chapitre matériels et méthode.
- Appendice. I** Tableau de valeurs des Concentrations Inhibitrices CI_{50} de l'Amphotéricine B testé sur les souches leishmaniennes étudiées.
- Appendice. J** Profil chromatographique de l'huile essentielle obtenu par analyse en GC/MS.
- Appendice. K** Profil chromatographique de l'extrait brut éthéropétrolique obtenu par analyse en GC/MS.
- Appendice. L** Tableau des composés non identifiés de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl analysée par GC/MS.
- Appendice. M** Propriétés du DPPH et sa réaction avec un antioxydant.

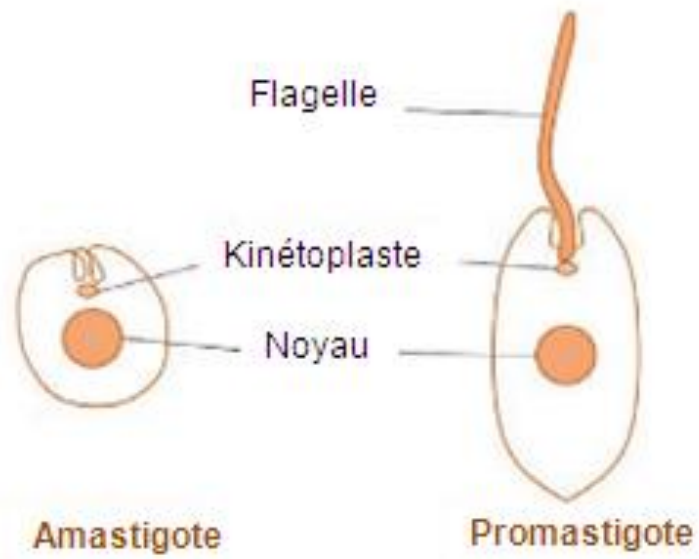
Appendice A :

Posologie traditionnelle de *Fraxinus angustifolia* Vahl.

<i>Usage tradithérapeutique</i>	<i>Drogue végétale</i>	<i>Préparation</i>	<i>Posologie</i>
Diurétique et laxative	Feuilles	Décoction	(30 à 60) g/l
Antigoutteuse	Feuilles (séchées)	/	10 à 20) g/200g d'eau une tasse/3h 2 ou 3 lavements/jours
	Feuilles (chauffées)	/	Cataplasme (Quelques heures)
	Feuilles (en poudre)	Infusion (3h)	1g/deux tasse d'eau trois tasses/jours pendant 8 jours
Antigoutteuse (Goutte chronique)	Feuilles (en poudre)	Infusion (3h)	1g/2 tasses d'eau trois tasses/jours pendant 8 à 10 jours/mois
/	Feuilles et racine	/	40 à 120g/l Lavement, fomentation, lotion et cataplasme
Tonique et diurétique	Semences	Décoction (prolongée)	10 à 30 g/l d'eau
Antirhumatismale (contre l'arthrite)	Semences (en poudre)	/	4 à 15g/une tasse de vin ou autres jusqu' à 120g/1l d'eau
Fébrifuge	Ecorce	Décoction	15 à 60 g/1l une tasse avant chaque repas
	Ecorce (en poudre)	/	10 à 25g trois fois/j pendant plusieurs jours
Purgative	Ecorce de la racine	/	45g/750g d'eau

Appendice B :

Représentation schématique des formes amastigote et promastigote de
Leishmania infantum (206)



Appendice C :

Préparation du réactif de Dragendorff (iodobismuthite de potassium, révélateur des alcaloïdes) (165)

Il s'agit d'une solution de travail fraîchement préparée en mélangeant 20 mL d'acide acétique, 70 mL d'eau distillée et un volume de 10 mL d'une solution stock contenant les solutions A et B (V/V) suivantes :

- Solution A de 1,7 g de nitrate de bismuth dissous dans un mélange de 100 mL eau distillée/acide acétique (4:1) ;
- Solution B de 40 g d'iodure de potassium dissous dans 100 mL d'eau distillée.

Appendice D :

Préparation des milieux de culture (83)

- **Milieu de culture NNN (Novy, MacNeal, Nicolle)**

Bacto agar difco	10 g
NaCl pur pulvérisé	06 g
Eau distillée	1000 mL
Sang de lapin	

A 1000 mL d'eau distillée ont été ajoutés 6g de NaCl et 10g de Bacto agar difco. Le mélange a été porté à ébullition jusqu'à dissolution complète. La gélose ainsi préparée a été répartie en tubes stérile en verre à vis à raison de 7ml par tube. Après stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, le sang de lapin préalablement chauffé à 56°C pendant 30min a été mélangé avec la gélose à raison de 1 mL/tube. Les tubes ont été laissés en position inclinée pendant 24h à température ambiante. Après formation d'exsudat, les tubes ont été conservés à +4°C.

Le milieu de culture NNN ainsi préparé est biphasique à un pH de 7,2.

- **Milieu de culture RPMI**

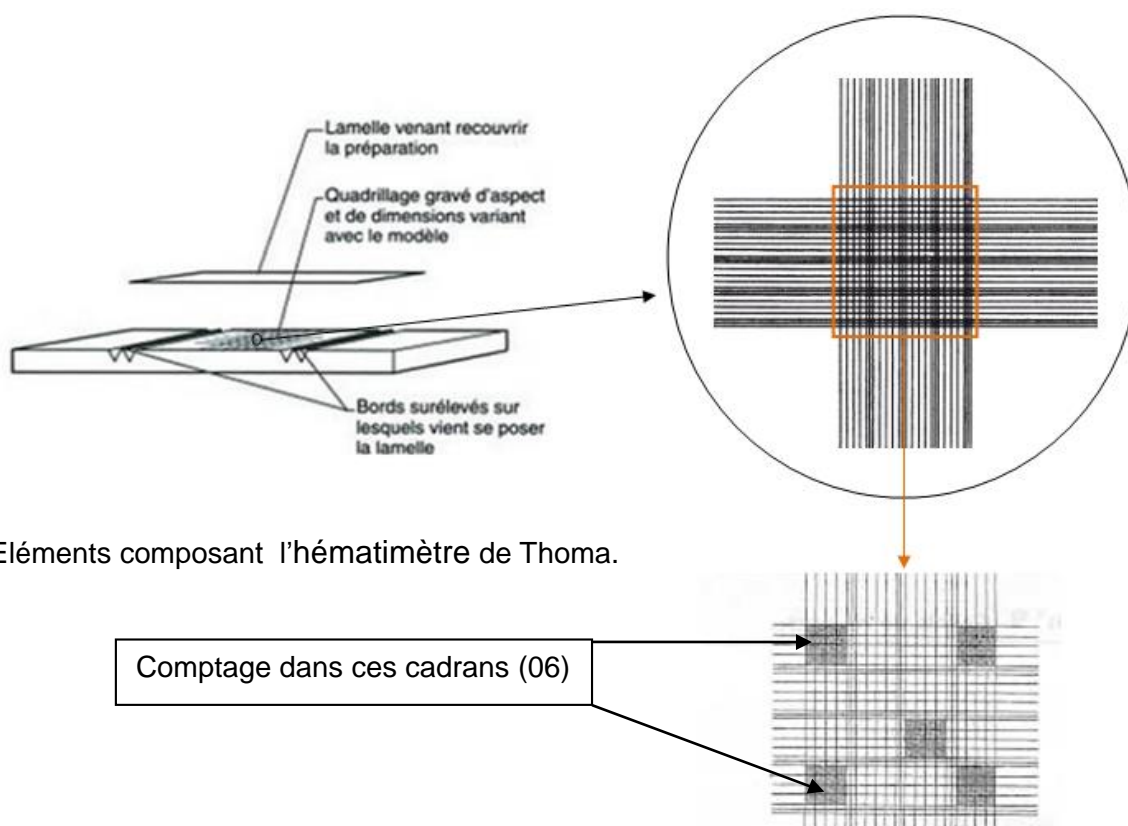
Milieu de base lyophilisé RPMI 1640	26,8 g
Eau distillée	1000 mL
Sérum de Veau Fœtal	
L-glutamine	

A 800 mL d'eau distillée stérile, ont été ajoutés 26,8 g de milieu de base lyophilisé RPMI 1640, Sérum de Veau Fœtal à raison de 10% et L- glutamine (200mM) à raison de 1%. Le mélange a ensuite été complété jusqu'à 1000 mL avec ajustement de son pH à 7,2. Le milieu a été stérilisé par filtration sur filtre de 0,22 µm.

Appendice E :

Numération de leishmanies au microscope photonique (207)

La détermination de la charge parasitaire a été réalisée à partir de la suspension leishmanienne à compter, un volume homogène de 10 μL a été prélevé et mélangé avec deux volumes équivalents de formol à 20 % (destiné à fixer les parasites afin d'en faciliter le dénombrement) et de la solution du bleu de trypan à 0,4 % (qui permet de distinguer entre les cellules vivantes qui apparaissent claires entourées d'un halo bleu, et les cellules mortes qui apparaissent totalement bleues). Après cinq (05) minutes d'incubation, 10 μL du mélange ont été transférés sur une plaque de verre calibrée appelée hématimètre, celle qui a été utilisée est l'hématimètre de Thoma. Enfin, le comptage manuel a été effectué au microscope photonique (Gr \times 40).



Formule du comptage des parasites :

$$[C_p] = [\text{Nbr. Parasites /surface comptée}] \times 1/d \times \text{profondeur de l'hématimètre}$$

- [C_p] : concentration parasitaire (nombre de parasites /ml)
Nbr. Parasites : nombre de parasites comptés
1/d : facteur de dilution

Appendice F :

Différentiation des cellules humaines monocytaires THP-1 en macrophages

En culture, les cellules THP-1 présentent une morphologie ronde et croissent en suspension individualisées ou parfois avec formation de grappes. Elles ont été employées, au cours de la présente étude, sous leur forme différenciée en macrophages présentant une forme plus granuleuse et allongée avec des extensions cytoplasmiques.

Le protocole expérimental de différenciation est le suivant :

- Une solution à $5 \cdot 10^5$ cell.mL a été préparée à partir d'une culture de monocytes THP-1 en milieu de phase exponentielle (J3 ou J4) ;
- Après Centrifugation à 1500 rpm pendant 10 minutes, les monocytes ont été repris dans le milieu de cultures RPMI supplémenté avec 10% en volume de Sérum de Veau Foetal (SVF) contenant 20 ng.mL^{-1} final de Phorbol Myristate Acétate (PMA) ;
- Chaque puits a étéensemencé par $100 \mu\text{L}$ de la suspension cellulaire préparée ;
- Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO_2 ;
- Afin d'éliminer le PMA ainsi que les cellules non adhérentes, le milieu de différenciation a été éliminé et les cellules ont été lavées dans 1mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) puis 1mL de milieu RPMI à 10% (SVF).

Observation : Le traitement au PMA a provoqué l'adhésion des cellules au fond du puits de culture indiquant la différenciation des monocytes en macrophages. La morphologie cellulaire a été vérifiée et évaluée au microscope optique à inversion (Gr \times 20 PH).

Appendice G :

Révélation des cellules macrophages par la coloration au bleu de trypan

La viabilité cellulaire a été déterminée par le comptage manuel au microscope photonique inverse (Gr x20PH) à l'aide de la coloration au bleu de trypan.

Le protocole expérimental de la coloration est comme suit :

- Laver chaque puits une fois avec du PBS ;
- Ajouter 50 µL/puits de la solution de bleu de trypan à 0,4 % ;
- Laisser agir cinq (05) minutes environ ;
- Laver chaque puits deux (02) fois avec du PBS ;
- Ajouter 100 µL/puits de PBS ;
- Insérer le quadrillage de 1 cm² dans l'oculaire du microscope ;
- Compter le nombre de cellules vivantes (blanches) et mortes (bleues) sur le quadrillage entier et compter 3 champs/puits.

Formule du comptage des cellules :

Nombre de cellules/puits = moyenne des trois champs × Gr² × surface du puits (cm²)

Appendice H :

Quelques images photographiques relatives au chapitre matériels et méthode



Feuilles de *Fraxinus angustifolia* Vahl.
observées sous la loupe binoculaire
(Gr x 1,5).



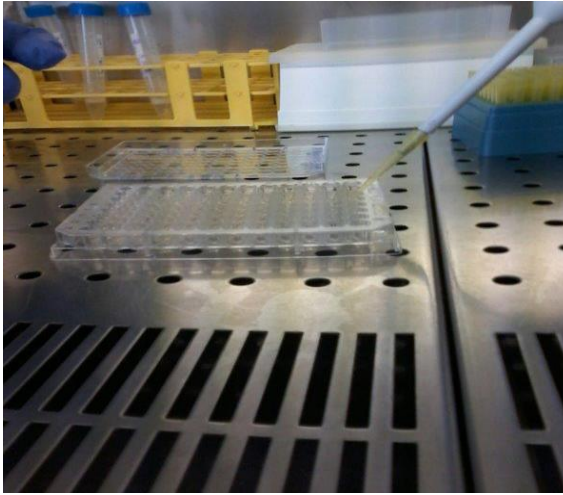
Dosage par spectrophotométrie.



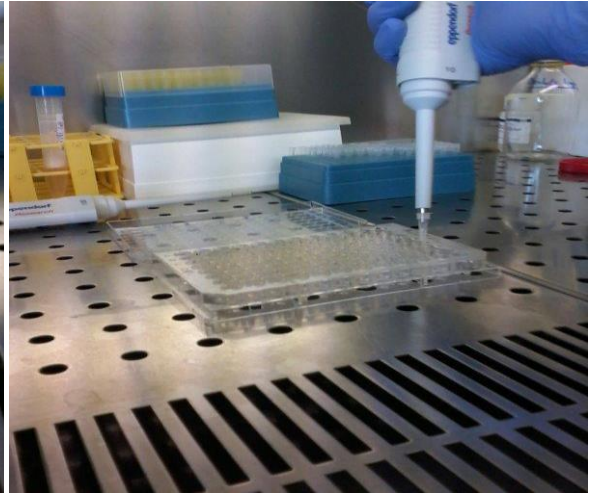
Souches leishmaniennes employées
lors du test antiparasitaire.



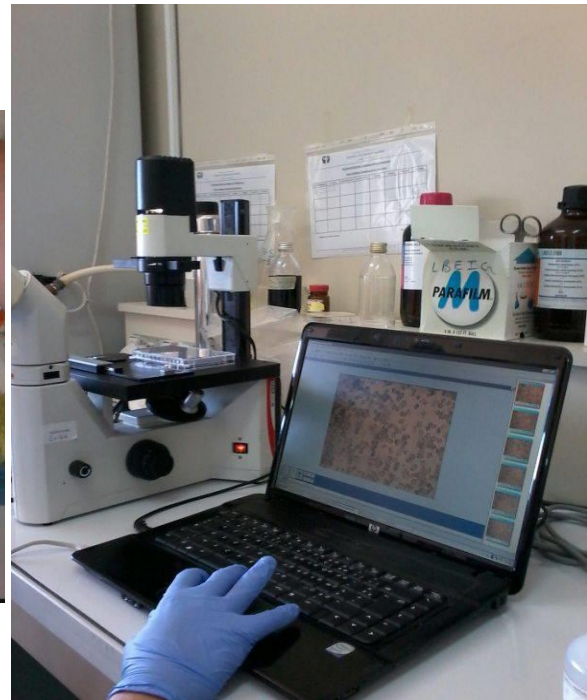
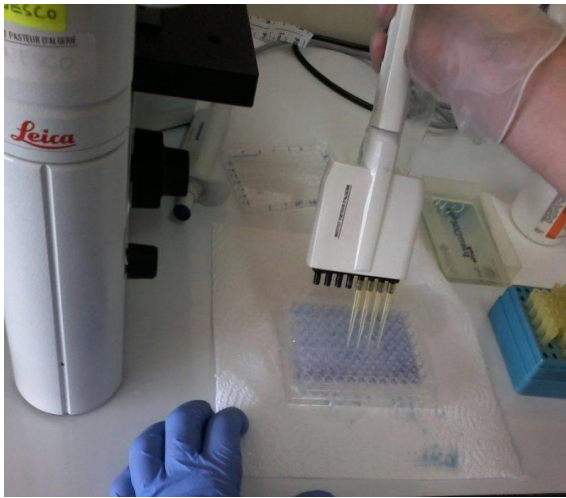
Forme promastigote de *Leishmania*
killicki observée sous microscope
photonique (Gr x 40)



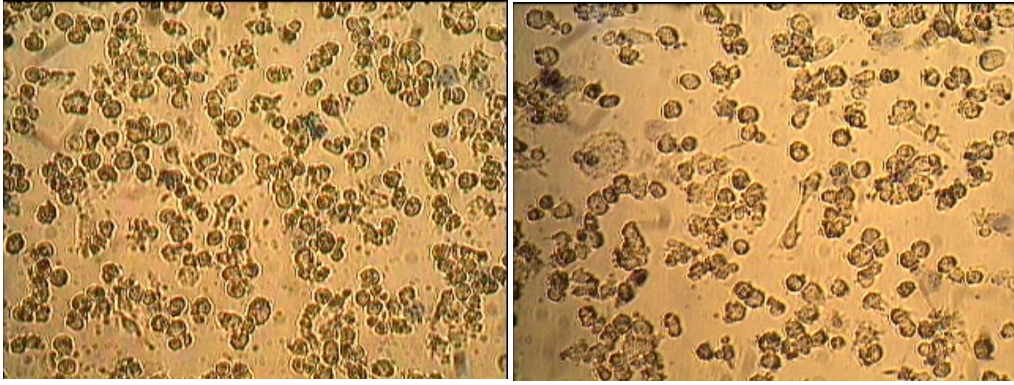
Dépôt des souches parasites : exemple de distribution de l'inoculum parasite dans une microplaque.



Dépôt des produits extractibles : exemple de distribution de l'extrait brut testé dans une microplaque.



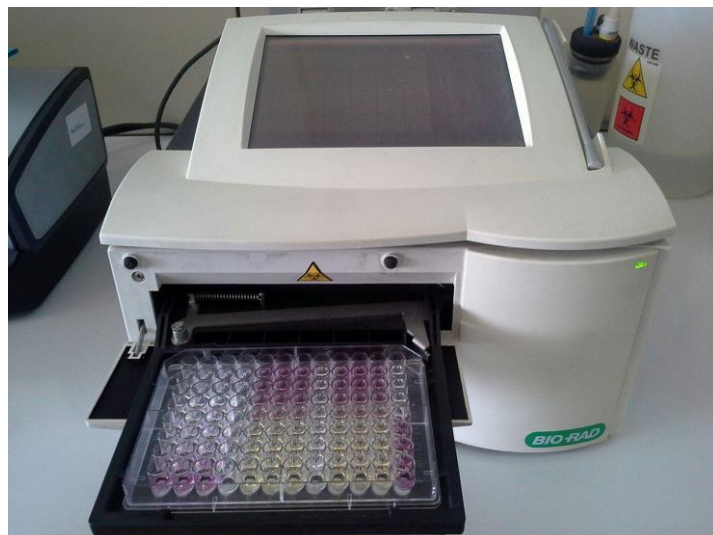
Révélation des cellules macrophages.



Cellules de la lignée macrophagique humaine THP-1 observées sous microscope inversé (Gr x 20).



Microplaque (de 96 puits) obtenue avec le test de réduction du DPPH.



Lecture d'une microplaque obtenue avec le test de réduction du DPPH.

Appendice I :

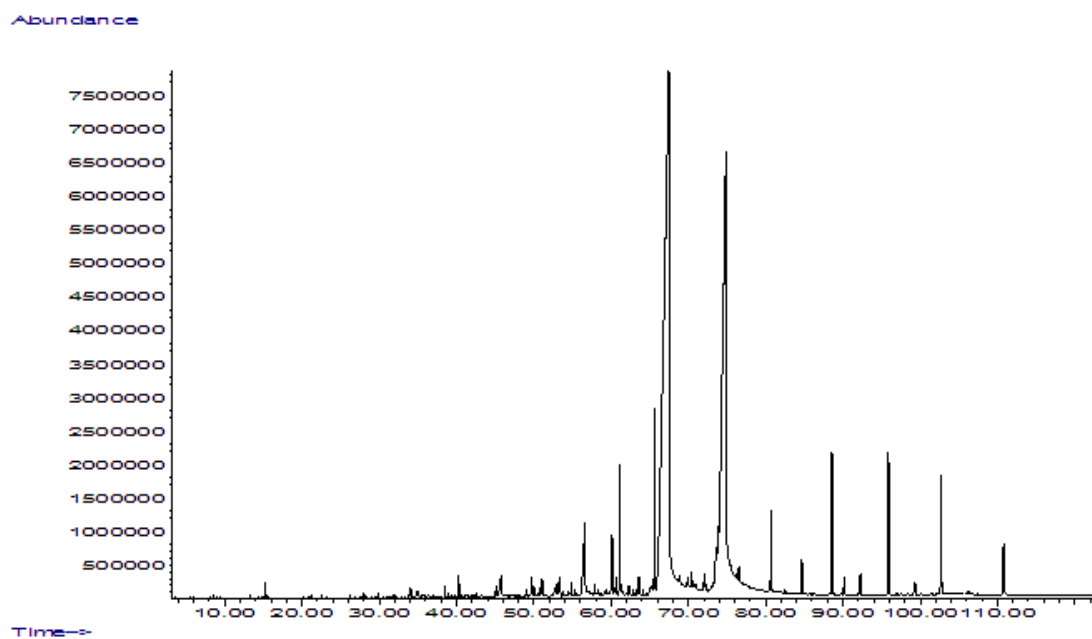
Tableau des valeurs de concentrations inhibitrices CI_{50} de l'Amphotéricine B testé sur les souches leishmaniennes étudiées.

Souches parasitaire	Amphotéricine B	
	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	R^2
LIPA 100	0,26±0,007	0,99
LIPA 32/06	0,91±0,13	0,99
LDD8	0,25 ±12,6	0,99
LEM 5285	0,57±0,08	0,98
LIPA 281	0,51±0,07	0,98

* CI_{50} exprimé en moyenne \pm Standard Erreur de la Moyenne (SEM).

Appendice J :

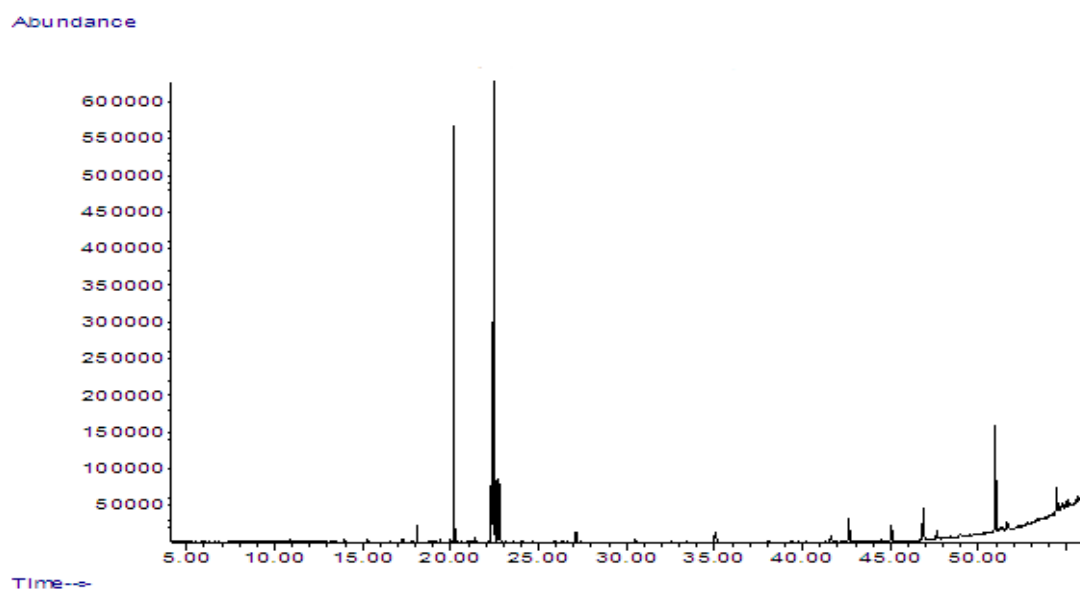
Profil chromatographique de l'huile essentielle obtenu par analyse en GC/MS



Temps total d'analyse : 98 min

Appendice K :

Profil chromatographique de l'extrait brut éthéropétrolique obtenu par analyse en GC/MS.



Temps total d'analyse : 59 min

Appendice L :

Tableau des composés non identifiés de l'huile essentielle de *Fraxinus angustifolia* Vahl analysée par GC/MS.

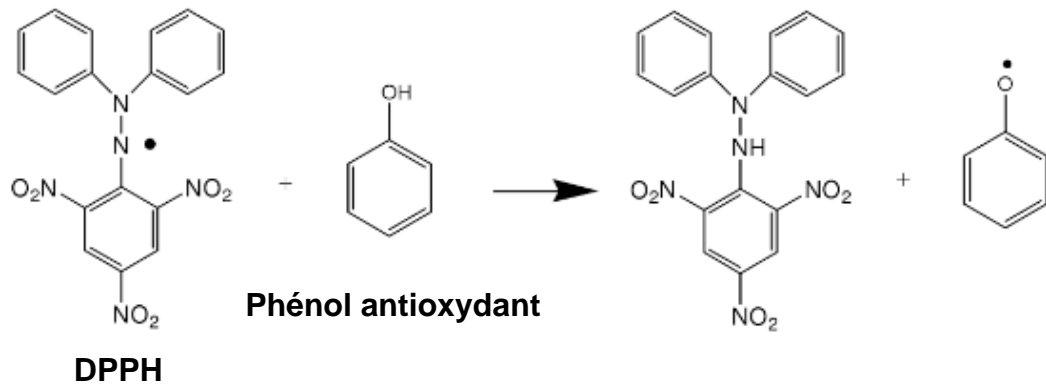
Composés	Tr (min) ⁽¹⁾	IK ⁽²⁾	Abondance (%)
Non identifié	9,39	1014	0.013%
Non identifié	15,20	1099	0.136%
Non identifié	18,81	1152	0.012%
Non identifié	20,92	1182	0.028%
Non identifié	21,22	1187	0.044%
Non identifié	23,16	1215	0.019%
Non identifié	29,37	1307	0.019%
Non identifié	29,82	1314	0.054%
Non identifié	31,06	1333	0.018%
Non identifié	31,25	1336	0.033%
Non identifié	32,93	1362	0.013%
Non identifié	34,88	1393	0.240%
Non identifié	35,63	1405	0.088%
Non identifié	35,86	1408	0.059%
Non identifié	36,98	1427	0.044%
Non identifié	38,89	1458	0.045%
Non identifié	39,39	1466	0.033%
Non identifié	39,67	1471	0.039%
Non identifié	41,41	1499	0.084%
Non identifié	41,74	1505	0.034%
Non identifié	42,02	1510	0.045%
Non identifié	42,36	1516	0.044%
Non identifié	42,62	1520	0.074%
Non identifié	43,22	1530	0.059%
Non identifié	44,72	1556	0.036%
Non identifié	45,04	1562	0.073%
Non identifié	45,23	1565	0.122%
Non identifié	46,49	1587	0.057%
Non identifié	47,22	1599	0.038%
Non identifié	47,52	1605	0.040%
Non identifié	47,85	1611	0.036%
Non identifié	48,05	1614	0.036%
Non identifié	49,76	1646	0.238%
Non identifié	50,11	1652	0.121%
Non identifié	50,36	1657	0.033%
Non identifié	51,09	1670	0.273%
Non identifié	51,66	1681	0.048%
Non identifié	52,70	1700	0.146%
Non identifié	53,02	1706	0.158%
Non identifié	53,37	1713	0.196%
Non identifié	53,72	1720	0.070%
Non identifié	54,11	1727	0.038%

Non identifié	57,24	1787	0.073%
Non identifié	58,30	1808	0.165%
Non identifié	58,61	1814	0.059%
Non identifié	59,32	1828	0.061%
Non identifié	60,42	1851	0.144%
Non identifié	60,68	1856	0.195%
Non identifié	61,10	1864	1.317%
Non identifié	62,03	1883	0.043%
Non identifié	62,29	1888	0.107%
Non identifié	63,34	1910	0.079%
Non identifié	63,59	1915	0.225%
Non identifié	64,15	1927	0.068%
Non identifié	64,54	1935	0.034%
Non identifié	65,15	1948	0.294%
Non identifié	65,62	1958	2.007%
Non identifié	68,88	2028	0.346%
Non identifié	69,90	2051	0.543%
Non identifié	70,34	2060	0.269%
Non identifié	70,62	2067	0.163%
Non identifié	72,14	2100	0.222%
Non identifié	73,59	2133	1.135%
Non identifié	76,18	2193	0.406%
Non identifié	77,39	2221	0.169%
Non identifié	79,52	2273	0.036%
Non identifié	80,68	2300	0.879%
Non identifié	80,96	2307	0.023%
Non identifié	81,66	2325	0.020%
Non identifié	82,52	2346	0.036%
Non identifié	84,26	2389	0.013%

(1) Temps de rétention exprimé en minute, (2) Indice de Kovats.

Appendice M :

Propriétés du DPPH et sa réaction avec un antioxydant (208)



- **Formule chimique** : $C_{18}H_{12}N_5O_6$
- **Masse molaire** : 394.32 g/mol
- **Solubilité dans l'eau** : insoluble

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Paris, R.R. and Moyses, H., "Matière médicale", édition 2, Paris, (1976), 420 p.
- 2- Tyler, V.E., "Phytomedicines: back to the future", Journal of Natural Products, V. 62, n° 11, (1999), 1589-1592.
- 3- Patwardhan, B., "Ethnopharmacology and drug discovery", Journal of ethnopharmacology, V. 100, n° 1, (2005), 50-52.
- 4- Debray, M., Jacquemin, H. and Razafindrambao, R.S., "Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar", Botany, (1971), 150 p.
- 5- Suty, L., "Les végétaux: Les relations avec leur environnement", Science, Editions Quae, (2015), 55 p.
- 6- Small, E. and Catling, P.M., "Les cultures médicinales canadiennes". Les Presses scientifiques du CNRC. (2000).
- 7- Hopkins, W.H., "Physiologie végétale", Science, De Boeck Supérieur, (2003), 532 p
- 8- Pharmacognosy Bruneton, J., "Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales", Technique et Documentation, 3^e édition, (1993) ,1120 p.
- 9- Botineau, M., "Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs", Lavoisier, (2010), 1006-1008.
- 10- Kints, E., "Journal encyclopedique ou Universel", V. 4, n° 3, 1771.
- 11- Wallander, E., "Systematics and floral evolution in Fraxinus (Oleaceae)". Belgische Dendrologie Belge, (2012), 39-58.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 12- Hanelt, P., "Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops" (Except Ornamentals), Institute of Plant Genetics and Crop Plant, Research Springer Science and Business Media, (2001), 3641 p.
- 13- Hegazy, A. and Lovett-Doust, J., "Plant Ecology in the Middle East, Oxford University Press, (2016), 352 p.
- 14- Anonyme, "Guide illustré de la flore algérienne", Wilaya d'Alger, Mairie de Paris, 95 p.
- 15- Ait Youssef, M., "Plantes médicinales de Kabylie", Ibis Press, (2006), 349 p.
- 16- Rameau, J.C., Mansion, D. and Dumé, G., "Flore forestière française: région méditerranéenne. Forêt privée française", Botanical illustration, V. 3, (2008), 2426 p.
- 17- Kostova, I., Iossifova, T., "Chemical components of *Fraxinus* species", Fitoterapia, (2007), 78:85-106.
- 18- Wallander, E. and Albert, V.A., "phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnI-f* sequence data", American Journal of Botany, (2000), V. 87, n° 12, 1827- 1841.
- 19- Wallander, E., "Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy", Plant Systematics and Evolution, V. 273, n° 1-2, (2008), 25-49.
- 20- Allantospermum, A., Apodanthaceae, A., Boraginales, B., Buxaceae, C., Centrolepidaceae, C., Cynomoriaceae, D., Dilleniales, D., Dipterocarpaceae, E., Forchhammeria, F., Gesneriaceae, H. and Icacinaceae, I., "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV", Botanical journal of the Linnean Society, V. 181, n° 1, (2016), 1-20.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 21- Singh G., "Plant Systematics, Third Edition: An Intergrated Approach", CRC Press, (2010), 724 p.
- 22- Kadereit, J.W. ed., "Flowering Plants · Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)", Springer Science and Business, Media, V. 7, (2004), 478 p.
- 23- Adams, C., Early, M., Brook, J. and Bamford, K., "Principles of Horticulture", Routledge, Level 3, (2015), 300 p.
- 24- Kuttan, R. and Harikumar, K.B. eds., "Phyllanthus Species: Scientific Evaluation and Medicinal Applications", CRC Press, (2011), 388 p.
- 25- Dupérat, M. and Polese, J.M., "Encyclopédie visuelle des arbres et arbustes", Editions Artemis, (2008), 239 p.
- 26- Fukarek, P., "Différence morphologique et anatomiques entre de frêne commun et le frêne oxyphylle (*F. angustifolia* Vahl.) ", bulletin de la société botanique de France, (2014).
- 27- Mathieu A., "Flore forestière: description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importantes de l'Algérie. Suivies d'une méthode analytique pour en déterminer les principales espèces pendant l'hiver et précédées d'un dictionnaire des mots techniques, Ancienne maison Grimblot et cie, N. Grosjean, successeur. (1860), 448 p.
- 28- Gerard, P.R., Fernandez -Manjarres, J.F. and frascaria-Lacoste, N., "Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl.", Molecular Ecology, V.15, n° 12, (2006), 3655-3667.
- 29- FRAXIGEN," Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use", University of Oxford, (2005), 128 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

30- Stanturf, J., Madsen, P. and Lamb, D. eds., "A Goal-Oriented Approach to Forest Landscape Restoration", Springer Science and Business Media, V. 16, (2012). 476 p.

31- Papi, R.M., Spanos, K.A. and Kyriakidis, D.A., "Genetic variation of *Fraxinus angustifolia* natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers", European Journal of Forest Research, V.131,n° 4, (2012),1151-1161.

32- Temunović, M., Franjić, J., Satovic, Z., Grgurev, M., Frascaria-Lacoste, N. and Fernández-Manjarrés, J.F., "Environmental Heterogeneity Explains the Genetic Structure of Continental and Mediterranean Populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl", PloS one, V. 7,n° 8, (2012), e42764.

33- Frascaria-Lacoste, N., "Dynamique de recolonisation du frêne oxyphylle (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) et d'hybridation avec le frêne commun (*Fraxinus excelsior* L.) face aux changements globaux", Biodiversité et changement global, IFB - GICC Colloque de restitution, (2006) ,156 - 161.

34- Crivellaro, A. and Schweingruber, F.H., "Atlas of Wood, Bark and Pith Anatomy of Eastern Mediterranean Trees and Shrubs: with a Special Focus on Cyprus", Springer Science & Business Media, (2013), 583 p.

35- Fournier, P. and Boisvert, C., " Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France", Omnibus, (2010), 1050 p.

36- Ghourri, M., Zidane, L. and Douira, A., "La phytothérapie et les infections urinaires (La pyélonéphrite et la cystite) au Sahara Marocain (Tan-Tan) ", Journal of Animal and Plant Sciences, V. 20, n° 3, (2014), 3171-3193.

37- Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A. and Ziyat, A., "Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco", International Journal of Diabetes & Metabolism, V.10, (2002), 33-50.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 38- Rigouzzo, A.L., "Plantes de femme. Corps et sang féminin", *Ecologie Humaine*, (1993), 85-96.
- 39- Martins, V.M.R. and Coimbra, M.A., "Isolation and characterization of polysaccharides from *Fraxinus angustifolia* infusions", 11^o Encontro de Química dos Alimentos, (2012), 147.
- 40- Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S. and Pinto-Gomes, C., "Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal)", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 93, n^o 2, (2004), 183-195.
- 41- Rauter, A., Palma, F.B., Justino, J., Araújo, M.E. and dos Santos, S.P. eds., "Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application", Springer Science and Business Media, V. 47, (2013), 505 p.
- 42- Le Houérou, H.N. ed., "Les fourrages ligneux en Afrique: état actuel des connaissances: papiers présentés au Colloque sur les Fourrages Ligneux en Afrique, Addis Abeba, 8-12 avril, 1980 et autres contributions", Centre International pour l'Élevage en Afrique, (1980), 481 p.
- 43- Santamour Jr, F.S., "Flavonoids and coulyarins in fraxinus and their potential utility in hybrid verification", National Arboretum, USDA, SEA, Washington, (1981). 63-71.
- 44- Grayson, D.H., "Monoterpenoids", *Journal of Natural Product Report*, V.15, n^o 5, (1998), 439-475.
- 45- Jensen, S.R., Franzyk, H. and Wallander, E., "Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers", *Phytochemistry*, V. 60, n^o 3, (2002), 213-231.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 46- Kaveh, M., Tavasoli, A., Azadi, R., "woody branch and leaf anatomy of two subspecies of *Fraxinus angustifolia* vahl. (Oleaceae) in Iran", Conference: 2nd National Congress on Medicinal Plants, At Tehran- Iran, V. 12, (2013).
- 47- Sener, B. ed., "Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization" Springer Science and Business Media, (2002), 412 p.
- 48- Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A.M., Cleto, P., Madeira, P.J.A., Florecirc, M.H., Frazatilde, F.N. and Serralheiro, M.L., "Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after *in vitro* gastrointestinal digestion", Journal of Medicinal Plants Research, V. 7, n° 20, (2013), 1370-1378.
- 49- Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M.L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E., Atmani, D., Fadda, A.M. and Manconi, M., "Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: *In vitro* and *in vivo* wound healing potential", European Journal of Medicinal Chemistry, V. 89, (2015), 179-188.
- 50- Medjahed, Z., Atman-Kilani, D., Fauconnier, M.L., Richard, G. and Atmani, D., "Hepatoprotective and anti-diabetic activities of *Fraxinus angustifolia*Vahl extracts in animal models: Characterization by by high performance liquid chromatography analysis. Turkish Journal of Medical Sciences, V.46, n° 3, (2016), 910-920.
- 51- García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F.A., Faça-Berthon, P., Roller, M., Zafrilla, P., Issaly, N. and García-Conesa, M.T., "Targeted and Untargeted Metabolomics to Explore the Bioavailability of the Secoiridoids from a Seed/Fruit Extract, (*Fraxinus angustifolia* Vahl) in Human Healthy Volunteers: A Preliminary Study", molecule, V. 20, (2015), 22202–22219.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 52- Sebaihi, S., Debbache, N., Atmani, D., " Effet anti-inflammatoire des extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* ", Nutrition et Santé, V.01, n° 00, (2012) ,1-110.
- 53- Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A.M., Frazão, F.A.N. and Serralheiro, M.L., Studies on the molecular mechanism of cholesterol reduction by *Fraxinus angustifolia*, *Peumus boldus*, *Cynara cardunculus* and *Pterospartum tridentatum* infusions. Journal of Medicinal Plants Research, V. 8, n° 1, (2014), 9 -17.
- 54- Medjahed, Z., Metz Boutigue, MH., Guerold B., Atmani D., "Etude des extraits de *Fraxinus angustifolia* par des approches analytiques : CCM, HPLC, biotographie, évaluation des activités antimicrobiennes", Nutrition et Santé, V. 01, n° 00, (2012), 1-110.
- 55- Sandberg, F. and Corrigan, D., "Natural Remedies: Their Origins and Uses", CRC Press, Natural remedies: their origins and uses. CRC Press, (2001), 192 p.
- 56- Galabov, A.S., Iosifova, T., Vassileva, E. and Kostova, I., 1996, "Antiviral activity of some hydroxycoumarin derivatives", *Zeitschrift für Naturforschung C*, V. 51, n° 7-8, 558-562.
- 57- Farrell, J.P., "Leishmania", World class parasites volume 4: by Springer Sciences and Business Media, (2002).
- 58- Gillespie, S., Pearson, R.D., "Principles and Practice of Clinical of Parasitology", John Wiley and Sons Lid, Principles, G.S.P.R., (2001).
- 59- Lepoivre, P., "Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte", De Boeck Supérieur. (2003). 432 p.
- 60- Wéry, M., "Protozoologie médicale", De Boeck Supérieur, (1995), 276 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 61- Leon Jacobs , CRC handbook series in zoonoses CRC Press, (1982).
- 62- Scholtyseck, E., “Fine structure of parasitic protozoa: an atlas of micrographs, drawings and diagrams”, Springer Science & Business Media, (2012), 208 p.
- 63- Ponte-Sucre, A., Diaz, E. and Padrón-Nieves, M. eds., 2012. “Drug Resistance in *Leishmania* Parasites” Drug Resistance in *Leishmania* Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments”, Springer Science & Business Media, (2012), 462 p.
- 64- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G.U.Y., Fensome, R.A., Fredericq, S. and James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., Mccourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A.V., Spiegel, F. W. and M. F. J. R. Taylor, “The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists”, the International Society of Protistologists, Journal of Eukaryot. Microbiol, V. 52, n° 5, (2005), 399-451.
- 65- Milner, D. A., “Diagnostic Pathology: Infectious Diseases”, Elsevier Health Sciences, (2015), 450 p.
- 66- Schonian,G., Mauricio,I. and Cupolillo, E. “Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?” Trends in Parasitology, V. 26, (2010), 466-469.
- 67- Kwakye-Nuako, G., Mosore, M.T., Duplessis, C., Bates, M.D., Puplampu, N., Mensah-Attipoe, I., Desewu, K., Afegbe, G., Asmah, R.H., Jamjoom, M.B. and Ayeh-Kumi, P.F., “First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex”, International Journal for Parasitology, V. 45, (2015), 679-684.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 68- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. and Perieres, J., "Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification", *Ann Parasitol Hum Comp*, V. 65, n° 3, (1990), 111-125.
- 69- Baker, J.R. and Muller, R. "Advance in parasitology ", Academic Press INC, V. 26, (1987), 305p.
- 70- Martin-Smith, M., Sneader, W.E., Schier, O. and Marxer, A., "Progress in Drug Research", Springer, (2013), 413.
- 71- Doenhoff, M.J. and Chappell, L.H., "Survival of parasites, microbes and tumours: strategies for evasion, manipulation and exploitation of the immune response", Cambridge University Press, V. 115, Parts 4-6, (1997), 184 p.
- 72- Avila, J.L. and Robin Harris, J. "Intracellular parasites Subcellular Biochemistry", Springer Science and Business Media, (2013), 450 p.
- 73- Pettit, J.H.S. and Parish, L.C., "Manuel of tropical dermatology", Springer Science and Business Media, (2012), 260 p.
- 74- Gentilini, M., Caumes, E., Danis, M., Richard-Lenoble, D., Bégué, P. and Touze, J.E., Kerouédan, D., "Médecine tropicale", Médecine sciences publications-Lavoisier, 6e édition, (2012).
- 75- Euzéby, J., "Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire", Lavoisier, (2008), 832 p.
- 76- McConville, M.J., Saunders, E.C., Kloehn, J. and Dagley, M.J., "Leishmania carbon metabolism in the macrophage phagolysosome-feast or famine?", *F1000Research*, 4 (F1000 Faculty Rev), (2015), 938.
- 77- Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M. and Sacks, D.L., "Demonstration of genetic

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector”, Science, V. 324, n° 5924, (2009), 265-268.

78- Pichard, E., “MalinTrop Afrique: manuel de maladies infectieuses pour l'Afrique”, John Libbey Eurotext, (2002), 589 p.

79- Dedet, J.P., “Les découvertes d'Edmond SERGENT sur la transmission vectorielle des agents de certaines maladies infectieuses humaines et animales”, Bulletin de la Société de pathologie exotique, V.100, n° 2, (2007), 147-150.

80- Lane, R.P. and Crosskey, R.W., “Medical insects and arachnids”, Springer Science and Business Media, (2012), 723 p.

81- Izri, A., Depaquit, J. and Parola, P., “Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen”, Médecine tropicale, V. 66, n° 5, (2006), 429-435.

82- Guillaume, V., “Parasitologie sanguine”, De Boeck Supérieur, (2009), 208 p.

83- Bessis, D., Francès, C., Guillot, B. and Guilhou, J.J., “Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques “, Dermatologie et médecine, V. 2 , Springer Science and Business Media, (2009), 400 p.

84- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. and Gradoni, L., “Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern”, Medical and veterinary entomology, V. 27, n° 2, (2013), 123-147.

85- Dougall, A.M., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., Rose, K. and Walton, S.F., “Evidence incriminating midges (Diptera:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia”, International journal for parasitology, V. 41, n° 5, (2011), 571-579.

86- Rapp, C., Debord, T., Imbert, P., Lambotte, O. and Roué, R., “Ruptures de rate au cours des maladies infectieuses: splénectomie ou traitement conservateur? A propos de trois cas”, La Revue de médecine interne, V. 23, n° 1, (2002), 85-91.

87- Laurenti, M.D. and Moreira, M.A.B., Euthanasia for the Zoonosis Control Program, Euthanasia - The “Good Death” Controversy in Humans and Animals, Kuře Josef, (2011), 219-232.

88- Long, S.S., Pickering, L.K. and Prober, C.G., “Principles and practice of pediatric infectious disease”, Elsevier Health Sciences, (2012), 1712 p.

89- Tibayrenc, M. ed., “Encyclopedia of infectious diseases: modern methodologies”, John Wiley and Sons, (2007), 480 p.

90- Satoskar, A. and Durvasula, R. eds., “Pathogenesis of Leishmaniasis: New Developments in Research”, Springer Science and Business, (2014), 93 p.

91- Lydyard, P., Cole, M., Holton, J., Irving, W., Porakishvili, N., Venkatesan, P. and Ward, K., “Case studies in infectious disease”, (2009), Garland Science, 608 p.

92- Clemente, W.T., Rabello, A., Faria, L.C., Peruhype-Magalhães, V., Gomes, L.I., Da Silva, T.A.M., Nunes, R.V.P., Iodith, J.B., Protil, K.Z., Fernandes, H.R. and Cortes, J.R.G., “High prevalence of asymptomatic *Leishmania spp.* infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil”, American Journal of Transplantation, V.14, n° 1,(2014), 96-101.

93- Magill, A.J., Grogl, M., Gasser Jr, R.A., Sun, W. and Oster, C.N., “Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm”, New England Journal of Medicine, V. 328, n° 19, (1993), 1383-1387.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 94- Anglaret, X. and Mortier, E., "Maladies infectieuses", De Boeck Secundair, (2002), 291 p.
- 95- Mayers, D. ed., "Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects", Springer Science and Business Media, V. 2, (2009), 692 p.
- 96- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), "Leishmaniose", aide-mémoire n°375, centre des médias, (2016).
- 97- Du Vivier, A., "Atlas de dermatologie clinique", De Boeck Supérieur, (1996), 556 p.
- 98- Cabello, I., Caraballo, A. and Millan, Y., "Leishmaniasis in the genital area", Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, V. 44, n° 2, (2002), 105-107.
- 99- Wiser, M., "Protozoa and human disease", Garland Science, (2010), 300 p.
- 100- Marty, P., Delaunay, P., Fissore, C. and Le Fichoux, Y., "La leishmaniose méditerranéenne due à *Leishmania infantum* mise au point-intérêts des tests de diagnostic rapide: IT-Leish® et ID-PaGIA Leishmaniasis® ", Med Trop, V. 67, (2007), 79-85.
- 101- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), "La lutte contre les leishmanioses", rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, 22-26 mars 2010, (2011), 212 p.
- 102- Desjeux, P., Piot, B., O'NEILL, K. and Meert, J.P., "Co-infections a Leishmania/VIH dans le Sud de l'Europe", Med Trop, V. 61, (2001), 187-193.
- 103- Petithory, J.C., Ardoin-Guidon, F., Paugam, A., Galeazzi, G., Le Ponner, S., "Cahier de formation biologie médicale, parasites sanguins ", BIOFORMA, n° 23, (2001). 354p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 104- English III, J.C., "Granulomatous Disorders of Adult Skin", An Issue of Dermatologic Clinics, Elsevier Health Sciences, V. 33, n° 3, (2015), 583.
- 105- Masmoudi, A., Kitar, A., Rebai, M., Bouassida, S., Turki, H. and Zahaf, A., "La leishmaniose cutanée de la face dans la région de Gafsa, Tunisie", Bull Soc Pathol Exot, V. 98, n° 5, (2005), 374-379.
- 106- Maibach, H.I. and Gorouhi, F., "Evidence based dermatology", PMPH-USA, (2011), 1116 p.
- 107- Krieg, T., Bickers, D.R. and Miyachi, Y. eds., "Therapy of Skin Diseases: A Worldwide Perspective on Therapeutic Approaches and Their Molecular Basis", Springer Berlin Heidelberg, (2010), 766 p.
- 108- Bennett, J.E., Dolin, R. and Blaser, M.J., "Principles and practice of infectious diseases", Elsevier Health Sciences, V.1, (2014), 3904 p.
- 109- Hooja, S., Sharma, B., Jindal, A. and Vyas, N., , "First reported cases of diffuse cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus positive patients in Jaipur District of Rajasthan, India", Tropical Parasitology, V. 4, n° 1, (2014), 50-52,
- 110- Handman, E., "Leishmaniasis: current status of vaccine development", Clinical microbiology reviews, V.14, n° 2, (2001), 229-243.
- 111- Anonyme, "Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral)", The Center for Food Security and Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, (2009), 1-11.
- 112- Bueno-Marí, R., Almeida, A.P.G. and Navarro, J.C. eds., "Emerging zoonoses: eco-epidemiology, involved mechanisms and public health implications", Frontiers Media SA, (2015), 248 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 113- Harrat, Z., Hamrioui, B., Belkaïd, M. and Tabet-Derraz, O., "Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie", Bulletin de la Société de pathologie exotique, V. 88, n° 4, (1995), 180-184.
- 114- Belazzoug, S., Addadi, K., Mokrani, T., Hafirassou, N., Hamrioui, B. and Belkaid, B., "La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984", Ann Soc belge Med Trop, V. 65, (1985), 329-335.
- 115- Hamel, H., "Étude comparée des boutons d'Alep et de Biskra ", V. Rozier, (1860), 30 p.
- 116- Fendri, A.H., Beldjoudi, W., Ahraou, S. and Djaballah, M., "Leishmaniasis in Constantine (Algeria): review of five years (2006-2010) at the University Hospital", Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990), V. 105, n°.1, (2012), 46-48.
- 117- <http://www.pasteur.dz> [consulté le 15 février 2016].
- 118- Bachi, F., "Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie". La Lettre de l'infectiologue, V. 21, n° 1, (2006), 9-15.
- 119- Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., Boubidi, S.C., Benikhlef, R., Arrar, L., Hamrioui, B. and Harrat, Z., "Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie", Bulletin de la Société de pathologie exotique, V.105, n° 1, (2012),30-35.
- 120- Berger, S., "Visceral Leishmaniasis: Global Status", GIDEON Informatics Inc, (2015), 116 p.
- 121- De Montpellier, C. H. U., and Dedet, J.P., "Rapport annuel d'activité 2008 Séance de la SPE : Thérapeutique des leishmanioses", Institut Pasteur, (2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

122- Stuart, M.C., Kouimtzi, M. and Hill, S., "WHO model formulary 2008", World Health Organization, (2009), 634 p.

123- Sundar, S., Singh, A. and Singh, O.P. "Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness", Journal of tropical medicine, (2014),

124- Tiunan, T.S., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D., Cortez, D.A.G. and Nakamura, C.V., "Studies on the effectiveness of Tanacetum parthenium against *Leishmania amazonensis*", Acta protozoologica, V. 44, n° 3, (2005), 245-251.

125- Vermelho, A.B., Supuran, C.T., Cardoso, V., Menezes, D., de Andrade Silva, J.R., Ferreira, J.L.P., Amaral, A.C.F. and Rodrigues, I.A., "Leishmaniasis: possible new strategies for treatment. In Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment", D. Claborn, Ed, (2014), 351-376.

126- V.S.H. Rao, and Durvasula, R., "Dynamic Models of Infectious Diseases: Volume 1: Vector-Borne Diseases", Springer Science and Business Media, (2012), 285 p.

127- Croft, S.L., Sundar, S. and Fairlamb, A.H., "Drug resistance in leishmaniasis", Clinical microbiology reviews, V.19, n° 1, (2006), 111-126.

128- de Menezes, J.P.B., Guedes, C.E.S., Petersen, A.L.D.O.A., Fraga, D.B.M. and Veras, P.S.T., "Advances in development of new treatment for leishmaniasis", BioMed Research International, (2015), 1-11.

129- Delarras, C., "Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures", Lavoisier, (2014), 800 p.

130- Deray, G., Mercadal, L. and Bagnis, C., "Néphrotoxicité de l'amphotéricine B", Néphrologie, V. 23, n° 3, (2002), 119 -122.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

131- Ebadi, M.S., "Desk reference of clinical pharmacology", Florida: CRC Press, (2008), 824 p.

132- Anonyme, "Lutte contre les leishmanioses", Rapport d' un comité OMS d' experts, Série de rapports techniques, n° 949, (2010), 212 p.

133- Halliwell, B., "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis", British journal of experimental pathology, V. 70, n° 6, (1989), 737-757.

134- Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F. and Samuel, J., "Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux", John Libbey Eurotext, (2008), 677 p.

135- Beckman, K.B. and Ames, B.N., "The free radical theory of aging matures", Physiological reviews, V. 78, n° 2, (1998), 547-581.

136- Rahman, K., "Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors", Clinical interventions in aging, V. 2, n° 2, (2007), 219-236.

137- Halliwell, B., "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life", Plant physiology, V.141, n° 2, (2006), 312-322.

138- Favier, A., "Le stress oxydant", L'actualité chimique, (2003), 108-115.

139- Sies, H. ed., "Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome", CRC Press, (2007), 344 p.

140- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., "Free radicals in biology and medicine" Oxford University Press, (2015), 896 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 141- Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Farhat, N., Drouin, A., Gendron, M.È. and Thorin, É., "Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale", *Medecine sciences: M/S*, V. 26, n° 10, (2010), 875-880.
- 142- Roberfroid M. B, C V. and Delzenne N., "Aliments fonctionnels" Lavoisier, (2008), 1042 p.
- 143- Russo-Marie, F., "L'inflammation", John Libbey Eurotext, (1998), 565 p.
- 144- The McCord, J.M., "The evolution of free radicals and oxidative stress", *The American journal of medicine*, V.108, n° 8, (2000), 652-659.
- 145- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S.M., Vasson, M.P., Hasselmann, M. and Lerverve, X. eds., "Traité de nutrition artificielle de l'adulte", Springer Science & Business Media, (2006), 1191 p.
- 146- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K., "Methods for testing antioxidant activity", *Analyst*, V.127, n° 1, (2002), 183-198.
- 147- Greff, M., "Post'U FMC-HGE: Paris, du 24 au 27 mars 2011", Springer Science and Business Media, (2012), 312 p.
- 148- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C. and Chapelle, J.P., "Le stress oxydant", *Revue médicale de Liège*, V. 62, n° 10, (2007), 628-638.
- 149- Durand, G. and Beaudeau, J.L., "Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives", Lavoisier, (2011), 607 p.
- 150- Médart, J., "Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative", De Boeck Supérieur, (2009), 314 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 151- Jadot, G., "Antioxydants et vieillissement ", John Libbey Eurotext, (1994), 300 p.
- 152- <http://earthexplorer.usgs.gov> [consulté le 02 mars 2016].
- 153- Office National de la Météorologie (ONM) d'Algérie, "bulletins climatiques de la station météorologique de Tizi Ouzou, (1996 – 2008) ", [obtenus le 15 juin 2016].
- 154- Máthé, Á. ed., "Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects", Springer, V. 1, (2015), 460 p.
- 155- NIIR Board of Consultants and Engineers, "Cultivation and Processing of Selected Medicinal Plants", Asia Pacific Business Press Inc., (2006), 600 p.
- 156- Gazengel, J.M. and Orecchioni, A.M. eds., "Le préparateur en pharmacie: guide théorique et pratique", Technique and Documentation, (2001), 1761 p.
- 157- Kaloustian, J. and Hadji-Minaglou, F., "La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée ", Springer Science & Business Media, (2013), 226 p.
- 158- Walton, N.J. and Brown, D.E. eds., "Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products", World Scientific, (1999), 425 p.
- 159- Gillard, S., "Les dihydrochalcones de la pomme (extraction, séparation et intérêt médical", thèse de doctorat, 2009.
- 160- Ducauze, C., "Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie: concepts, démarches et méthodes, Tec et Doc: Lavoisier, (2014), 366 p.
- 161- Pavia, D.L., Kriz, G.S., Lampman, G.M. and Engel, R.G., "A microscale approach to organic laboratory techniques", Cengage Learning, (2012), 1040 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 162- Ahmad, A., Alkarkhi, A.F., Hena, S., Siddique, B.M. and Dur, K.W., "Optimization of Soxhlet extraction of Herba Leonuri using factorial design of experiment", International Journal of Chemistry, V. 2, n°1, (2010), p.198.
- 163- Raman, N., "Phytochemical Techniques", New India Publishing, (2006), 318 p.
- 164- Khemani, L.D., Srivastava, M.M., Srivastava, S., "Chemistry of phytopotentials: health, energy and environmental perspectives", Springer Science and Business Media, (2011), 382 p.
- 165- Shanmugam, S., "Laboratory handbook on biochemistry", PHI Learning Pvt. Ltd, (2010), 141 p.
- 166- Folin, O. and Ciocalteu, V., "On tyrosine and tryptophane determinations in proteins", J. biol. Chem, V. 73, n° 2, (1927), 627- 650.
- 167- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", American journal of Enology and Viticulture, V. 16, n° 3, (1965), 144-158.
- 168- Oliveira, V.C., Moura, D.M., Lopes, J.A., de Andrade, P.P., da Silva, N.H. and Figueiredo, R.C., "Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes", Parasitology research, V. 104, n° 5, (2009), 1053-1059.
- 169- Babushok, V.I., Linstrom, P.J., Reed, J.J., Zenkevich, I.G., Brown, R.L., Mallard, W.G. and Stein, S.E., "Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds", Journal of Chromatography A, V. 1157, (2007), 414-421.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

170- Hübschmann, H.J., "Handbook of GC-MS: fundamentals and applications", John Wiley & Sons, (2015), 880 p.

171- Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F. and Koutsaftakis, A., Classification of virgin olive oils of the two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition, Journal of the American Oil Chemists' Society, V. 76, n° 5, (1999), 623-626.

172- Anonyme, "GC Derivatization" Pierce Applications Handbook & Catalog, (2003-2004).

173- Bouchonnet, S., "La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse", Tec & Doc Lavoisier, (2009), 212 p.

174- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", (1995), LWT-Food science and Technology, V. 28, n° 1, 25-30.

175- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T. and Wang, Z., Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chemistry, V.113, n° 1, (2009), 160-165.

176- Mamadalieva, N.Z., Sharopov, F., Girault, J.P., Wink, M. and Lafont, R., "Phytochemical analysis and bioactivity of the aerial parts of *Abutilon theophrasti* (Malvaceae), a medicinal weed", Natural product research, V. 28, n° 20, (2014), 1777-1779.

177- Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L. and Petrovečki, M., What we need to know when calculating the coefficient of correlation? , Biochemia Medica, V.17, n° 1, (2007), 10-15.

178- Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M., "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent", Nature protocols, V. 2, n° 4, (2007), 875-877.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

179- Paris, M. and Hurabielle, M., "Abrégés de matière médicale: Pharmacognosie (1) Généralités-Monographies ", Edition Masson, (1981),

180- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), "Réglementation des médicaments à base de plantes: la situation dans le monde", (1998), 59 p.

181- Meireles, M.A.A. ed., "Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications", CRC press, (2008), 464 p.

182- Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, H.K., Atmani, D., Verpoorte, R. and Choi, Y.H., "Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts", Industrial Crops and Products, V. 88, (2016), 65-77.

183- Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, D. and Benboubetra, M., "Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases", Journal of medicinal food, V. 13, n° 4, (2010), 896-904.

184- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S. and Chemat, F., "Essential Oils: From Conventional to Green Extraction. In Essential Oils as Reagents in Green Chemistry", Springer International Publishing, (2014), 71p.

185- Msou S., Alifriqui, M., Romane, A., Costa, J., "Potential antioxidant, chemical composition of essential oil and fatty acid profile of seeds of *Fraxinus dimorpha* coss & dur from the High Atlas Mountains of Morocco".

186- Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R., "Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants". Food chemistry, V.100, n° 4, (2007), 1409 -1418.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

187- Naczki, M. and Shahidi, F., (2006), "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis", *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, V. 41, n° 5, 1523-1542.

188- Messaritakis, I., Mazeris, A., Koutala, E. and Antoniou, M., "*Leishmania donovani* s.l.: Evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry", *Experimental Parasitology*, V.125, n° 4, (2010), 384-388.

189- Vanaerschot, M., Maes, I., Ouakad, M., Adai, V., Maes, L., De Doncker, S., Rijal, S., Chappuis, F., Dujardin, J.C. and Decuypere, S., "Linking in vitro and in vivo survival of clinical *Leishmania donovani* strains", *PLoS One*", V. 5, n° 8, (2010), e12211.

190- Macahig, R.A., Harinantenaina, L., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H., Takeda, Y. and Shinzato, T., "Glucosylated sesquiterpene alcohols from *Fraxinus griffithii*", *Natural product communications*, V. 7, n° 4, (2012), 467- 470.

191- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. and Maes, L., "Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept". *Journal of ethnopharmacology*, V. 106, n° 3, (2006), 290-302.

192- Mahmoud, T.S., Marques, M.R., Pessoa, C.D.Ó., Lotufo, L.V., Magalhães, H.I., Moraes, M.O.D., Lima, D.P.D., Tininis, A.G. and Oliveira, J.E.D., "In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 21, n° 3, (2011), 456-464.

193- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Durán, C., Stashenko, E. and Mesa-Arango, A., "In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*" *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 20, n° 5, (2010), 734-741.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 194- Yardley, V., Croft, S.L., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Koirala, S., Rijal, S., Miranda, C., Llanos-Cuentas, A. and Chappuis, F., "The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 73, n° 2, (2005), 272-275.
- 195- Baser, K.H.C. and Franz, C., "Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications", (2009), 991 p.
- 196- Omar, S.H., "Oleuropein in olive and its pharmacological effects", *Sci Pharm*, V. 78, n° 2, (2010), 133-154.
- 197- Efferth, T. and Kuete, V., "Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products", *Frontiers in pharmacology*, 1, (2010), 1-19.
- 198- Middleton, P., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., O'Rourke, C., Abdulrahman, A., Byres, M., Middleton, M., Kumarasamy, Y., Shoeb, M., Nahar, L., Delazar, A., and Sarker, S.D., "Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, V. 2, (2005), 81-86.
- 199- Poirot, R., "Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale", thèse de Doctorat, (2007), 129 p.
- 200- Kelly, G.S., "Squalene and its potential clinical uses", *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, V. 4, n° 1, (1999), 29-36.
- 201- Chan-Bacab, M.J. and Peña-Rodríguez, L.M., "Plant natural products with leishmanicidal activity", *Natural product reports*, V.18, n° 6, (2001), 674-688.
- 202- Okokon, J.E., Dar, A. and Choudhary, M.I., "Immunomodulatory, cytotoxic and antileishmanial activity of *Setaria megaphylla*", *International Journal of Phytomedicine*, V. 4, n° 2, (2012), 155-161.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 203- Shahidi, F., "antioxidants: chemistry, health effects, and applications", The American Oil Chemists Society, (1997), 414 p.
- 204- Liu, W.J. ed., "Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies", John Wiley & Sons, (2011), 448 p.
- 205- Fleurentin, J., Cabalion, P., Mazars, G., Dos Santos, j. et Younos, C., "Ethnopharmacologie: sources, méthodes, objectifs: actes du 1er Colloque européen d'ethnopharmacologie", Metz, Centre Internationale des Congrès, 23-25 mars 1990 IRD Editions, V. 1, (1991), 493 p.
- 206- Valeix, N., "Parasitologie Mycologie ", De Boeck Supérieur, (2016), 112 p.
- 207- Denis, F., "Bactériologie médicale : Techniques usuelles", Elsevier Masson, (2007), 573 p.
- 208- Wu, H., "Isolation and Characterization of Natural Products from Ginger and Allium Ursinum", ProQuest, (2007), 139 p.