

UNIVERSITE SAAD DAHLAB 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 : *Globularia alypum* L.

ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES

Par

Reda BEHLOULI

Devant le jury composé de :

Mme F. SAIDI

Mme N. SMAIL-SAADOUN

Mme G. TAIL

Mme F.Z. KARA

Professeur USDB

Professeur UMMTO

Professeur USDB

Professeur USDB

Présidente

Examinatrice

Examinatrice

Promotrice

Blida, décembre 2017

RESUME

Espèce végétale endémique à la région méditerranéenne, *Globularia alypum* y est connue depuis fort longtemps pour ses usages médicinaux multiples. Dans le présent travail de recherche, notre intérêt s'est porté sur l'évaluation de l'activité anti-leishmanienne et anti-oxydante, ainsi que sur l'analyse du profil phytochimique de six produits bruts d'extraction (aqueux, méthanoliques et étheriques) et de deux huiles essentielles, obtenus à partir des deux organes végétaux récoltés (feuilles et inflorescences de la plante). Nos principaux résultats ont mis en évidence l'existence d'une activité leishmanicide avérée de l'extrait étherique des feuilles (EE1), et celui des inflorescences (EE2) sur la forme promastigote du parasite. Sur les cinq différentes souches leishmaniennes ayant fait l'objet de tests, les meilleures concentrations inhibitrices à 50% (CI50) déterminées sont celles relatives à la souche *Leishmania donovani*-LDD8 (89,7 et 24,8 µg/ml, respectivement pour les extraits bruts EE1 et EE2). La détermination des indices de sélectivité (IS) de EE1 et EE2 par l'estimation de leur cytotoxicité sur des cellules de lignée humaine (THP1) transformées nous suggère que la toxicité induite de ces extraits serait sélective envers les *Leishmania spp.* (IS de EE1 >2,8 et celui de EE2 >10,1 concernant la souche *L. donovani*-LDD8). S'agissant de l'activité antioxydante, l'extrait méthanolique des inflorescences (EM2) a révélé le plus fort potentiel antioxydant parmi les échantillons testés (indice du potentiel anti-radicalaire (IPAR) = 1,3 [µg AO/µg DPPH]⁻¹). La capacité anti-oxydante de nos extraits serait positivement corrélée avec leur teneur en polyphénols totaux respectives (r=0,956 ; p= 0,0109). Celle-ci serait comprise, en fonction des extraits dosés, entre 5,85 à 186,21 mg EAG/g d'extrait. D'autre part, le criblage phytochimique préliminaire de l'ensemble des extraits bruts ainsi que l'analyse par la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-SM) portée sur les huiles essentielles et extraits étheriques EE.1 et EE.2, nous ont renseigné sur la nature phytochimique différentielle des échantillons testés et permis l'identification d'un certain nombre de molécules bioactives pouvant éventuellement être à l'origine des activités observées.

MOTS-CLES : *Globularia alypum*, extraits bruts, huiles essentielles, phytochimie, CG-SM, activité antileishmanienne, activité antioxydante, cytotoxicité.

ملخص

عرف الصنف النباتي، المستوطن في المنطقة المتوسطة، *Globularia alypum* لميزاته الطبية المتعددة منذ القدم. ارتأينا من خلال هذا البحث العلمي إلى تقييم نشاط المضاد للأكسدة والمضاد للاشمانيا، إضافة إلى دراسة فيتوكيميائية لستة مستخلصات وزيتين أساسيين استخرجوا من عضوين جمعا من هذه النبتة (الأوراق والأزهار). نتائجا الرئيسية كشفت وجود نشاط مييد للاشمانيا بارز ينسب للمستخلصين الايثريين المستخرجين من الأوراق (EE1) والأزهار (EE2) وذلك على الطفيل ذو الشكل السوطي (promostigotes).

من بين السلالات المختبرة الخمس، أفضل تراكيز مثبطة ل 50% (CI50) المحصلة عليها هي تلك التي تنسب للسلالة *Leishmania donovani* LDD8 (24,8 و 89,7 ميكروغرام /ملل ل EE1 و EE2). استنتاج المؤشرات الانتقائية (IS) للمستخلصات EE1 و EE2 من خلال تقدير السمية الخلوية للمستخلصين (EE1 و EE2) على سلالة خلايا بشرية (THP1) محولة، سمح لنا باقتراح أن نشاطهما السمي يمتاز بالصفة الانتقائية ضد الطفيل اللشمانيا.

فيما يخص النشاط ضد التأكسدي، المستخلص الميثالوني للأزهار (EM2) اظهر أقوى نشاط (مؤشر القدرة ضد الجذرية (IPAR) = 1.3 [ميكروغرام من مكون ضد تأكسدي/ميكروغرام DPPH⁻¹].

و قد تبين لنا أن القدرة ضد تأكسدية لمستخلصاتنا مرتبطة إيجابيا مع محتوهم الكامل للمتعدد الفينولات ($p=0.0109$; $r=0.956$).

يقدر هذا المحتوى ما بين 5.85 و 186.21 مغ معادل حمض غاليك / غ من المستخلص. من جهة أخرى، اختبارات الكشف الفيتوكيميائية الأولية لجميع المستخلصات، بجانب إلى التحليل عن طريق الكروماتوغرافيا الغازية المتصلة بمطياف الكتلة للزيوت الأساسية و المستخلصات الإثيرية، سمح لنا بالتطلع على الطبيعة الفيتوكيميائية الفرقة للعينات المختبرة بالإضافة إلى عدد معين من المكونات ذو فعالية بيولوجية و التي قد تكون ذات صلة مع النشاطات الملاحظة.

الكلمات الرئيسية : *Globularia alypum* ، مستخلصات، زيوت أساسية، الفيتوكيميا، الكروماتوغرافيا الغازية المتصلة بمطياف الكتلة، نشاط المضاد للأكسدة، نشاط المضاد للاشمانيا، السمية الخلوية.

ABSTRACT

Vegetal species endemic to the Mediterranean region, *Globularia alypum* has been known for a long time for its multiple medicinal uses. In the present research work, our interest focused on the evaluation of the antileishmanial and antioxidant activities as well as the phytochemical profile analysis of six crude extraction products (aqueous, methanolic and etheric extracts) and two essential oils obtained from the two harvested plant drugs (leaves and inflorescences). Our main results have demonstrated the existence of a leishmanicidal activity of the leaves and inflorescences ether extracts (EE1 and EE2) on the promastigote form of the parasite. Of the five different Leishmanian strains tested, the best half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were those determined for the *Leishmania donovani*-LDD8 strain (89,7 and 24,8 µg/ml, respectively for the crude extracts EE1 and EE2). The determination of the selectivity index (SI) of EE1 and EE2, by the estimation of their cytotoxicity on transformed human linear cells (THP1), suggests that the induced toxicity of these extracts would be selective towards *Leishmania spp.* (for the strain *L. donovani*-LDD8 the SI value of EE1 and EE2 was respectively higher than 2,8 and 10,1). Concerning the antioxidant activity, the methanolic extract of the inflorescences (EM2) revealed the highest antioxidant potential among the samples tested (antioxidant activity index (AAI) = 1,3 [µg AO/µg DPPH]⁻¹). The antioxidant capacity of our extracts would be positively correlated with their respective total polyphenol content ($r = 0.956$, $p = 0.0109$). The latter would be between 5.85 and 186.21 mg AGE /g of extract. Moreover, the preliminary phytochemical screening of the crude extracts as well as the analysis by gas chromatography coupled with mass spectroscopy (GC-MS), carried on the essential oils and ether extracts EE.1 and EE.2, informed us about the differential phytochemical nature of the samples and allowed the identification of a number of bioactive molecules that could possibly be responsible for the observed activities.

KEYWORD : *Globularia alypum*, crude extracts, essential oils, phytochemistry, GC-MS, antileishmanial activity, antioxidant activity, cytotoxicity

DEDICACES

« ... A la mémoire de mon Père ».

REMERCIEMENTS

L'accomplissement de ce travail n'aurait pu aboutir sans la participation de nombreuses personnes. J'adresse en premier lieu mes sincères remerciements à :

Ma promotrice Pr. F.Z. KARA qui a dirigé, surveillé le déroulement et l'exécution de ce travail, en mettant à ma disposition son entière attention, son aide, et son soutien moral.

Pr F. SAIDI qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté de présider le jury et qui sans sa rigueur, son impartialité et son sens aigu des responsabilités, ce projet de Magister n'aurait pu voir le jour.

Pr N. SMAIL-SAADOUN et Dr G. TAIL, d'avoir bien voulu juger ce mémoire.

Je remercie de même Mme F. BRIKI, Université de SAAD DAHLAB, pour sa contribution à l'identification taxonomique de la plante objet du thème de recherche.

Mes remerciements vont également à l'adresse des institutions publiques qui m'ont permis de concrétiser, en partie, les objectifs de notre travail expérimental. Je cite en particulier :

M. M. KHEMISSI, Institut National de la Recherche Forestière (INRF), pour son accueil et la confiance qui m'a accordée au sein de son unité de recherche.

Melle G. RAHILI, responsable du Laboratoire d'Extraction des Huiles Essentielles de l'INRF, que je ne saurai suffisamment remercier pour toute l'aide, le soutien et l'amabilité qu'elle a pu exprimer à mon égard.

Pr Z. HARRAT, responsable du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Population de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire et pour son appui inestimable.

Mme N. EDDAIKRA, Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Population de l'IPA, pour l'excellence de son encadrement et toutes les connaissances techniques acquises en sa présence.

Dr F. DERRAR, responsable du Centre National de Référence pour la Grippe (IPA), pour ses grandes qualités humaines et son aide très précieuse dont j'ai souvent eu recours.

Dr K. BACHARI, Directeur du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), d'avoir aimablement consenti à me compter parmi les stagiaires du Centre.

Mme N. TAIBI, responsable de la Division Santé du CRAPC, pour sa contribution indéniable à la réalisation du projet de recherche.

J'exprime aussi ma parfaite reconnaissance envers Dr A. CHERRALLAH, Université des Sciences et Technologies de HOUARI BOUMEDIENE, et Dr M.Z. RAHIM, Université de M'HAMED BOUGARA, pour leur valeureux soutien et extrême sympathie manifestée à ma personne.

Mes vifs remerciements sont également présentés à Mme R. BENSALÉM et Mme M.F. HAMANA, du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche pour leur affabilité et précieuses orientations, ainsi qu'à Melle S. AZOUANI, de l'Observatoire National de l'Environnement et du Développement Durable, pour son accueil et aide très appréciables.

Ont droit à ma profonde gratitude, M. A. BOUMECHHOUR du CRAPC, Melle I. RAMLI de l'Université des Frères MENTOURI, Melle T. DAHMAN de l'Institut de Technologie et Moyens Agricoles Spécialisés, Mme S. BERKA de l'INRF, Melle S. CHABANE de l'Université de SAAD DAHLAB, Melle S. BELMERI, M. M. ABOUMUSTAPHA, M. M. BOUHENNA et M. F. SAID OTHMANI du CRAPC, ainsi que Melle R. MEBARKI et Melle I. AIT HAMMOUDA du Commissariat National du Littoral pour leur honorable contribution ainsi que toute l'équipe du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Population de l'IPA.

Je termine par remercier particulièrement ma chère mère, ma sœur, mon frère, mon oncle Omar et sa femme Malika, tonton Rezki, mes amis Youcef et Zine Eddine, mon cousin Djamel, M^{elle} Yasmina FADLI ainsi que l'ensemble des collègues de la post-graduation qui ont participé de différentes manières à l'accomplissement de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

RESUMES

DEDICACES

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

GLOSSAIRE

INTRODUCTION.....	18
CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
I. DESCRIPTION BOTANIQUE ET PHYTOCHIMIQUE	
DE <i>Globularia alypum</i> L.....	21
I.1. Classification.....	21
I.2. Caractères morphologiques.....	22
I.2.1. Caractères morphologiques de l'appareil végétatif.....	22
I.2.2. Caractères morphologiques de l'appareil reproducteur	22
I.3. Croissance végétative et floraison	25
I.4. Distribution géographique et autécologie.....	25
I.5. Profil phytochimique.....	26
II. POTENTIALITES PHYTOTHERAPEUTIQUES DE <i>Globularia alypum</i> L.	26
II.1. Données ethnobotaniques.....	26
II.1.1. Dénominations.....	26
II.1.2. Période de récolte	27
II.1.3. Usages thérapeutiques traditionnels	27
II.1.3.1 Indications antiparasitaires et antileishmanienne	27
II.1.3.2 Autres indications thérapeutiques.....	27

II.2. Investigations antérieures sur les activités biologiques d'intérêt pharmacologique.....	28
II.3. Etudes toxicologiques.....	28
III. STRESS OXYDANT ET MOLECULES ANTI-RADICALAIRES.....	31
III.1. Formation et rôles biologiques des radicaux libres.....	31
III.2. Effets délétères des radicaux libres.....	32
III.3. Défenses antioxydantes de l'organisme.....	32
III.4. Implications physiopathologiques des radicaux libres	33
III.5. Mécanismes d'action des composés antioxydants.....	34
IV. EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES ET TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES.....	35
IV.1. Etiologie et formes cliniques.....	35
IV.2. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	37
IV.2.1. Au niveau mondial.....	37
IV.2.2. En Algérie.....	38
IV.3. Classification et caractères biologiques de l'agent pathogène.....	40
IV.3.1. Classification.....	40
IV.3.2. Caractères morphologiques et cycle biologique.....	42
IV.3.3. Caractères structuraux et biochimiques majeurs.....	44
IV.4. Traitements anti-leishmaniens.....	46
CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES.....	49
I. CADRE DU TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	50
II. SITE DE RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL.....	50
III. MATERIEL VEGETAL.....	53
III.1. Identification de la plante.....	53
III.2. Période de collecte et conditions de séchage.....	53
III.3. Description visuelle et biométrique des organes végétaux étudiés.	53
IV. EXTRACTIONS DES METABOLITES SECONDAIRES.....	54

IV.1. Extraction des composés volatils.....	54
IV.1.1. Principe de l'hydrodistillation par l'appareil de Clevenger	54
IV.1.2. Mode opératoire.....	55
IV.2. Extraction des composés non volatils.....	56
IV.2.1. Préparation des extraits bruts aqueux.....	56
IV.2.1.1. Principe de la décoction.....	56
IV.2.1.2. Mode opératoire.....	56
IV.2.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques et éthériques.....	57
IV.2.2.1. Principe de l'extraction par l'appareil de Soxhlet.....	57
IV.2.2.2. Mode opératoire.....	58
IV.3. Dosage de la teneur en humidité des organes végétaux séchés et calcul des rendements des extractions.....	59
V. ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	60
V.1. Criblage phytochimique préliminaire.....	60
V.1.1. Mise en évidence des sucres réducteurs.....	61
V.1.2. Mise en évidence des tannins.....	61
V.1.3. Mise en évidence des flavonoïdes.....	61
V.1.4. Mise en évidence des alcaloïdes.....	62
V.1.5. Mise en évidence des glycosides cardiotoniques.....	62
V.1.6. Mise en évidence des saponosides.....	62
V.1.7. Mise en évidence des mucilages.....	63
V.2. Détermination de la teneur des extraits bruts en composés phénoliques totaux.....	63
V.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	64
V.4. Analyse de la composition chimique des extraits étheriques.....	65
V.4.1. Dérivation chimique des extraits.....	66
V.4.2. Chromatographie des extraits dérivatisés.....	66
VI. EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	67

VI.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	67
VI.2. Evaluation de l'activité anti-leishmanienne.....	69
VI.2.1. Conditions de culture des parasites et détermination des jours de récolte.....	70
VI.2.2. Tests d'inhibition <i>in vitro</i> de la croissance des parasites en milieu liquide.....	71
VI.2.3. Evaluation de la cytotoxicité	73
VI.2.4. Détermination de l'indice de sélectivité.....	74
VII. ANALYSE STATISTIQUE ET ILLUSTRATION GRAPHIQUE DES RESULTATS.....	74
CHAPITRE 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	76
I. DESCRIPTION VISUELLE ET BIOMETRIQUE DES ORGANES VEGETAUX ETUDIES.....	77
I.1. Résultats.....	77
I.2. Discussion.....	79
II. EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES.....	80
II.1. Résultats.....	80
II.2. Discussion.....	82
III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	83
III.1. Résultats du criblage phytochimique préliminaire	83
III.2. Résultats de la détermination de la teneur des extraits bruts en composés phénoliques totaux.....	85
III.3. Résultats des analyses chromatographiques.....	87
III.3.1. Analyse des huiles essentielles.....	87
III.3.2. Analyse des extraits étheriques.....	95
III.4. Discussion.....	100
IV. ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	107

IV.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	107
IV.1.1. Résultats.....	107
IV.1.2. Discussion.....	112
IV.2. Evaluation de l'activité anti-leishmanienne.....	115
IV.1.1. Résultats.....	115
IV.1.2. Discussion.....	126
V. DISCUSSION GENERALE	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	135
ANNEXES.....	137
A. Liste des abréviations.....	138
B. Synthèse des résultats des principales études phytochimiques antérieures menées sur les extraits de <i>Globularia alypum</i> L.....	139
C. Synthèse des usages thérapeutiques traditionnels de <i>Globularia alypum</i> L.....	141
D. Liste du matériel non biologique utilisé aux laboratoires.....	143
E. Composition des milieux de culture	145
F. Méthodes utilisées pour le dénombrement cellulaire par contage direct	147
G. Structure chimique des composés identifiés par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	149
H. Résultats du criblage préliminaire des extraits vis-à-vis de leur activité leishmanicide.....	153
I. Résultats de l'analyse statistique des données.....	154
REFERENCES.....	162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Travaux antérieurement publiés sur les activités biologiques de <i>Globularia alypum</i> L.	29
Tableau 1.2	Tropisme habituel et exceptionnel de quelques espèces anthropophiles des <i>Leishmania spp.</i>	37
Tableau 1.3	Complexes d'espèces <i>Leishmania spp.</i> responsables d'infections chez les mammifères.....	41
Tableau 1.4	Mode d'action, efficacité et effets secondaires des principaux traitements anti-leishmaniens.	48
Tableau 2.1	Poids et mensurations des organes végétaux séchés.....	79
Tableau 2.2	Résultats des rendements d'extractions et caractéristiques visuelles des extraits et huiles essentielles obtenus.....	81
Tableau 2.3	Résultats du criblage phytochimique préliminaire.....	84
Tableau 2.4	Identification des composés constituant l'huile essentielle des feuilles.....	89
Tableau 2.5	Identification des composés constituant l'huile essentielle des inflorescences.....	91
Tableau 2.6	Identification des composés constituant l'extrait étherique des feuilles.....	96
Tableau 2.7	Identification des composés constituant l'extrait étherique des inflorescences.....	96

Tableau 2.8	Résultats de l'activité anti-oxydante des extraits et huiles essentielles.....	109
Tableau 2.9	Paramètres de la corrélation et de la régression linéaire simple des données de l'activité anti-oxydante et des teneurs en composés phénoliques.....	111
Tableau 2.10	Paramètres de la cinétique de culture des cinq isolats parasitaires en milieu RPMI complet.....	115
Tableau 2.11	Concentrations inhibitrices à 50% de la croissance parasitaire relatives aux extraits EE1 et EE2.....	122
Tableau 2.12	Indices de sélectivité inhérents à l'activité antileishmanienne des extraits étheriques.....	126

LISTE DES TABLEAUX ANNEXES

Tableau I	Résultats des principales études phytochimiques antérieures menées sur les extraits de <i>Globularia alypum</i> L.....	139
Tableau II	Usages thérapeutiques traditionnelles de <i>Globularia alypum</i> L.	141
Tableau III	Résultats du criblage préliminaire des extraits vis-à-vis de leur activité leishmanicide.....	153

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Caractères morphologiques de <i>Globularia alypum</i> L.	24
Figure 1.2	Manifestations cliniques des leishmanioses.....	36
Figure 1.3	Répartition géographique des leishmanioses.....	38
Figure 1.4	Répartition des leishmanioses en Algérie et dans les pays voisins.....	40
Figure 1.5	Cycle biologique de l'agent causal des leishmanioses.....	43
Figure 1.6	Représentation schématique des caractères morphologiques et structuraux du parasite.....	45
Figure 2.1	Localisation géographique et image satellitaire du périmètre de récolte.....	51
Figure 2.2	Site de récolte.....	52
Figure 2.3	Schématisation de l'appareil de type Clevenger.....	55
Figure 2.4	Schématisation de l'appareil de type Soxhlet.....	58
Figure 2.5	Test de piégeage du radical libre DPPH• mené en microplaque (96 puits).....	68
Figure 2.6	Test d'inhibition de la croissance parasitaire mené en microplaque (96 puits).....	72
Figure 3.1	Observations effectuées sur les organes végétaux étudiés.....	77

Figure 3.2	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	86
Figure 3.3	Histogramme de la teneur en polyphénols des extraits bruts.....	87
Figure 3.4	Chromatogramme produit à l'analyse de l'huile essentielle des feuilles.....	93
Figure 3.5	Chromatogramme produit à l'analyse de l'huile essentielle des inflorescences.....	94
Figure 3.6	Représentation en secteurs et barres des groupes chimiques constituant les huiles essentielles.....	95
Figure 3.7	Chromatogramme produit à l'analyse de l'extrait étherique des feuilles.....	98
Figure 3.8	Chromatogramme produit à l'analyse de l'extrait étherique des inflorescences.....	99
Figure 3.9	Courbe de calibration du DPPH en solution méthanolique.....	107
Figure 3.10	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des échantillons.....	108
Figure 3.11	Ajustement des données de l'activité anti-oxydante et des teneurs en composés phénoliques au model linéaire simple.....	111
Figure 3.12	Courbes des cinétiques de croissance des isolats parasites en milieu RPMI complet.....	116
Figure 3.13	Champs d'observation microscopiques de <i>L. donovani</i> après 18 heures de culture en absence et en présence de l'extrait EE.1.....	117

Figure 3.14	Représentation graphique des résultats du criblage préliminaire des extraits en fonction de l'inhibition de la croissance parasitaire.....	119
Figure 3.15	Pourcentages d'inhibition parasitaire en fonction des concentrations des extraits.....	121
Figure 3.16	Histogramme des résultats de l'activité cytotoxique des extraits étheriques.....	124
Figure 3.17	Champs d'observation microscopiques des cultures de THP1 (transformées) incubées à différentes concentrations des extraits étheriques.....	125

LISTE DES FIGURES ANNEXEES

Figure I	Représentation schématique de la cellule de Thoma.....	147
-----------------	--	-----

GLOSSAIRE

Adénopathie : inflammation des ganglions lymphatiques induisant une augmentation de leur volume.

Alzheimer : maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire.

Anthroponose : maladie infectieuse strictement humaine.

Autécologie : étude des exigences de l'espèce, considérée isolément, vis-à-vis des facteurs du milieu (vivant et non vivant).

Carcinogène : facteur provoquant ou sensibilisant l'apparition d'un cancer.

Granulomatose chronique : maladie héréditaire liée au chromosome X induisant un déficit de l'immunité non spécifique pour cause d'un dysfonctionnement du métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires.

Hépatomégalie : augmentation pathologique du volume du foie.

Incidence d'une maladie : nombre de cas apparus pendant une année au sein d'une population.

Macule : lésion primitive correspondant à une tache dyschromique, sans relief, ni infiltration.

Maladie endémique : maladie constamment présente dans une population donnée, souvent inféodée à une origine géographique précise.

Mélange azéotrope : mélange qui présente, pour une composition particulière, une phase vapeur ayant la même composition que la phase liquide avec un point d'ébullition différent du point d'ébullition des constituants purs.

Nodule : lésion solide, surélevée, de plus d'un centimètre de diamètre qui envahit en général les couches les plus profondes de la peau.

Pancytopénie : diminution du nombre de tous les éléments cellulaires du sang.

Papule : petite lésion surélevée qui a une consistance solide à la palpation.

Procarcinogène : toute molécule qui se transforme en un composé carcinogène par le métabolisme.

Réservoir (épidémiologie) : organismes (humains et animaux) qui fournissent à un microorganisme pathogène des conditions favorables à sa survie et à sa propagation.

Rhumatisme : terme non-spécifique désignant une affection des articulations et des tissus conjonctifs.

Sclérose latérale amyotrophique : maladie neurodégénérative caractérisée par une paralysie musculaire progressive due à une dégénérescence des motoneurones du cortex moteur primaire, de la voie corticospinale, du tronc cérébral et de la moelle épinière.

Splénomégalie : augmentation pathologique du volume de la rate.

Syndrome de détresse respiratoire aigue : atteinte pulmonaire grave caractérisée par une altération majeure de la fonction et de la structure des poumons (expansibilité).

Zoonose : maladie infectieuse dont l'agent se transmet des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa.

INTRODUCTION

Des millénaires durant, les populations humaines n'ont cessé d'utiliser la ressource végétale pour se soigner ; à l'ère du paléolithique déjà des indices sur l'usage des végétaux à des fins médicinales ont dans de nombreux sites été découverts [1 ; 2 ; 3].

Les plantes médicinales contiennent une large variété de principes actifs qui sont jusqu'à présent exploités par la majorité de la population mondiale pour diverses affections [4 ; 5]. Outre leurs usages traditionnels, la chimiodiversité remarquable que recèle cette ressource biologique représente un important pôle d'identification de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique [6 ; 7]. L'utilisation récente de méthodes biotechnologiques dans la sélection, l'analyse, la multiplication et l'amélioration des plantes médicinales a eu pour conséquence l'émergence de nouvelles perspectives dans le développement de produits pharmaceutiques, notamment en ce qui concerne les molécules caractérisées par une complexité structurale et une stéréospécificité particulière [4].

La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers, un criblage systématique des espèces végétales (criblage à haut-débit), ou toute combinaison de ces approches [8].

Les potentialités de recherche sont d'autant plus importantes que seul 6% du total estimé de 250 000 plantes supérieures ont été étudiées pour leur éventuelles activités biologiques, tandis que 15% d'entre elles ont fait l'objet d'investigations phytochimiques [9].

Haut lieu de la diversité biologique au regard de son fort taux d'endémisme, la région méditerranéenne abrite à elle seule environ 10% de l'ensemble des plantes supérieures recensées à l'échelle mondiale, avec pas moins de 406 espèces citées par les pharmacopées traditionnelles, à l'exemple de la plante médicinale *Globularia alypum* L. (Plantaginaceae) endémique au pourtour méditerranéen [10 ;

11]. Cette dernière, dénommée « Tasselgha » par les populations locales algériennes notamment, y est anciennement connue pour ses usages médicaux multiples et compte, dans nos régions, parmi les plantes les plus utilisées traditionnellement à des fins thérapeutiques. A juste titre, *Globularia alypum* L. a antérieurement fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux portés sur ses activités biologiques [11].

Dans notre projet de recherche, la combinaison des deux approches ethnopharmacologique et chimiotaxonomique a été adoptée en vue de contribuer à la mise en valeur du potentiel pharmacologique antileishmanien et anti-oxydant des composés bioactifs inhérents aux feuilles et inflorescences de *Globularia alypum* L. En concordance avec l'évaluation de ces deux activités biologiques, une étude phytochimique orientée a également été réalisée sur les deux organes végétaux.

Ces objectifs ainsi visés découlent des orientations de recherche du Laboratoire Santé, Environnement et Biotechnologies de l'Université de Saad DAHLAB de Blida et s'inscrivent, par ailleurs, dans la problématique d'inexistence de traitements anti-leishmaniens pleinement satisfaisants en termes d'efficacité et d'innocuité toxicologique ainsi que par le besoin grandissant d'identification de nouveaux métabolites anti-radicalaires représentant potentiellement une alternative aux composés antioxydants de synthèse.

La structure de ce mémoire s'articule autour de trois chapitres correspondants respectivement à : une synthèse d'une étude bibliographique approfondie sur la plante médicinale *G. alypum* L. et les pathologies en relation avec les activités biologiques évaluées dans ce travail ; une description du matériel et des méthodes utilisés ; ainsi qu'à une présentation et discussion des principaux résultats obtenus.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I. DESCRIPTION BOTANIQUE ET PHYTOCHIMIQUE DE *Globularia alypum* L.

I.1. Classification

Classification classique [12 ; 13]		Classification phylogénétique [14 ; 15 ; 16]	
Règne :	<i>Plantae</i>	Clade :	Angiospermes
Super-Phylum :	<i>Spermatophyta</i>	Clade :	Eu-dicotylédones
Phylum :	<i>Magnoliophyta</i>	Clade :	Superastéridées
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>	Clade :	Astéridées
Sous-Classe :	<i>Asteridae</i>	Clade :	Lamiidées
Ordre :	<i>Scrophulariales</i>	Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Globulariaceae</i>	Famille :	<i>Plantaginaceae</i>
Genre :	<i>Globularia</i>	Tribu :	<i>Globularieae</i>
Espèce :	<i>Globularia alypum</i> L.	Genre :	<i>Globularia</i>
		Espèce :	<i>Globularia alypum</i> L.

Classiquement, les Globulariacées forment une petite famille regroupant deux genres : *Globularia* L. et *Poskea* Vatke. Ce sont des plantes vivaces arbustives ou herbacées possédant des feuilles sans stipules, une inflorescence généralement en capitule, rarement en épi (*Poskea*) et des fleurs zygomorphiques à ovaire uniloculaire [17 ; 18].

A la suite de nombreux travaux de phylogénie moléculaire, les genres de l'ancienne famille des *Globulariaceae* ont été regroupés en tribu des « *Globularieae* » et incorporés dans la famille des *Plantaginaceae* (*sensu* APG II) appartenant à l'ordre des *Lamiales*. Certains auteurs ont proposé de modifier la dénomination « *Plantaginaceae* » donnée à ce groupe élargi afin de lui préserver son acception traditionnelle en le remplaçant par un nom de famille inusité « *Veronicaceae* » [19 ; 20 ; 21].

Selon la systématique moléculaire, cette famille rassemblerait 112 genres et 1750 espèces cosmopolites, mais mieux diversifiées dans les zones tempérées [22]. Ce sont des plantes autotrophes, herbacées ou plus rarement arbrisseaux, parfois

aquatiques. Le monophylétisme des *Plantaginaceae* est attesté par les caractères de l'ADN chloroplastique [23]. L'étude phylogénétique portée sur les *Lamiales*, atteste d'un fort lien de parenté entre les deux genres *Globularia* et *Poskea* (*Globularieae*) et suggère, par ailleurs, un lien avec le genre *Campylanthus* (traditionnellement placé dans la famille *Digitalideae*) en tant que groupe monophylétique sœur [20 ; 21 ; 24].

Le genre *Globularia* L. comprend une trentaine d'espèces arbustives ou herbacées à inflorescences en capitules globuleux. Les plantes appartenant à ce genre sont essentiellement rencontrées en région méditerranéenne ; les limites de leur distribution s'étendent, néanmoins, jusqu'aux îles Suédoises vers le nord et jusqu'aux îles Cap-Verdiennes aux limites méridionales [25 ; 26 ; 27].

Ce genre est représenté dans la flore algérienne par deux espèces : *Globularia alypum* L. (= *G. alypum* L. ssp. *eu-alypum* L.) et *Globularia eriocephala* Pomel (= *G. vesceritensis* Batt. = *G. alypum* L. ssp. *arabica* (Jaub. et Spach) Maire) [13].

I.2. Caractères morphologiques

I.2.1. Morphologie de l'appareil végétatif

Arbrisseau à feuillage persistant, formant des buissons de 30 à 60 cm de hauteur (figure 1.1 : a). Racine sèche et rameuse. Souche épaisse, courte, tortueuse, émettant en avant plusieurs tiges ascendantes, dressées, feuillées dans toute leur longueur, couvertes sur le vieux bois d'une écorce inégale d'un brun cendré. Rameaux nombreux, les plus jeunes à écorce rougeâtre (figure 1.1 : b) [28 ; 29].

Feuilles alternes ou fasciculées, de 0,5 à 2 cm de long, exstipulées, plus ou moins oblancéolées-cunéiformes, entières ou tridentées, mucronulées au sommet, coriaces et glabres (figure 1.1 : b) [13 ; 28 ; 30].

I.2.2. Morphologie de l'appareil reproducteur

Fleurs pentamériques, zygomorphes, hermaphrodites, réunies en capitules denses atteignant 1,5 cm de diamètre et disposés le long et au sommet des tiges (figure 1.1 : c et d) [13 ; 31 ; 32]. Involucre composé de bractées ovales-oblongues, mucronulées au sommet, scarieuses, ciliées sur les bords, disposées sur plusieurs rangs. Réceptacle hémisphérique, calice tubuleux légèrement

recourbé, profondément quinquefide, garni sur leur face externe de longs poils blanchâtres [28 ; 33]. Corolle bleue violacée (très rarement blanche) bilabiées, à lèvre très inégales ; la supérieure petite, bifide, parfois entière, d'autre fois nulle ; l'inférieure très longue et trifide. Androcée à 4 étamines didynames insérées sur la corolle [13 ; 33]. Anthères elliptiques-réniformes, fixées par le dos, s'ouvrant par une fente unique longitudinale. Pollen à grains elliptiques lorsqu'ils sont secs, lisses, parcourus de trois sillons longitudinaux, devenant presque sphériques lorsqu'on les mouille [28]. Ovaire supère uniloculaire uniovulé. Fruits akéniens [13 ; 31 ; 32]. La formule florale s'exprimera donc comme suit [34] :

$$\uparrow S_{(5)} \quad P_{(5)} \quad A_4 \quad \underline{G}1$$



Figure 1.1 : Caractères morphologiques de *Globularia alypum* L. (originale, octobre 2013) ;
 a : partie aérienne (échelle : 30 cm), b : tiges et feuilles, c : disposition des inflorescences tout au long des tiges,
 d : sommité fleurie

I.3. Croissance végétative et floraison

La croissance végétative de l'espèce survient deux fois par an : au printemps (de mars jusqu'à juin) et en automne (de septembre à novembre) [35]. Les bourgeons floraux se forment également durant ces deux saisons. Leur développement est, cependant, conditionné par la magnitude des précipitations et des températures enregistrées pendant ces deux saisons [36].

La floraison peut, de ce fait, se dérouler en deux ou en une seule période. Dans le premier modèle (floraison bimodale), le développement des bourgeons floraux du printemps, a lieu du début août jusqu'à octobre, puis vient le développement des bourgeons d'automne qui débute vers le mois d'octobre et prends fin au début du printemps (mars/avril) [36 ; 37].

Dans le second modèle (floraison unimodale), la plante fleurie plus ou moins durant 7 mois ; d'octobre jusqu'au mois d'avril [31 ; 36].

I. 4. Distribution géographique et autécologie

D'origine et d'une aire de répartition entièrement méditerranéenne, *Globularia alypum* L. est à la fois une espèce à comportement héliophile et thermophile [32 ; 38]. Elle est présente dans les pays d'Afrique du Nord, ainsi que dans certains pays d'Europe méridionale et jusqu'en Asie mineure. En Algérie, la présence de l'espèce est assez commune [13 ; 39].

Le biotope de l'espèce est, par ailleurs, caractérisé par un milieu à bilan hydrique généralement déficitaire (régions subhumides à arides) et par des sols rocailleux, marneux (rarement siliceux) et pauvres en matière organique [32 ; 40].

Dans son habitat naturel, la plante développe une symbiose ectomycorhizienne [41]. Elle est le plus fréquemment rencontrée dans les forêts dégradées et les pinèdes claires de pins d'Alep où elle y est souvent associée au ciste et au romarin [40 ; 42 ; 43]. *Globularia alypum* L. n'est pas portée sur la liste des espèces végétales protégées en Algérie (décret exécutif n° 12-03 du 4 janvier 2012) ni celle de la liste des espèces menacées d'extinction établie par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) [44 ; 45].

I. 5. Profil phytochimique

Les recherches menées sur le profil phytochimique de *Globularia alypum* L. mettent essentiellement en évidence la présence de métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique (les résultats des travaux antérieurs menés sur la phytochimie de l'espèce sont synthétisés dans le tableau de l'annexe B). Parmi ces métabolites, sont cités, de nombreux composés flavoniques (flavones, flavonols et flavonones), des acides phénoliques, des tannins [46 ; 47 ; 48], des terpènes, des iridoïdes, des phénylethanoïdes, des lignanes, des hétérosides, de la syringine [49 ; 50 ; 51], du mannitol ainsi que du mucilage issu du métabolisme primaire [52].

S'agissant de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles, celle-ci est caractérisée notamment par la présence du palmitate, du 1-octen-3-ol, du phytol (isomère), de l'eugénol, de l' α -terpineol, du L-camphor et du L-linalol [49].

L'hydrolat, obtenu après hydrodistillation des feuilles, contiendrait, entre autres molécules, de l'eugénol, de l'isoeugénol, du camphor, du viridiflorol, α -cadinol, α -terpineol et de l'aromadendrene [53].

II. POTENTIALITES PHYTOTHERAPEUTIQUES DE *Globularia alypum* L.

II. 1. Données ethnobotaniques

II.1.1. Dénominations

- **Noms berbères** : *Aselgha, Tasselra, Taselga, Aselga, Selgha* [39 ; 43].
- **Noms arabes / arabes dialectales** : *Ayn lerneb, Chebra, Sannâ baladi, Alûbun, Aynûn, Hallab rwa, Masriga, Zerga, Zriga, Zouitna* [39 ; 54 ; 48].
- **Noms français** : *Globulaire, Globulaire buissonnante, Globulaire turbith, Turbith, Turbith blanc, Séné de Provence, Alypon, Herbe terrible* [39 ; 52 ; 55].

La dénomination « Globulaire » ou « *Globularia* » dérive du latin *globulus*, petite boule, qui rappelle la forme particulière de l'inflorescence. L'épithète du nom binomial « *alypum* » provient du grec *alypia* ou *alypios*, qui signifie

étymologiquement « qui calme la douleur », du fait des propriétés supposées de la plante. Ce sens est donc l'inverse de cet autre surnom d'« Herbe terrible » que la plante garda longtemps et qui reposait sur une simple confusion avec l'alypon de Discoride, qui est effectivement un drastique dangereux [52 ; 55 ; 56].

L'appellation « Turbith » dérive, quant à elle, du nom arabe d'un liseron purgatif (*Operculina turpethum*) originaire de l'inde [52 ; 55].

II.1.2. Période de récolte

Les feuilles sont récoltées dans nos régions à partir du mois d'octobre jusqu'au mois d'avril [57].

II. 1.3. Usages thérapeutiques traditionnels

II. 1.3.1. Indications anti-parasitaire et antileishmanienne

Un intérêt antiparasitaire, indiqué notamment par les deux pharmacopées traditionnelles algérienne et tunisienne, est accordé aux feuilles de *Globularia alypum* L. qui agiraient en tant qu'antipaludique et anthelminthique lorsqu'un décocté est administré par voie orale [43 ; 58 ; 59]

Une autre indication antiparasitaire, attribuée cette fois-ci aux sommités fleuries de la plante, a été mentionnée par Boudjelal *et al.* (2013) dans le cadre d'une étude ethnobotanique réalisée dans une zone d'étude correspondant à la région de M'Sila (Algérie). Les auteurs de cette étude ont notamment rapporté l'usage thérapeutique du décocté ou de l'infusé des sommités fleuries (administration par voie orale) dans le traitement des leishmanioses par les populations locales [60].

II. 1.3.2. Autres indications thérapeutiques

La globulaire est connue et utilisée depuis fort longtemps dans le pourtour méditerranéen ; notamment pour ses propriétés diurétiques et purgatives. Les troubles du transit intestinal constituent l'indication majeure de la plante à travers l'utilisation de ses feuilles (organe végétal le plus utilisé pour l'espèce). En plus de ces propriétés thérapeutiques, les connaissances ancestrales nord-africaines lui concèdent, particulièrement, une plus large gamme d'usages thérapeutiques et s'intéressent aussi bien à l'usage des feuilles qu'à l'ensemble des parties

inhérentes au végétal (les indications thérapeutiques identifiées par les études ethnobotaniques antérieures sont synthétisés dans le tableau de l'annexe C). Sont, entre autres propriétés, mentionnés le caractère antihypertensif, hypoglycémiant, cicatrisant et antiseptique de la plante [39 ; 61 ; 62 ; 63].

Les pharmacopées traditionnelles déconseillent, toutefois, l'emploi abusif de la plante et son utilisation par les femmes enceintes [39 ; 48 ; 59].

II. 2. Investigations antérieures sur les activités biologiques d'intérêts pharmacologiques

Les travaux menés sur les activités biologiques de *Globularia alypum* L. ont permis de mieux cerner les propriétés pharmacologiques de la plante et dénotent d'un potentiel thérapeutique à visées multiples avéré. Les résultats publiés sur le sujet découlent essentiellement des études portées sur les feuilles et font état de diverses activités biologiques notables (tableau 1.1).

II. 3. Effets toxicologiques

Selon certains auteurs, la consommation prolongée et à forte dose de la Globulaire serait à même de provoquer une oligurie, des diarrhées, des coliques, des vertiges, des céphalées, des frissons, des douleurs des membres, une hypothermie et un ralentissement du pouls [48].

L'estimation de dose létale médiane (DL50) à 10 g/kg ainsi que les données de la toxicité chronique (paramètres biochimiques, hématologiques et examen anatomo-histopathologique) laissent à conclure sur l'absence d'effets toxicologiques induits par la consommation d'un infusé préparé à partir de la partie aérienne de *Globularia alypum* L. [64]. Pareillement, la DL50 de l'extrait aqueux des feuilles a été estimée à 14,5 g/kg, suggérant ainsi, une toxicité aigue pratiquement absente [65 ; 66].

Toutefois, les auteurs d'une étude sur le potentiel fœtotoxique de la plante rapportent une action toxique sur la reproduction : l'administration orale de l'extrait éthanolique de feuilles, à raison de 800 mg/kg pendant 30 jours, s'est traduite par une résorption embryonnaire et par une réduction notable du nombre de fœtus viables [48 ; 67].

Tableau 1.1 : Synthèse des travaux antérieurement publiés sur les activités biologiques de *Globularia alypum* L.

Activités biologiques	Organes végétaux	Nature des tests	Références
anticholinestérasique	Feuilles, Fleurs, Racines	Biochimique	[68 ; 69 ; 70]
antilithique	Fleurs, racine	Biochimique	[71]
antioxydante	Partie aérienne	Biochimique	[72 ; 73 ; 74 ; 75]
	Feuilles	Biochimique	[11 ; 69 ; 76 ; 77 ; 78 ; 79 ; 80 ; 81 ; 82]
		<i>In vitro</i>	[82]
		<i>In vivo</i>	[83 ; 84]
	Fleurs	Biochimique	[69 ; 77 ; 78]
Racines	Biochimique	[77]	
antigénotoxique	Feuilles	<i>In vitro</i>	[79]
antibactérienne	Partie aérienne	<i>In vitro</i>	[49 ; 85]
	Feuilles	<i>In vitro</i>	[81 ; 76 ; 86 ; 87 ; 88]
Antifongique	Feuilles	<i>In vitro</i>	[88]
Anti-inflammatoire	Partie aérienne	<i>In vivo</i>	[89]
	Feuilles	Biochimique	[69 ; 70]
		<i>In vivo</i>	[76]
Fleurs	Biochimique	[69]	
Hypoglycémiante	Feuilles	<i>In vivo</i>	[64 ; 65 ; 84 ; 90]
Hypotriglycéridémiante	Partie aérienne	<i>In vivo</i>	[91]
	Feuilles	<i>In vivo</i>	[83 ; 84 ; 90]
Hypocholestérolémiante	Partie aérienne	<i>In vivo</i>	[91]
	Feuilles	<i>In vivo</i>	[84 ; 90]
Spasmolytique	Feuilles	<i>Ex vivo</i>	[92]
	Tiges et feuilles	<i>Ex vivo</i>	[93]
Vasodilatatrice	Feuilles	<i>Ex vivo</i>	[94]
Antileucémique	Plante entière	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	[95]
Stimulatrice du péristaltisme intestinal	Feuilles	<i>Ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	[96]
Activité favorisant la spermatogénèse	Feuilles	<i>In vivo</i>	[97]

antiulcéreuse	Feuilles	<i>In vivo</i>	[96]
Cicatrisante	Feuilles	<i>In vivo</i>	[76]
Immunosuppressive	Feuilles	<i>In vitro</i>	[98]

III. STRESS OXYDANT ET MOLECULES ANTI-RADICALAIRES

III.1. Formation et rôles biologiques des radicaux libres

Identifiés pour la première fois au début du XX^e siècle par Moses Gomberg, les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un ou des électrons non-pariés [99 ; 100]. Cette propriété les rend aptes à réagir avec des molécules lors de réactions en chaîne. La formation d'un radical libre peut résulter d'une rupture homolytique d'une liaison covalente ou d'un transfert d'électron [101].

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que l'on qualifie parfois de radicaux primaires. Ces radicaux dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} . Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [102].

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote [102].

La production d'espèces réactives dans les tissus biologiques peut avoir une origine enzymatique ou non-enzymatique. Celle-ci est prépondérante lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, du métabolisme péroxysomal des acides gras, des réactions de la cytochrome P-450 microsomale ou encore de l'activité phagocytaire du système immunitaire [103 ; 104]. Les métaux de transition (comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+}) agissent, par ailleurs, souvent comme des catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle [105].

Des facteurs de source exogène peuvent également être à l'origine d'une production accrue en radicaux libres ; à l'exemple de l'exposition aux radiations, à

la pollution de l'air et de l'eau (métaux lourds) et de la prise de certains traitements médicamenteux (ciclosporine, fujimycine, gentamycine, bléomycine) [104 ; 105].

A concentration modérée, les radicaux libres primaires possèdent un rôle physiologique important notamment dans le processus de maturation structurale des cellules appartenant au système immunitaire. En effet, le système phagocytaire (neutrophiles, macrophages, monocytes) a recours à la production et l'utilisation des radicaux libres dans la destruction non-spécifique des entités pathogènes. Cette production de radicaux est assurée par le complexe enzymatique membranaire NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)-oxydase [104 ; 106]. Ainsi les sujets ayant une défaillance au niveau de ce complexe enzymatique présentent des infections répétées (granulomatose chronique) [107].

Un autre rôle, attribué aux radicaux libres, est celui de leur implication dans divers cascades de signalisation cellulaire. Cette fonction, d'importance majeure, a particulièrement été caractérisée dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée), dans la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires), dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire [104 ; 108].

III.2. Effets délétères des radicaux libres

Les radicaux libres, lorsque produits en excès, induisent de nombreuses altérations pouvant affecter différents constituants cellulaires : ADN (acide desoxyribonucleique), protéines, lipides membranaires et lipoprotéines. Ces composés hautement réactifs réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron, soit en arrachant un atome d'hydrogène, soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons d'un substrat organique [108 ; 109].

III.3. Défenses antioxydantes de l'organisme

Pour se protéger de l'activité radicalaire, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les

endonucléases ; l'autre est apportée par une alimentation riche en composés antioxydants (vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque) [109].

III.4. Implications physiopathologiques des radicaux libres

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces prooxydantes et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Ce stress, est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution clinique [102 ; 109].

La plupart des pathologies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. Ces derniers, peuvent alors, causer des modifications structurales aux molécules biologiques et initier une surexpression de certains gènes [102 ; 110].

Depuis un certain nombre d'années, le rôle avéré des radicaux libres dans l'initiation de certaines pathologies a été mis au jour, notamment, en ce qui concerne le cancer, la cataracte, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire et le vieillissement accéléré [111; 112].

Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme p53 [102 ; 113].

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels que le diabète, les maladies cardiovasculaires, les rhumatismes et la maladie d'Alzheimer [112 ; 114 ; 115 ; 116]. D'autres pathologies neuro-dégénératives sont aussi concernées, à l'exemple de la sclérose latérale amyotrophique [117].

Dans certaines affections la cause initiale ne met pas en jeu un processus radicalaire, mais la survenue secondaire du stress vient aggraver le processus initial. Un exemple caractéristique de cette situation est celui du SIDA (syndrome

d'immunodéficience acquise) où le processus initial est l'infection virale, mais où le virus induit un stress oxydant en réprimant le gène de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase facilitant la mort des lymphocytes T par apoptose. Dans bien d'autres situations aiguës ou infections, la diminution des capacités antioxydantes facilitant le stress oxydant va amoindrir les protections immunitaires. Ainsi, chez des malades de réanimation, la diminution des activités glutathion peroxydase et l'augmentation des peroxydes sont indicateurs d'une mauvaise évolution [112].

III.5. Mécanismes d'action des composés antioxydants

Les molécules à potentiel antioxydant peuvent être réparties en deux types : les antioxydants préventifs qui empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène et les antioxydants qui interceptent les radicaux propagateurs [118 ; 119].

Plusieurs mécanismes d'action peuvent être associés à l'activité anti-oxydante des composés : inhibition des espèces chimiques initiant la peroxydation ; chélation des métaux de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres ; désactivation de l'oxygène singulet, prévenant la formation des peroxydes ; inhibition de la chaîne de réaction autoxydative et/ou réduction de la concentration localisée en oxygène [119].

L'interruption de la chaîne de réaction d'un radical libre serait le mécanisme antioxydant le plus efficace. Comportant généralement un cycle aromatique, ces antioxydants transfèrent leur hydrogène sur le radical généré durant l'oxydation en devenant eux-mêmes des radicaux libres de manière transitoire. Ces radicaux intermédiaires sont stabilisés par la délocalisation d'un électron au sein du cycle aromatique, formant des structures quinones [119 ; 120].

De nombreux antioxydants ont des modes d'action mixtes ce qui complique leur classification. Deux exemples peuvent illustrer ces mécanismes multiples : l'acide ascorbique est un désactivateur de l'oxygène singulet, il élimine aussi l'oxygène moléculaire, il est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques et aux radicaux tocophéroxyles pour régénérer le tocophérol ; Les flavonoïdes tels que les anthocyanines, les catéchines, les flavones, les flavonols, les isoflavones et les

proanthocyanidines sont chélateurs de métaux, piègeurs d'anions superoxyde et donneurs d'hydrogène [118].

IV. EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES ET TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES

IV.1. Etiologie et formes cliniques

Les leishmanioses sont des parasitoses à transmission vectorielle dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*. Parasites zoonotiques et parfois anthroponotiques, les leishmanies (*Leishmania* spp.) affectent une large diversité d'hôtes vertébrés, dont l'Homme, essentiellement par le biais de piqûres d'insectes vecteurs hématophages, les phlébotomes femelles. Ces dernières sont des diptères appartenant au deux genres *Phlebotomus* et *Lutzomia* de la sous-famille des Phlebotominae [121 ; 122].

Près de vingt espèces de *Leishmania* ont été identifiées en tant qu'agents causals des leishmanioses humaines [123]. Les manifestations pathologiques de ces leishmanioses décrivent un large spectre d'expressions cliniques et peuvent aussi bien correspondre à une leishmaniose cutanée, dont l'affection peut spontanément évoluer vers la guérison, qu'à une leishmaniose dite viscérale, mettant en jeu le pronostic vital des sujets atteints (figure 1.2). On distingue, de ce fait, trois formes cliniques majeures [124] :

- Les leishmanioses cutanées (LC) : Leishmaniose cutanée localisée (LCL) et leishmaniose cutanée diffuse (LCD) ;
- La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) ;
- La leishmaniose viscérale (LV).

La leishmaniose cutanée localisée, cutanée diffuse et cutanéomuqueuse sont dites tégumentaires et se manifestent par des formes cliniques variées. La lésion initiale des LC est sous forme de macule qui, à partir de 2 semaines à 3 mois et plus, peut présenter une papule érythémateuse et/ou nodule [125 ; 126].

Dans le cas de la LCL, l'évolution la plus commune de la lésion correspond au développement d'un ulcère généralement indolore, de forme arrondie ou ovalaire (diamètre : 0,5-10 cm), à bords surélevés et dont le centre peut comporter une croûte. Une résorption spontanée de ce type de lésion peut se produire, laissant

toutefois en place une cicatrice indélébile. D'autres lésions peuvent aussi se développer en formes chroniques [125 ; 127 ; 128]. La LCD est caractérisée, quant à elle, par une confluence de multiples nodules, papules ou tubercules non ulcéreux associés à une infiltration cutanée diffuse [125 ; 129].

Concernant la LCM, l'atteinte muqueuse survient généralement des mois (voire des années) après l'affection cutanée primaire mais les deux manifestations peuvent également se produire simultanément. Cette forme clinique, potentiellement létale, atteint le plus fréquemment les muqueuses buccales et/ou nasales (avec perforation du septum) et peut s'étendre au pharynx et au larynx, jusqu'aux voies respiratoires inférieures. Les lésions sont caractérisées par des ulcérations particulièrement mutilantes [125 ; 130].

Dans la LV, la triade clinique habituellement rencontrée comprend une fièvre irrégulière, une altération de l'état général (asthénie et amaigrissement) et une splénomégalie. À ces signes s'associe le plus souvent une pancytopénie manifestant une pâleur cireuse, une polyadénopathie et éventuellement une hépatomégalie [131 ; 132 ; 133]. Les cas de décès sont habituellement liés à une surinfection bactérienne ou à des hémorragies internes [132]. Dans la région méditerranéenne, la LV est principalement une maladie infantile [134 ; 135].

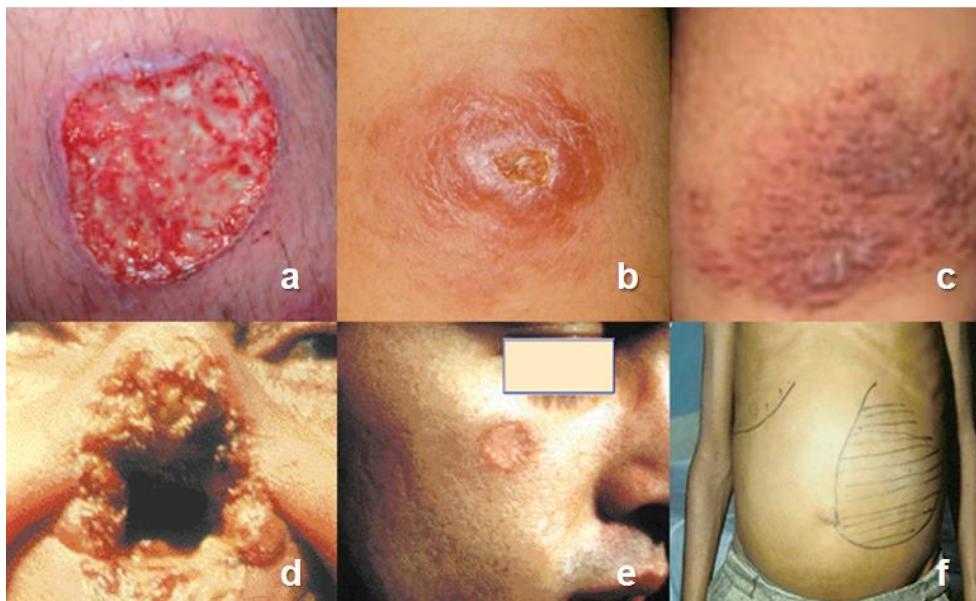


Figure 1.2 : Manifestations cliniques des leishmanioses. a, b, c, e : leishmanioses cutanées. d : leishmaniose cutanéomuqueuse. f : leishmaniose viscérale [136 ; 137 ; 138]

A ces formes de leishmanioses, d'autres manifestations pathologiques de moindre fréquence peuvent subvenir. De très nombreux cas d'infections asymptomatiques ont, par ailleurs, été observés. Ce polymorphisme clinique est principalement dû au tropisme habituel des *Leishmania* spp. (tableau 1.2), à la pathogénicité différentielle des souches ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte [123 ; 124 ; 139].

Tableau 1.2 : Tropisme habituel et exceptionnel de quelques espèces anthropophiles des *Leishmania* spp. [124]

Tropisme parasitaire	Espèces	Formes cliniques	
		habituelles	exceptionnelles
Dermotrope	<i>L. major</i>	LCL	LCD*
	<i>L. killicki</i>	LCL	/
	<i>L. aethiopica</i>	LCL	LCD
	<i>L. tropica</i>	LCL	LV
	<i>L. guyanensis</i>	LCL	LCM
	<i>L. mexicana</i>	LCL	LCD, LV*
Tropisme cutanéomuqueux	<i>L. braziliensis</i>	LCL, LCM	LCD*, LV*
Viscérotrope	<i>L. infantum</i>	LV, LCL	LCD*
	<i>L. donovani</i>	LV	LCL

* formes cliniques de l'immunodéprimé.

IV.2. Situation épidémiologique et distribution géographique

IV.2.1. Au niveau mondial

En l'absence de données fiables, la prévalence mondiale des leishmanioses pourrait être estimée à près de 12 millions de cas avec une population à risque évaluée à plus de 350 millions de personnes [123 ; 140 ; 141].

Le caractère endémique des leishmanioses a été rapporté dans 98 pays répartis sur les six continents (figure 1.3) avec une incidence approximative de 1,3 million nouveaux cas/an, dont en moyenne 300 000 cas de leishmaniose viscérale et 1 million de cas de leishmanioses tégumentaires [142 ; 143].

Le nombre estimatif de décès imputables à la leishmaniose viscérale pourrait atteindre les 50 000 cas/an [142 ; 143] ; une estimation qui n'est dépassée par aucune autre parasitose à l'exception du paludisme [140 ; 144].

Bien qu'il y ait encore relativement peu de données pour le confirmer, les changements climatiques associés au contexte socio-économique futur des pays émergents, pourrait jouer à terme un rôle prépondérant dans la recrudescence des leishmanioses à l'échelle mondiale [145 ; 146 ; 147].

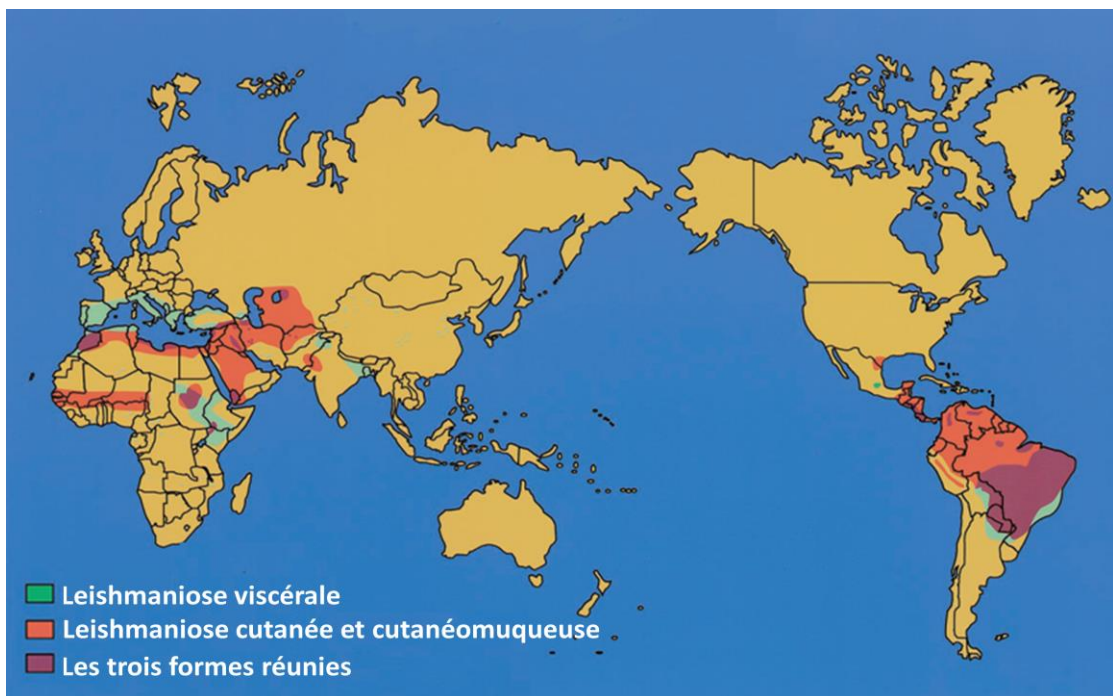


Figure 1.3 : Répartition géographique des leishmanioses [148]

2.2. En Algérie

Les leishmanioses représentent la plus importante cause de parasitoses humaines en Algérie qui, avec des incidences annuelles ayant déjà dépassé les 30 000 cas, compte parmi les pays les plus touchés au monde [143 ; 149 ; 150 ; 151]. Près de 15 millions de la population y vivent en zones d'endémie [152].

Deux des trois formes cliniques majeures sévissent dans le pays selon un mode endémo-épidémique : la forme viscérale et la forme cutanée [149 ; 153].

La forme viscérale en Algérie est causée par l'espèce *L. infantum*. Cette leishmaniose concerne principalement toute la partie nord du pays avec

néanmoins l'existence de foyers endémiques au sud (Illizi, Tamanrasset) [135 ; 154]. L'espèce *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* en est le principal vecteur au nord tandis que l'absence du sous-genre au sud suggère l'implication d'autres espèces [154 ; 155]. Le chien et le chacal doré ont été identifiés en tant que réservoirs de la zoonose [156].

Majoritairement infantile, la LV est responsable d'environ 150 nouveaux cas déclarés/an avec près de 6% de taux de létalité [157 ; 158]. Mila, Bejaia, Illizi, Biskra, Bouira, Tizi-Ouzou et Setif figurent parmi les wilayas les plus affectées du pays [158]. L'Institut National de Santé Publique (INSP) a relevé, ces dernières années, une régression du taux d'incidence ; passant ainsi, de 0,72 à 0,15 cas pour 100.000 habitants (période comprise entre 2000 et 2012). La vigilance reste cependant de mise en considérant les nombreux cas potentiellement non déclarés et le nombre grandissant de personnes atteintes au sud du pays [158 ; 159].

S'agissant de la forme cutanée de la leishmaniose, celle-ci correspond presque exclusivement à la forme clinique localisée avec des incidences annuelles dont les extrêmes varient aux environs de 15 et 80 cas pour 100 000 habitants (période 2000-2012). Biskra, Bechar, M'sila, Naama et Ghardaïa figurent parmi les wilayas recensant le nombre annuel le plus élevé de nouveaux cas [159 ; 160].

A l'origine de la leishmaniose cutanée, trois entités nosologiques ont été identifiées dans le pays (Figure 1.4) :

- La LC zoonotique à *L. major*, fortement prépondérante en Algérie, est transmise par *Phlebotomus papatasi* et a comme réservoir les Gerbillidés. Le parasite est inféodée aux régions arides et semi-arides mais dont la répartition connaît actuellement une extension progressive vers le nord [160 ; 161] ;
- La LC sporadique du nord à *L. infantum*, majoritairement transmise par *Phlebotomus perfiliewi*, a la même répartition géographique que la LV et aurait aussi le même réservoir [149 ; 162] ;
- La LC à *L. killicki* dont le principal vecteur serait *Phlebotomus sergenti* et le réservoir un rongeur, *Massoutiera mzabi*. Sa répartition géographique semble être confinée à la seule région de Ghardaïa [160 ; 163]. Néanmoins, un cas de LC à *L. killicki* de la région de Annaba a déjà été signalé [164].

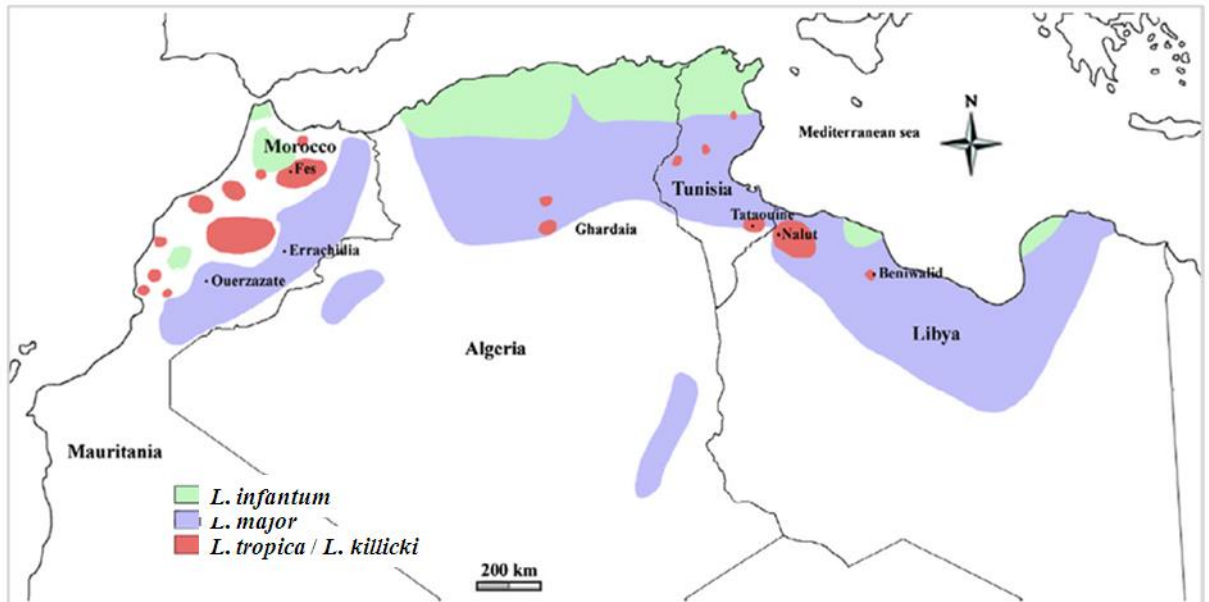


Figure 1.4 : Répartition des leishmanioses en Algérie et dans les pays voisins

[160]

IV.3. Classification et caractères biologiques de l'agent pathogène

IV.3.1. Classification

Classification classique [165 ; 166]		Classification phylogénique [167 ; 168]	
Règne :	Protista	Domaine :	Eukaryota
Sous-règne :	Protozoa	Super-groupe :	Excavata
Phylum :	Sarcomastigophora	Clade :	Discoba
Sous-phylum :	Mastigophora	Clade :	Discicristata
Classe :	Zoomastigophorea	Clade :	Euglenozoa
Ordre :	Kinetoplastida	Clade :	Kinetoplastea
Sous-ordre :	Trypanozomatina	Clade :	Metakinetoplastina
Famille :	Typonosomatidae	Clade :	Trypanosomatidae
Genre :	<i>Leishmania</i>	Genre :	<i>Leishmania</i>

Le genre *Leishmania* (Ross, 1903) est actuellement subdivisé en trois sous-genres : *Leishmania (Leishmania)*, *Leishmania (Viannia)* et *Leishmania (Sauroleishmania)*. Le dernier sous-genre inclue les espèces parasites des reptiles de l'ordre de squamates [169 ; 170]. Ces trois taxons correspondent à la

section dite « Euleishmania » par opposition à la section « Paraleishmania » incluant des espèces n'ayant pas été classifiées dans aucun des trois sous-genres [171].

Une trentaine d'espèces, toutes responsables d'infections chez les mammifères (Tableau 1.3), appartiennent aux deux sous-genres *Leishmania* et *Viannia*. Près des deux tiers en sont pathogènes pour l'Homme [169].

Initialement, la discrimination taxonomique entre les sous-genres, fut basée sur le site de développement différentiel des parasites au niveau du tube digestif des phlébotomes : suprapylorique pour le sous-genre *Leishmania*, péripylorique concernant le sous-genre *Viannia* et hypopylorique pour le sous-genre *Sauroleishmania* [172]. L'analyse moléculaire a, par la suite, confirmé le caractère monophylétique sœur des trois sous-genres [169 ; 170].

Le concept de regroupement des *Leishmania* spp. en complexes d'espèces a été développé sur la base des caractéristiques biologiques et biochimiques distinctifs des espèces [173]. Etant considérée comme une technique de référence, l'électrophorèse des enzymes à multi-locus (MLEE), appuyée par les techniques de la taxonomie numérique et cladistique, est à l'origine du système actuel de classification des complexes, et ce, après de nombreuses révisions motivées par des arguments d'ordre phylogénétique [171]. La MLEE permet, par ailleurs, la caractérisation des souches de *Leishmania* spp. en différents zymodèmes.

Tableau 1.3 : Complexes d'espèces *Leishmania* spp. responsables d'infections chez les mammifères [171 ; 174 ; 175 ; 176 ; 177 ; 178]

Sous-genres	Complexes d'espèces	Espèces
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>)	Complexe <i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> , <i>L. archibaldi</i> <i>L. infantum</i> (= <i>L. chagasi</i>)
	Complexe <i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> , <i>L. killicki</i> , <i>L. aethiopica</i>
	Complexe <i>L. major</i>	<i>L. major</i> , <i>L. gerbilli</i> , <i>L. arabica</i> , <i>L. turanica</i>
	Complexe <i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> (= <i>L. pifanoi</i>), <i>L. amazonensis</i> (= <i>L. garnhami</i>), <i>L. aristidesi</i> , <i>L. venezuelensis</i> , <i>L. forattinii</i>

(Sous-genre non défini)	Complexe <i>L. enriettii</i>	<i>L. enriettii</i> , <i>L. martiniquensis</i> , <i>L. siamensis</i> , <i>Leishmania sp.</i> (AM-2004), <i>Leishmania sp</i> (Ghana)
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>)	Complexe <i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. peruviana</i>
	Complexe <i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. shawi</i>
	(complexes non définis)	<i>L. naiffi</i> , <i>L. lainsoni</i> , <i>L. lindenbergi</i> , <i>L. utingensis</i>

IV.3.2. Caractères morphologiques et cycle biologique

Les leishmanies possèdent un cycle biologique dixène (figure 1.5) au cours duquel les parasites se différencient successivement en forme promastigote dans le tube digestif de l'insecte vecteur et en forme amastigote que l'on retrouve à l'intérieur des cellules infectées appartenant au système phagocytaire mononucléé (SPM) de l'hôte vertébré [179 ; 180].

Les promastigotes mesurent 15 à 20 µm de longueur sur 1 à 3 µm de largeur. Ils possèdent une forme allongée, un noyau central et un flagelle libre antérieur. Les amastigotes se distinguent des promastigotes par leur forme arrondies d'un diamètre de 2 à 6 µm et la réduction de la taille du flagelle jusqu'à sa racine intracellulaire [180 ; 181].

L'initiation de l'infection chez l'hôte mammifère fait suite à la prise du repas hémato-lymphatique de l'insecte vecteur au cours duquel ce produirait un phénomène de régurgitation d'un gel chargé en promastigotes infectieux dits métacycliques [182]. L'internalisation par phagocytose des formes métacycliques au niveau des cellules du SPM (principalement les monocytes et les macrophages) ferait intervenir différents types de récepteurs (récepteurs du complément, récepteurs du fibronectine et récepteurs du mannose) dont l'importance relative reste, néanmoins, mal définie [183 ; 184]. De récents modèles suggèrent que l'exposition de la phosphatidylserine à la surface externe du parasite jouerait un rôle prépondérant dans l'induction de la phagocytose [185 ; 186].

Une fois phagocytés, les parasites se retrouvent dès lors internalisés dans une vacuole dite parasitophore à l'intérieur duquel les promastigotes entament leur transformation en amastigotes. La multiplication active des amastigotes intracellulaire par fission binaire est suivie par la lyse de la cellule hôte entraînant subséquemment la libération des parasites dans le milieu extracellulaire. Les amastigotes ainsi libérés peuvent alors initier de nouveau l'infection d'autres cellules du SPM [187].

L'accomplissement d'un cycle biologique entier survient suite à l'infection de l'hôte invertébré. Durant sa prise alimentaire, l'insecte hématophage ingère des phagocytes contenant des amastigotes qui, une fois dans le tube digestif, se transforment en promastigotes procycliques non infectieux dont la multiplication par fission binaire est très active. Un processus de métacyclogenèse est, par la suite, amorcé aboutissant à la maturation des promastigotes en forme métacyclique infectieuse [187]. La morphologie des promastigotes métacycliques se différencie de celle des promastigotes procycliques par leur forme sensiblement plus allongée et un flagelle de taille plus importante (2 à 3 fois plus long) [188].

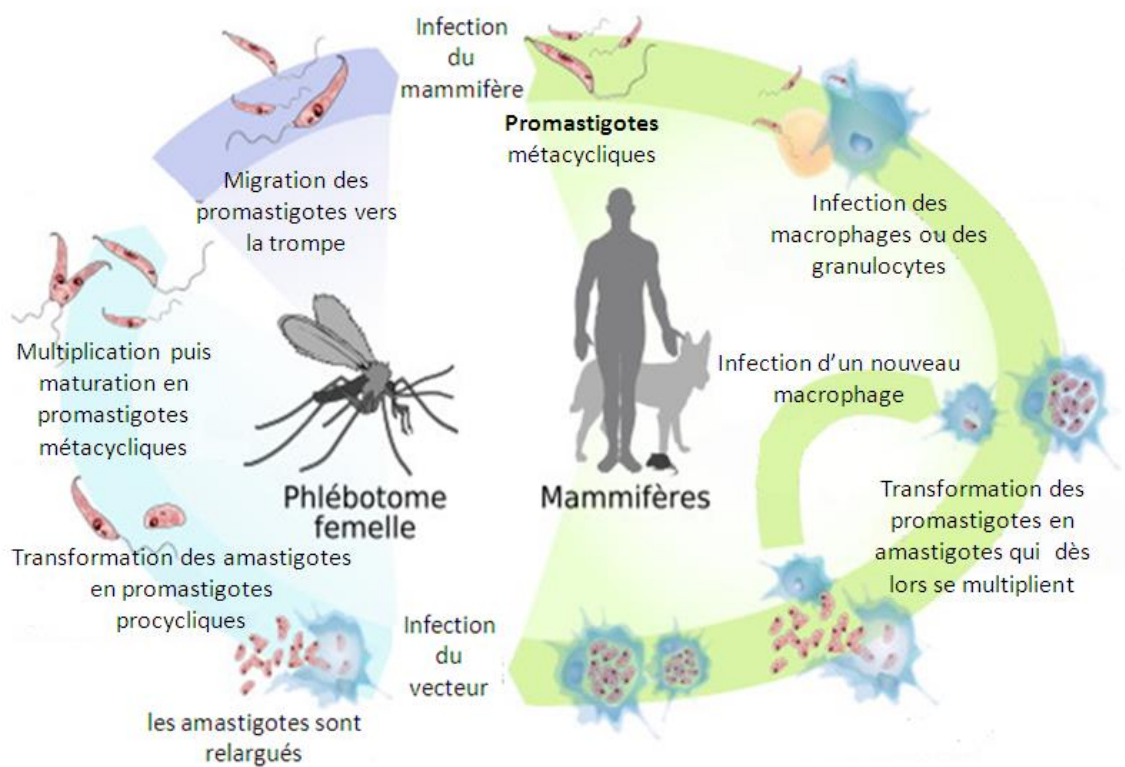


Figure 1.5 : Cycle biologique de l'agent causal des leishmanioses [189]

IV.3.3. Caractères structuraux et biochimiques majeurs

Chez les promastigotes, la membrane plasmique est recouverte d'un glycocalyx variant entre 7 nm pour les formes procycliques et 17 nm pour les métacycliques alors que les amastigotes en sont presque dépourvus [188 ; 190]. Ce manteau est principalement constitué de composés phosphoglycosylés et de protéines ayant tous une ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI). La présence de la lipophosphoglycane (LPG) y est très abondante et joue un rôle important aussi bien dans la protection et la survie du promastigote que dans sa virulence [191 ; 192]. Des différences inter et intraspécifiques ont été observées quant à la structure chimique du LPG. Le rôle de ce polymorphisme, dans l'interaction parasite-hôte, n'est cependant pas encore clairement identifié. La LPG est sensiblement moins présent dans le mince glycocalyx des amastigotes lui suggérant ainsi un rôle relativement minoritaire dans l'interaction amastigote-cellule hôte [191].

Le glycocalyx des amastigotes est caractérisé par l'abondance de la phosphocéramide inositol et des dérivés des sphingolipides issus de la cellule hôte. La nature chimérique de ce glycocalyx conférerait aux amastigotes une protection contre l'activité des hydrolases lysosomales et un mécanisme supplémentaire d'échappement à la réponse immunitaire. La régulation négative de la synthèse du LPG chez les amastigotes leur permet, par ailleurs, une exposition optimale des phospholipides membranaires (phosphatidylserine) requis dans l'induction de la phagocytose chez les cellules hôtes [193].

Une autre molécule de surface identifiée comme étant un facteur de virulence majeur chez les *Leishmania* spp. est la glycoprotéine GP63, abondamment présente chez les deux formes promastigotes et amastigotes. Hormis son activité protéasique pour une grande variété de substrats (gélatine, caséine, fibrinogène et hémoglobine), la GP63 serait impliquée dans la résistance du parasite au système du complément, et modulerait les fonctions immunitaires de la cellule hôte [194]. L'exposition d'autres molécules de surface telles que la glycoprotéine GP46 et la protéine de surface PSA2 contribuerait également à renforcer la pathogénicité et à la virulence de certaines espèces de *Leishmania* [195].

Le flagelle du parasite est constitué de neuf paires de tubules périphériques et d'une paire centrale. En plus de sa fonction motrice, ce dernier possède une fonction d'attachement cellulaire des formes promastigotes et serait indispensable pour l'organisation cellulaire au cours de la division et la perception sensorielle du parasite tout au long de son cycle biologique [196]. A la base du flagelle, une invagination de la membrane plasmique forme une poche flagellaire (figure 1.6). Le cytosquelette du parasite fait défaut uniquement au niveau de cette poche autorisant l'existence de flux d'endocytose et d'exocytose. Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi y sont, en conséquence, localisés à proximité [197 ; 198]. A travers cette région membranaire, sont sécrétés des protéophosphoglycanes (PPG) et des phosphatases acides (absentes chez *L. major*). Ces derniers, pourraient également participer à la virulence et à la pathogénicité du parasite [199 ; 200].

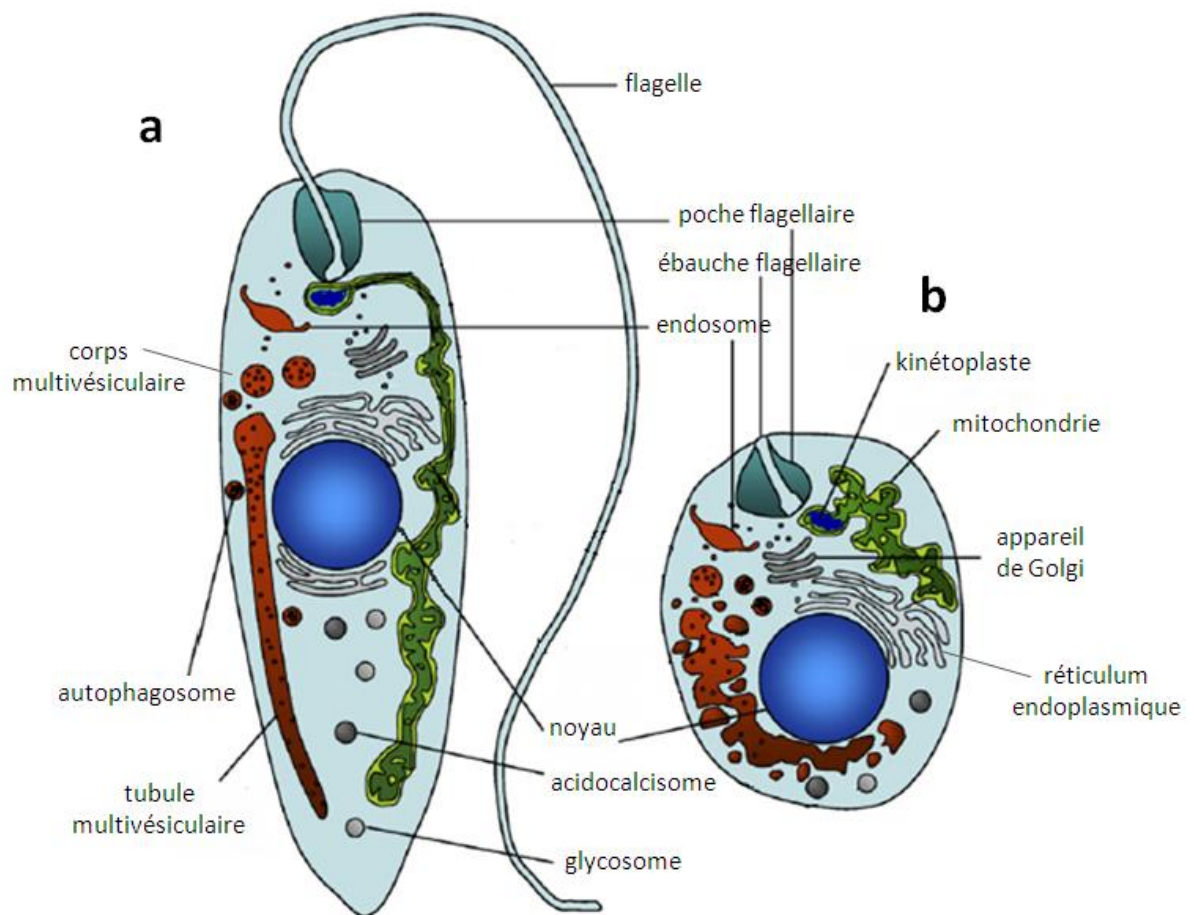


Figure 1.6 : Représentation schématique des caractères morphologiques et structuraux du parasite [201]. a : promastigote, b : amastigote

IV.3.4. Traitements anti-leishmaniens

Aucun vaccin n'est encore disponible et la chimiothérapie demeure assez complexe [202 ; 203]. Les options thérapeutiques pour le traitement des leishmanioses requièrent l'administration de molécules à effet anti-leishmanien dont la toxicité et/ou l'émergence de cas de résistance clinique constituent, néanmoins, des facteurs limitant leur utilisation [204] (tableau 1.4). Sont le plus couramment prescrits en monothérapie ou en association, les dérivés pentavalents de l'antimoine, l'amphotéricine B, la miltéfosine, la paromomycine ou encore la pentamidine [140 ; 204 ; 205].

Depuis plus de sept décennies, les dérivés pentavalents de l'antimoine : N-méthyl glucamine et stibogluconate de sodium, constituent encore le traitement de première intention pour toutes les formes cliniques de leishmaniose. Hormis leur toxicité avérée, leur efficacité est actuellement menacée par l'émergence, dans les zones d'endémie, d'une résistance parasitaire à l'action de ces molécules [206]. Déjà en 1986, l'Algérie a connue, à titre d'exemple, un taux élevé d'échec thérapeutique de 48,5% concernant le traitement de la leishmaniose cutanée à *L. major* par les dérivés antimoniés [157]. Les transporteurs membranaires ABC (transporteurs à ATP-Binding Cassette) sont, entre autres mécanismes, impliqués dans la chimiorésistance des parasites [206].

L'amphotéricine B desoxycholate (polyene macrolide antifongique) est actuellement préconisé en seconde intention notamment pour le traitement des cas réfractaires de leishmaniose viscérale. Des formulations lipidiques de l'amphotéricine B (remplacement du desoxycholate par des lipides) ont été développées en vue de réduire sa toxicité sur l'organisme et d'optimiser son efficacité ; ce qui en fait un médicament de choix pour le traitement de première intention des formes pathologiques sévères (viscérale et cutanéomuqueuse) [202 ; 207 ; 208]. Des travaux expérimentaux ont, néanmoins, mis en évidence la possibilité de développement de résistances [206].

La pentamidine est une diamine aromatique généralement utilisée en traitement de seconde intention. Sa haute toxicité et la réduction de son efficacité pour les formes viscérales sont à l'origine de l'arrêt de sa prescription en Inde [209]. À

faibles doses, elle reste une option raisonnable dans certaines formes de LC ou en prophylaxie secondaire de la LV de l'immunodéprimé [205].

La miltéfosine (hexadecylphosphocholine) a initialement été développée en tant qu'anti-tumoral. Son efficacité clinique dans le traitement de la leishmaniose viscérale accuse une variabilité géographique (94% de guérison en Inde contre 50% au Brésil) [138 ; 210]. Sa demi-vie est, par ailleurs, assez longue (5 jours) ce qui représente un facteur favorisant le développement d'une résistance parasitaire à cette molécule [209]. De même pour le traitement de la LV à base de paromomycine (aminosidine sulfate) qui par des essais expérimentales s'est révélée favorable au développement de souches résistantes [211].

L'association médicamenteuse de ces molécules est donc préconisée afin de réduire au mieux le risque de survenue d'une résistance clinique [205].

Une variabilité de la sensibilité à ces molécules est notable entre les espèces [212] ; à l'exemple de la sensibilité de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. mexicana* qui sont très significativement moins sensibles à la miltéfosine comparativement à *L. donovani*. Cette variabilité est également observable entre les souches d'une même espèce [213].

La cryothérapie et les infrarouges constituent des moyens adjuvants qui peuvent être utilisés dans le traitement de la LC. Une ablation chirurgicale d'une lésion circonscrite peut être également envisagée [214].

De nouvelles perspectives de recherche ciblent actuellement des traitements à index thérapeutique élevé et possédant un effet auxiliaire immunomodulateur [215]. L'émergence de l'intérêt porté sur les composés bioactifs issus des plantes médicinales a permis d'identifier ces dernières années plusieurs molécules anti-leishmanienne ainsi que des extraits de plantes ayant des activités synergiques pouvant représenter en cela de nouvelles alternatives thérapeutiques aux traitements conventionnels [216].

Tableau 1.4 : Mode d'action, efficacité et effets secondaires des principaux traitements anti-leishmaniens [217]

Traitement	Mode d'action	Efficacité thérapeutique	Effets secondaires majeurs
Dérivés pentavalents de l'antimoine	Dysfonctionnement du métabolisme énergétique et inhibition de la trypanothione réductase	80–90 % (40% en Inde (minodier, 2010))	Toxicités cardiaque, hématologique, hépatique et rénale, asthénie, anorexie, céphalées, vomissements, myalgies
Amphotéricine B désoxycholate	Altération membranaire	≥95%	Toxicité rénale, fièvre, vomissements
Amphotéricine B de formulation lipidique (AmBisome)	Altération membranaire	≥ 96%	Toxicité rénale réduite
Paromomycine	Inhibition de la traduction et attaque mitochondriale	95%	Ototoxicité réversible
Miltéfosine	Induction de l'apoptose cellulaire	85–95% (50% au Brésil (Freitas, 2015))	Tératogène, toxicité hépatique et rénale, troubles gastro-intestinaux
Pentamidine	Inhibition de la transcription	70–80%	Arythmie cardiaque, hypotension, Toxicités rénale et hématologique, diabète (type I)

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I. CADRE DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

La thématique abordée dans le présent travail découle des orientations de recherche du Laboratoire Santé, Environnement et Biotechnologies de l'Université de Saad DAHLAB de Blida.

La démarche expérimentale a été développée sur la base d'une investigation bibliographique approfondie sur le profil phytochimique de la plante médicinale ainsi que sur son intérêt thérapeutique, notamment véhiculé par les usages ethnobotaniques autochtones. Il en est ainsi pour le choix des organes étudiés ; en l'occurrence feuilles et inflorescences, l'extraction de leurs métabolites secondaires, leur analyse chimique et l'étude de leurs éventuelles activités biologiques antioxydante et antileishmanienne. L'étude phytochimique a été, dans un premier temps, préliminaire à l'évaluation des activités biologiques puis bioguidée par les résultats de la même étude.

Les travaux liés à l'extraction et à l'analyse chimique des composés potentiellement bioactifs ont été notamment exécutés avec l'assistance du Laboratoire d'Extraction des Huiles Essentielles de l'Institut National de la Recherche Forestière (INRF, Alger) ainsi que du Laboratoire de la Division Santé du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC, Tipaza).

L'étude des deux activités biologiques a, quant à elle, été menée au sein du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA, Alger).

II. SITE DE RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL

Le site, faisant partie du massif forestier de Chaiba, est localisé au sud-ouest du chef-lieu de la commune de Hammam Righa (Wilaya de Ain Defla) et distant des zones côtières d'environ 25 Km (figure 2.1). Le périmètre même de la zone de collecte (36°22'N, 2°22'E), d'altitude comprise entre 440 m et 470 m, est d'exposition sud et possède une superficie totale approximative à un hectare sous une pente topographique de 30%.

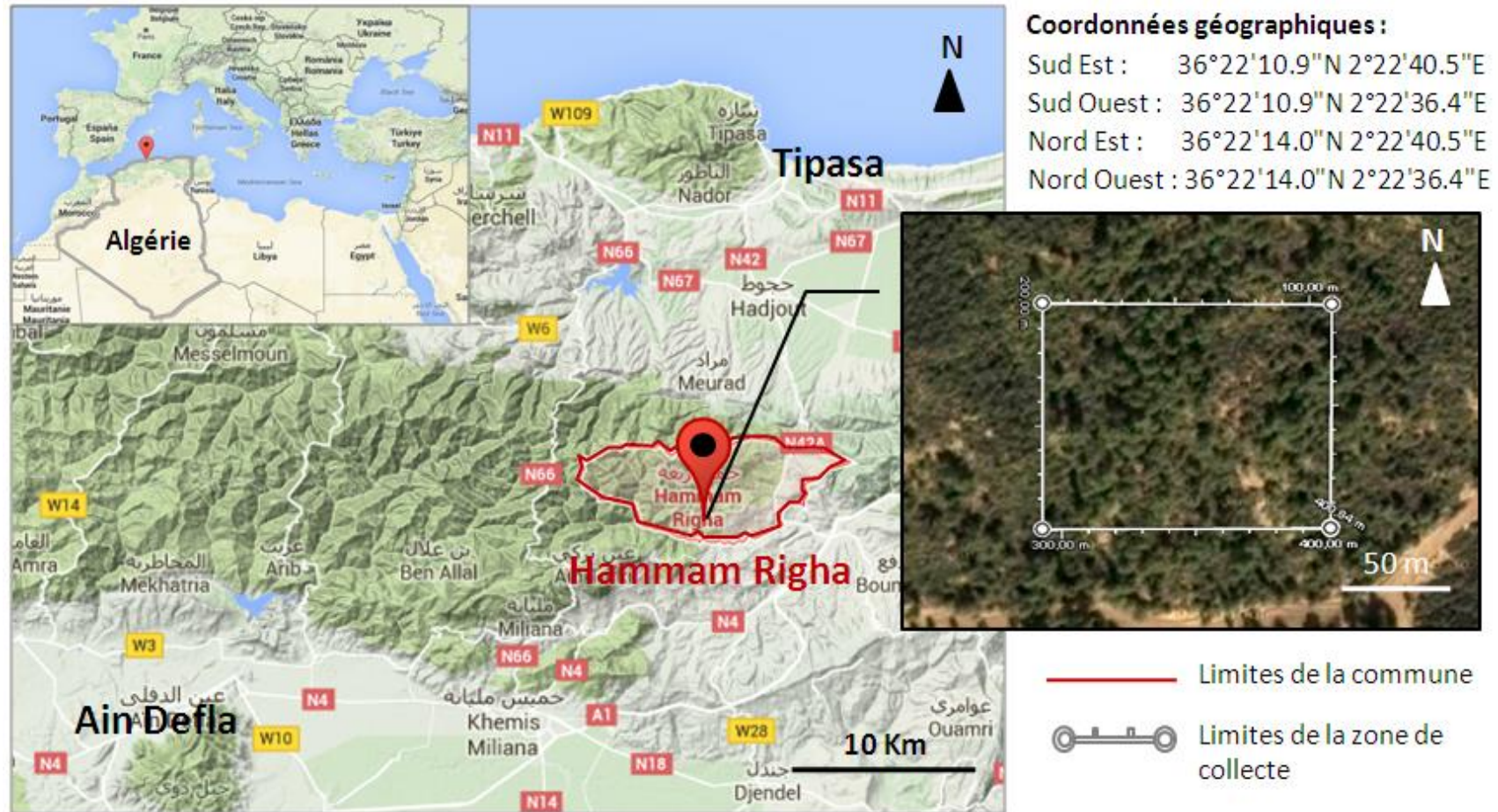


Figure 2.1 : Localisation géographique et image satellitaire du périmètre de récolte [218]

Le sol, caillouteux, est de type argileux et la formation végétale correspond à une pinède claire de pins d'Alep (figure 2.2).

La zone difficile d'accès se trouve, par ailleurs, loin des agglomérations urbaines et du trafic routier (d'environ 01 Km).



Figure 2.2 : Site de récolte (juillet, 2013) ; les cercles blancs entourent les pieds de *Globularia alypum* L.

La région de Hammam Righa jouit d'un climat méditerranéen caractérisé par des étés chauds et secs (valeur moyenne maximale de 26°C) et des hivers doux et pluvieux (valeur moyenne minimale 13°C). Les précipitations annuelles y sont légèrement supérieures à 700 mm (bioclimat subhumide) [219].

Les données de la station météorologique de Miliana (Wilaya de Ain Defla ; 36°18 N, 02°14 E), située à environ 15 Km de la zone de collecte, indique pour la région

une durée moyenne d'insolation annuelle de 2912,4 heures (données recueillies entre 1996 et 2008 ; Office National de Météorologie).

III. MATERIEL VEGETAL

III.1. Identification de la plante

L'identification de l'espèce a été déterminée avec l'assistance de Mme Briki du laboratoire d'Agronomie, Université de Saad DAHLAB, Blida. Un spécimen de l'espèce a été déposé au niveau de l'herbarium de l'INRF.

III.2. Période de collecte et conditions de séchage

La cueillette des feuilles de *Globularia alypum* L. a été effectuée par temps sec, essentiellement durant le mois d'avril 2014, tandis que les inflorescences, étant moins abondantes, leur récolte s'est étalée sur une période allant du début d'octobre jusqu'au début du mois de décembre de la même année (à raison d'une sortie par semaine). Au total une vingtaine de pieds ont l'objet d'un échantillonnage.

Une fois séchées à température ambiante, dans un lieu relativement sec et à l'abri de la lumière, les parties de la plante prélevées lors des différentes cueillettes ont séparément été mélangées en un seul échantillon homogène pour chaque organe végétal, puis conditionnées jusqu'au jour de leur utilisation. Seules les feuilles et les inflorescences d'apparence saines et convenablement séchées ont fait l'objet d'études expérimentales [220].

III.3. Description visuelle et biométrique des organes végétaux étudiés

L'étude biométrique effectuée sur le matériel végétal séché concerne la mesure de la taille (mm) et du poids (mg) des feuilles et des inflorescences de la plante médicinale. Un nombre effectif de 60 feuilles et inflorescences ont, de manière indépendante, fait l'objet d'une mesure des deux paramètres. La description visuelle a été appuyée par l'utilisation de la loupe binoculaire (le matériel non biologique utilisé est listé à l'annexe D).

IV. EXTRACTIONS DES METABOLITES SECONDAIRES

Afin de cerner au mieux la composition chimique de *G. alypum* L. en relation avec ses activités biologiques étudiées, l'extraction des métabolites secondaires a aussi bien concerné les composés volatils que non volatils du matériel végétal.

Ainsi, les composés volatils extraits correspondent aux deux huiles essentielles respectives des feuilles et des inflorescences tandis que l'extraction des composés non volatils a été réalisée en utilisant séparément trois solvants de polarité différente aboutissant à l'obtention de trois extraits bruts distincts (aqueux, méthanolique et étherique) pour chacune des deux organes végétaux.

IV.1. Extraction des composés volatils

Les deux huiles essentielles respectives des feuilles et des inflorescences ont été extraites à l'aide d'un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger tel que décrit par la pharmacopée européenne [221].

IV.1.1. Principe de l'hydrodistillation par l'appareil de Clevenger

L'hydrodistillation des matrices végétales est réalisée dans un ballon réactionnel surmonté de l'appareil Clevenger (figure 2.3). Le chauffage du ballon, contenant le végétal immergé dans de l'eau distillée, permet l'extraction de l'huile essentielle qui forme subséquemment avec l'eau un mélange azéotrope. Au contact de la paroi du réfrigérant, les vapeurs chaudes issues de l'ébullition se condensent et alimentent l'essencier au fur et à mesure de la formation des gouttelettes d'eau chargées en huile essentielle. La très faible miscibilité de l'huile essentielle avec les molécules d'eau permet alors leur séparation en deux phases distinctes à l'intérieur de l'essencier. L'hydrolat (la phase aqueuse du distillat) formé au cours de l'hydrodistillation est continuellement recyclé en direction du ballon grâce au système de cohobation. A la fin de l'opération, l'huile essentielle ainsi extraite est séparément récupérée suite à l'évacuation de l'hydrolat (resté dans l'hydrodistillateur) par un robinet [222 ; 223].

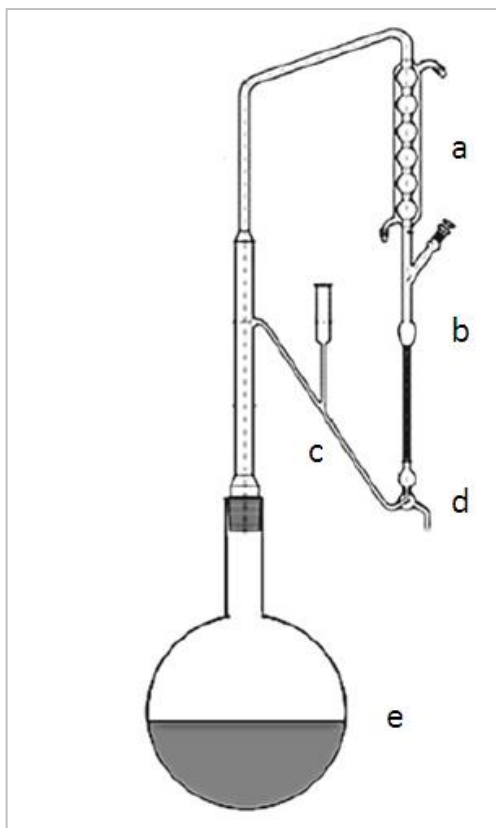


Figure 2.3 : Schématisation de l'appareil de type Clevenger [223]. a : réfrigérant, b : essencier, c : système de cohobation, d : robinet, e : ballon réactionnel

IV.1.2. Mode opératoire

L'huile essentielle des feuilles et celle des inflorescences ont été extraites avec un même mode opératoire : une quantité de 100 g de l'organe végétal séché et entier (non broyé) a été introduite dans un ballon d'une capacité de 1 litre auquel est ajouté un volume d'eau distillée de 500 ml. Après montage du Clevenger, le contenu du ballon est porté graduellement à une température de faible ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon adapté. La durée totale de l'extraction a été de 05 heures pour les deux organes végétaux. Deux rinçages successifs du Clevenger avec des petits volumes de pentane (grade HPLC) ont été nécessaires afin de récupérer la totalité de l'huile essentielle. Après séchage par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et évaporation du solvant de rinçage à température ambiante, l'huile essentielle a été pesée puis conservée dans un flacon en verre hermétiquement fermée (flacon pour chromatographie en phase gazeuse) à -18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) et à l'abri de la lumière [223].

IV.2. Extraction des composés non volatils

En fonction de la nature du solvant, le choix de la technique d'extraction pour la préparation des extraits bruts aqueux (feuilles et inflorescences) a porté sur la réalisation d'une décoction en utilisant de l'eau fraîchement distillée. Les extraits bruts méthanoliques et étheriques ont, quant à eux, été obtenus en procédant à une extraction par l'appareil de Soxhlet et en utilisant respectivement du méthanol et de l'éther de pétrole de haute pureté requise pour la chromatographie liquide à haute performance (grade HPLC).

Les différentes extractions des composés non volatiles ont été effectuées sur un matériel végétal séché et fraîchement broyé à l'aide d'un broyeur analytique [224].

L'ensemble des extractions ont été effectuées en duplicata en vue de calculer leur rendement respectif.

IV.2.1. Préparation des extraits bruts aqueux

IV.2.1.1. Principe de la décoction

Le principe de la décoction est basé sur l'extraction solide-liquide du contenu de la matière végétale par son immersion dans de l'eau porté à la température d'ébullition pendant toute la durée de l'extraction [225 ; 226].

IV.2.1.2. Mode opératoire

La décoction des deux organes végétaux a été menée sous un chauffage à reflux et assistée par l'agitation magnétique continue. 15 g de la matière végétale, séchée et finement broyée, ont été introduits dans un ballon d'une capacité de 1 litre puis immergés dans 300 ml d'eau fraîchement distillée (ratio [Masse de la matière végétale séchée (g)/ Volume du solvant (ml)] de 5 %). Le chauffage a été porté à la température de faible ébullition pendant une durée totale de 10 minutes [224 ; 227]. Les conditions physiques de l'extraction (chauffage et agitation continus) ont été assurées par l'utilisation d'un chauffe-ballon adapté et équipé d'un agitateur magnétique intégré.

Une première filtration des décoctés, contenant la matière végétale broyée, a été effectuée par gravité à l'aide d'une compresse en coton hydrophile stérile. Les

extraits ainsi débarrassés des particules relativement grossières ont fait l'objet d'une deuxième filtration sous vide par l'utilisation de membranes filtrantes en polytétrafluoroéthylène (PTFE ; porosité de 0,22 µm).

Le séchage des extraits aqueux filtrés a été réalisé à température et à pression basses par le biais d'un lyophilisateur. Cette lyophilisation a été opérée en trois étapes comprenant [228] :

- Une congélation préliminaire de l'extrait : - 20°C pendant 15 heures ;
- Une dessiccation primaire : - 80°C (température du condenseur) à 0.2 mbar pendant 24 heures ;
- Une dessiccation secondaire : - 80°C (température du condenseur) à 0,09 mbar pendant 4 heures.

Une fois lyophilisés, les extraits ont été conservés à -18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) et à l'abri de la lumière, dans des boîtes de Pétri en verre rendues hermétiquement étanches [229 ; 230].

IV.2.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques et étheriques

IV.2.2.1. Principe de l'extraction par l'appareil de Soxhlet

L'échantillon végétal, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur du corps de l'extracteur, est soumis à l'extraction liquide-solide par un solvant d'extraction qui, au départ, est contenu dans le ballon de distillation (figure 2.4). Ce dernier, lorsque chauffé, produit des vapeurs (issues de l'ébullition du solvant) qui passent du ballon au réfrigérant de condensation via le tube adducteur. Les vapeurs, rendues liquides suite à leur condensation, alimentent alors le contenu du corps de l'appareil en solvant d'extraction. Le remplissage se poursuit jusqu'à atteindre un niveau correspondant au sommet du siphon ; ce qui entraîne subséquemment le retour du solvant chargé en solutés dans le ballon de distillation. L'évaporation du solvant, la condensation des vapeurs puis le siphonage correspondent à un cycle d'extraction. A chaque nouveau cycle, un renouvellement du solvant frais, à l'emplacement de l'échantillon, est assuré par la distillation tandis que le ballon s'enrichit en substances extraites. L'extraction peut ainsi être poursuivie jusqu'à épuisement de la matrice végétale en substances d'intérêt [231].

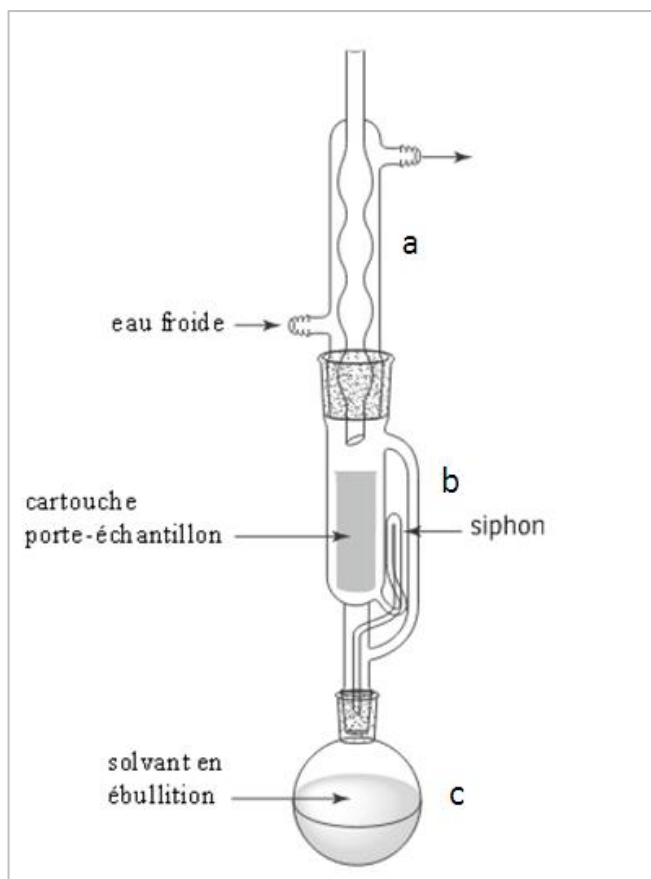


Figure 2.4 : Schématisation de l'appareil de type Soxhlet [232]. a : réfrigérant, b : extracteur, c : ballon de distillation

IV.2.2.2. Mode opératoire

Le matériel végétal séché finement broyé a été introduit dans une cartouche poreuse cellulosique afin de subir une extraction à l'aide de l'appareil de Soxhlet. Les conditions opératoires des différentes extractions varient en fonction de la nature des solvants sélectionnés et de la quantité de composés extractibles inhérente aux deux organes végétaux.

Les extraits méthanoliques des feuilles et des inflorescences ont été préparés en utilisant un volume total de 300 ml de méthanol (grade HPLC) pour 15g de matière végétale séchée ; ce qui correspond à un ratio [Masse de la matière végétale séchée (g)/ Volume du solvant (ml)] de 5 %. Le chauffage du ballon de distillation, d'une capacité de 1 litre, a été stabilisé aux environs de 65°C (température d'ébullition du méthanol). Un temps de 13 heures d'extraction continue a été

nécessaire pour l'épuisement des feuilles de leur contenu extractible au méthanol tandis que l'extraction des inflorescences a été réalisée au bout de 10 heures.

L'extraction à l'éther de pétrole pour les deux organes végétaux a, quant à elle, été effectuée sur la base d'un ratio [Masse de la matière végétale séchée (g)/ Volume du solvant (ml)] de 10% (soit 30g de poudre végétale pour 300 ml de solvant) et avec un chauffage du solvant à une température comprise entre 40°C et 60°C (température d'ébullition du solvant). L'épuisement total du contenu extractible des feuilles et celui des inflorescences ont respectivement été atteints après 10 et 08 heures d'extraction continue.

Durant le déroulement des extractions, le contenu du ballon de distillation a fait l'objet d'une agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique intégré au chauffe-ballon. Cette agitation a pour effet d'uniformiser la température à l'intérieur du ballon, d'éviter les à-coups d'ébullition (remontée de la solution d'extraction) et de favoriser l'évaporation du solvant [233 ; 234].

Après avoir obtenu les extraits méthanoliques et étheriques respectifs des feuilles et des inflorescences, ces derniers ont fait l'objet d'une filtration sous vide à travers des membranes en PTFE avec une porosité de 0,22 µm, et ce, afin de les débarrasser des éventuelles impuretés. Une fois filtrés, les extraits ont entièrement été séchés de leur solvant d'extraction par le biais d'un évaporateur rotatif équipé d'une pompe à vide. Les températures d'évaporation des solvants pour les extraits méthanoliques et étheriques n'ont, respectivement, pas dépassé les 41°C et 25°C. Les extraits secs obtenus ont, par la suite, été conservés dans les mêmes conditions que celles décrites pour les extraits aqueux (à -18°C et à l'abri de la lumière).

IV.3. Dosage de la teneur en humidité des organes végétaux séchés et calcul des rendements des extractions

La teneur en humidité des organes végétaux séchés a été déterminée en appliquant la méthode gravimétrique de la perte de poids par dessiccation à l'étuve [235].

Des quantités comprises entre 1 et 2 g (pesées au mg près) de l'organe végétal finement et rapidement broyé, contenues dans des boîtes de Pétri en verre de 70

mm de diamètre, ont été soumises à une dessiccation à poids constant dans une étuve réglée à la température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Le temps nécessaire à la dessiccation a été défini de manière à ce que deux pesées consécutives, pratiquées après un temps supplémentaire d'une heure, ne diffèrent pas de plus de 0,5 mg/g de matériel végétal analysé.

Après deux heures de passage à l'étuve, le refroidissement des boîtes de Pétri, précédant leur pesée respective, a été opéré dans un dessiccateur contenant des perles de gel de silice comme agent desséchant. La teneur en humidité correspond alors à la différence de poids appréciée après dessiccation de la matière végétale. Le dosage a été réalisé en triplicata.

La teneur en humidité ainsi déterminée a été prise en considération lors du calcul du rendement des différentes extractions. Ce dernier a été effectué après chaque extraction en utilisant la formule suivante [235] :

$$R (\%) = Q_{ME} / Q_{MVS} \times 100$$

R : Rendement de l'extraction en g/100g.

Q_{ME} : Quantité de matière extraite (en gramme).

Q_{MVS} : Quantité de matière végétale sèche utilisée pour l'extraction (en gramme).

V. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

V.1. Criblage phytochimique préliminaire

Les tests relatifs au criblage phytochimique des extraits de feuilles et ceux des inflorescences ont été opérés dans des tubes à essai et menés sur les extraits bruts préalablement dissouts dans du méthanol à l'exception des extraits aqueux qui eux ont été dissouts dans de l'eau distillée. Les solutions ainsi obtenues ont été préparées de manière à avoir une concentration d'environ 50 mg/ml [236 ; 237].

L'analyse qualitative découlant de ces tests, a porté sur la mise en évidence de la présence des composés réducteurs, des tannins, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des glycosides cardiotoniques pour l'ensemble des extraits bruts. L'éventuelle présence des saponosides a, quant à elle, été investiguée sur les extraits aqueux

et méthanoliques tandis que celle des mucilages a été réalisée uniquement sur les extraits aqueux ; étant donnée la nature des extraits et celle de la réaction d'identification appliquée. Tous les tests ont été réalisés en présence d'un témoin négatif.

V.1.1. Mise en évidence des sucres réducteurs

Un volume de 1 ml de l'extrait dissout a été mélangé, à volume égal, avec le réactif de Fehling. L'apparition d'un précipité rouge brique, après chauffage au bain-marie, suggère la présence de sucres réducteurs [238].

V.1.2. Mise en évidence des tannins

Quelques gouttes d'une solution aqueuse de trichlorure de fer (FeCl_3) à 5% ont été ajoutées au tube à essai contenant 1 ml de l'extrait dissout. Le développement instantané d'une coloration bleu-noir, bleu-vert ou brun verdâtre et la formation d'un précipité de même couleur, suppose la présence de tannins dans l'extrait testé [239].

V.1.3. Mise en évidence des flavonoïdes

- **Test de Shinoda**

A 1 ml de l'extrait, auquel ont été additionnés quelques copeaux de magnésium, environ 04 gouttes d'acide chlorhydrique concentré (HCl ; 0,5 N) ont été ajoutées. La coloration de la solution en rose, rouge ou orange suppose la présence de flavonoïdes [236].

- **Test à l'hydroxyde de sodium**

Un volume d'environ 0,5 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH ; 0,1 N) à 10 % a été mélangé avec 1 ml de l'extrait dissout. L'apparition d'une coloration jaune, puis sa disparition instantanée après ajout de quelques gouttes d' HCl , implique la conclusion d'un test positif aux flavonoïdes [240].

V.1.4. Mise en évidence des alcaloïdes

- **Test au réactif de Dragendorff**

Environ 1 ml de chaque extrait a été mélangé, à volume égal, avec le réactif de Dragendorff (iodobismuthite de potassium). L'occurrence d'un précipité de couleur jaune ou rouge orangé implique un résultat positif du test [241].

Le réactif de Dragendorff est préparé 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 [241] :

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

- **Test au réactif de Hager**

Le test a été réalisé en ajoutant 1 ml du réactif de Hager (solution saturée en acide picrique) au même volume de l'extrait dissout. Le développement d'un précipité jaune cristallin suggère la présence d'alcaloïdes dans l'extrait [241].

V.1.5. Mise en évidence des glycosides cardiotoniques

Suivant le test de Keller-Killiani, l'extrait sec, d'une quantité de 50 mg, a été mélangé avec 2 ml d'anhydride acétique contenant une goutte d'une solution de FeCl_3 à 5%. A ce mélange, ont été délicatement additionnés 1 ml d'acide sulfurique concentré (1 N) de manière à obtenir une solution à deux phases. L'apparition, dans la phase acétique, d'une coloration bleu-vert met en évidence l'éventuelle présence de glycosides cardiotoniques dans l'extrait [235].

V.1.6. Mise en évidence des saponosides

Dans le tube à essai, 0,5 ml des extraits aqueux et méthanoliques ont été séparément dilués dans 10 ml d'eau distillée. Les solutions ainsi obtenues ont été soumises à une forte agitation manuelle, pendant 15 min, dans le sens de la longueur du tube à essai. La formation d'une mousse persistante, après agitation, suggère la présence de saponosides [236].

V.1.7. Mise en évidence des mucilages

Un volume de 1 ml de l'extrait aqueux dissout a été dilué dans 4 ml l'eau distillée. La solution, ainsi obtenue, a été mélangée avec 12,5 ml d'éthanol absolu. L'apparition d'un précipité blanchâtre et floconneux indique un test positif aux mucilages [236].

V.2. Détermination de la teneur des extraits bruts en composés phénoliques totaux

La détermination de la teneur en composés phénoliques totaux a été menée sur les extraits bruts aqueux, méthanoliques et étheriques selon la méthode initialement décrite par Folin et Ciocalteu (1927) et modifiée par Singleton et Rossi (1965) [242].

La méthode est basée sur le potentiel réducteur des composés phénoliques envers deux métaux lourds que contient le réactif de Folin-Ciocalteu : le phosphomolybdate et le phosphotungstate. Cette réaction d'oxydoréduction se manifeste alors par la production d'une coloration bleue proportionnelle à la quantité de métaux lourds réduits et dont l'intensité est mesurée par colorimétrie [243].

Le dosage a été effectué sur des échantillons d'extraits dilués dans du méthanol à la concentration de 1 mg/ml.

Le mode opératoire a consisté en l'introduction, dans des tubes à essai distincts, de 200 µl d'échantillons à doser auxquels ont été ajoutés 1000 µl du réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué au dixième dans du méthanol. Après 4 min d'incubation, 800 µl d'une solution méthanolique saturée en carbonate de sodium (75 g/l) ont été additionnés aux tubes à essai respectifs. Suite à une seconde incubation de 120 min, l'absorbance des solutions réactionnelles ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à port multiple de cellule dont la longueur d'onde de lecture a été réglée à 760 nm. La lecture des ces absorbances a été confrontée à celle du blanc de la solution réactionnelle ne contenant pas d'échantillon.

Par ailleurs, l'éventuelle absorbance des échantillons (à la longueur d'onde de lecture) a été contrôlée par la lecture d'un témoin dont le volume correspondant au

réactif de Folin-Ciocalteu a été remplacé par du méthanol. Ce contrôle a été établi afin de confirmer l'absence d'interférences ou de leur suppression le cas contraire.

Les résultats ont été déterminés après extrapolation sur une courbe d'étalonnage réalisée avec une gamme de 07 concentrations de l'acide gallique (12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml) et ont été exprimés en milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

Toutes les manipulations ont été exécutées à température ambiante et à l'abri d'une exposition à la lumière du soleil [242].

Le dosage de chaque échantillon ainsi que la réalisation de la courbe d'étalonnage ont été effectués en triplicata en vue de calculer l'incertitude.

V.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) a été appliquée en vue de l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles.

Le chromatographe utilisé est un Hewlett-Packard de la série HP 6890, munie d'un détecteur sélectif de masse quadripôle (HP 5973) et d'un injecteur automatique (Agilent7683B). La séparation chromatographique a été réalisée dans une colonne capillaire apolaire à 5 % phenyl-methylpolysilixane (HP-5 MS) de 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 µm d'épaisseur du film.

Les injections, en mode Split (1:20), ont été exécutées automatiquement avec un volume injecté de 1 µl d'huile essentielle diluée dans de l'hexane (dilution 1/2) et une température de l'injecteur fixée à 250°C. L'hélium a servi de gaz vecteur avec un débit de 0,5 ml / min.

L'augmentation de température de la colonne a été programmée de façon à passer de 60°C à 240°C à raison de 4°C/min, et ce, après un palier isotherme de 8 min à 60°C.

La fragmentation a été effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV tandis que la détection a été ajustée pour des molécules ionisées de rapport masse/charge (m/z) allant de 34 à 550.

L'identification moléculaire a été réalisée en se basant sur l'interprétation des spectres de masse par le logiciel d'acquisition (Chemstation) relié aux bases de données de Wiley (7^{ème} édition) et NIST (version 2002), ainsi que par le calcul des indices de Kovats (IK) propres aux composés analysés et leur comparaison avec ceux publiés par Adams (1995 ; 2007) [244 ; 245] et NIST [246]. Les indices de Kovats (indices de rétention) n'ont été calculés qu'après injection chromatographique d'une série d'alcane linéaires (n-alcane : C₉-C₂₈) dans les mêmes conditions opératoires que celles établies pour l'analyse des huiles essentielles [247].

Les indices de Kovats (IK) ont été calculés par l'utilisation de l'équation suivante [248] :

$$IK = 100 (Z) + 100 [(tr_{(x)} - tr_{(z)}) / (tr_{(z+1)} - tr_{(z)})]$$

IK : indices de Kovats ;

Z : nombre de carbones de l'étalon n-alcane qui précède la détection de l'analyte inconnu ;

tr_(x) : temps de rétention de l'analyte inconnu ;

tr_(z) : temps de rétention de l'étalon n-alcane qui précède la détection de l'analyte inconnu ;

tr_(z+1) : temps de rétention de l'étalon n-alcane qui fait suite à la détection de l'analyte inconnu.

V.4. Analyse de la composition chimique des extraits étheriques

L'analyse phytochimique des deux extraits bruts étheriques (feuilles et inflorescences) a été réalisée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Pour ce faire, les deux extraits ont subi, au préalable, un prétraitement de dérivation par estérification destiné à réduire la polarité moléculaire des composés à groupement carboxyliques et permettre ainsi

leur volatilisation à une température suffisamment élevée sans pour autant provoquer une dégradation thermique de ces derniers [249 ; 250].

V.4.1. Dérivation chimique des extraits

Le protocole appliqué pour dérivation chimique correspond à la méthode d'estérification à froid tel que décrite par Stefanoudaki ; aboutissant à la transformation des composés à groupement carboxyliques en composés à méthyl ester [251].

Dans un tube à essai muni d'un bouchon à vis, une quantité avoisinant les 30 mg d'extrait étherique a été solubilisée dans un volume de 1 ml d'hexane puis mélangé à une solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2N) additionnée à volume égal. A la solution ainsi obtenue, un temps de réaction de 15 min a été appliqué dans une température de $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Au terme de la réaction, la phase superficielle du mélange réactionnel a été récupérée en vue d'être analysée.

V.4.2. Chromatographie des extraits dérivatisés

Les caractéristiques techniques de l'appareillage et de la colonne chromatographique utilisée sont similaires à ceux décrites dans l'analyse des huiles essentielles.

L'injection des extraits dérivatisés (1 μl) a été effectuée en mode Split (1:20) au sein d'un injecteur dont température a été fixée à 280°C . Le gaz vecteur étant l'hélium a été utilisé avec un débit de 1 ml / min.

La programmation du gradient de température de la colonne a été établie de manière à passer d'un palier isotherme de 5 min à 70°C jusqu'à la température de 220°C à raison de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$; suivi d'un deuxième palier isotherme de 15 min à 220°C pour finalement atteindre, à raison de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, la température du troisième palier de 300°C pendant 1 min.

La marge de détection des molécules ionisées a été définie pour des rapports m/z allant de 34 à 550. L'identification chimique des composés alkylés a été effectuée

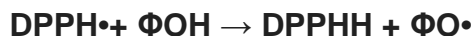
à l'aide du logiciel Chemstation relié aux bibliothèques de spectres de masse de Wiley (7^{ème} édition) et NIST (version 2002) [248].

VI. ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

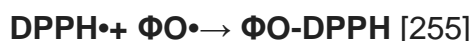
VI.1. Evaluation quantitative de l'activité antioxydante

Le potentiel antioxydant des huiles essentielles et celui des extraits bruts été évalué en appliquant la méthode relative au piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•) telle que décrite par Brand-William *et al.* (1995) et modifiée par Zhang *et al.* (2009) [252 ; 253]. Cette méthode a été adaptée à l'utilisation des microplaques (figure 2.5) comme support de tests impliquant des volumes réactionnels de l'ordre du microlitre.

Le piégeage du DPPH• est tributaire de sa réactivité avec des composés anti-radicalaires dont le mécanisme principal d'action se traduit par la réduction de ce monoradical en DPPHH suite au transfert d'un atome d'hydrogène [254].



($\Phi\text{-O}$: composé phénolique)



Le DPPH• est un radical libre stable de sorte qu'il ne se dimérise pas en conditions expérimentales. Mis en solution dans du méthanol ou de l'éthanol, ce radical possède une couleur violette qui vire vers le jaune pâle lorsque celui-ci subi une réduction. La mesure spectrophotométrique de la disparition de la couleur violette (proportionnelle à la quantité de DPPH• réduit) permet alors l'évaluation de la capacité anti-radicalaire des échantillons d'intérêt [254].

Le test a été conduit dans des microplaques de 96 puits (figure 2.5) à partir d'une solution méthanolique de DPPH• à 200 μM (78,864 $\mu\text{g/ml}$) et d'une gamme à 8 points de concentrations de l'échantillon à tester ; allant de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ à 4000 $\mu\text{g/ml}$ pour ce qui est des huiles essentielles et de 3.906 $\mu\text{g/ml}$ à 500 $\mu\text{g/ml}$ concernant les extraits bruts. Ces concentrations ont été préparées dans du méthanol en opérant des dilutions successives (facteur de 2) directement sur la

microplaque, à raison de 100 μ l d'échantillon dilué par puits (la capacité totale de chaque puits étant de 400 μ l).

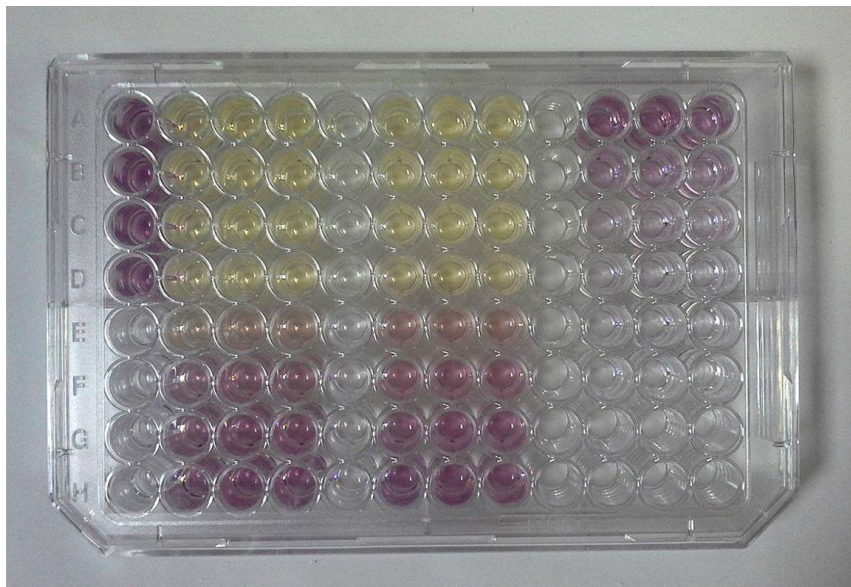


Figure 2.5 : Test de piégeage du radical libre DPPH• mené en microplaque (96 puits)

A l'aide d'une micropipette multicanaux, 100 μ l de la solution fraîchement préparée de DPPH• ont été mélangés aux 100 μ l de l'échantillon préalablement contenus dans chaque puits. Après 40 min de temps d'incubation, la lecture de l'absorbance des 96 puits a été effectuée à la longueur d'onde de 550 nm en utilisant un lecteur spectrophotométrique de microplaque approprié [256].

La capacité antiradicalaire de l'acide ascorbique et celle de la quercitine, étant les deux témoins positifs du test, a été évaluée à partir d'une gamme de huit concentrations (allant de 0,781 μ g/ml à 100 μ g/ml).

Le témoin négatif du test est la solution de DPPH• (200 μ M) ajustée à la concentration finale du mélange réactionnel par l'ajout de méthanol. Le blanc de la réaction (blanc de l'échantillon), ne contenant pas de DPPH•, a été établi pour les solutions de l'échantillon de chaque concentration testée en diluant ces dernières dans 100 μ l de méthanol de manière à atteindre la concentration finale correspondante. Quant au blanc du témoin négatif (ne contenant pas d'échantillon), celui-ci équivaut à l'utilisation du méthanol seul (200 μ l).

Une courbe de calibration de la solution de DPPH• a, par ailleurs, été réalisée avec 08 concentrations (allant de 0,308 µg/ml à 39,432 µg/ml) dans le but de vérifier sa linéarité dans les conditions expérimentales similaires à ceux du test.

L'ensemble des tests ont été répétés en quadruplicata et ont été exécutés à température ambiante et à l'abri de la lumière solaire.

L'expression des résultats a été accomplie en définissant la concentration inhibitrice à 50 % de DPPH• (CI50) pour chaque échantillon et témoin positif, et ce, à l'aide du logiciel informatique GraphPad, Prism 5 (par extrapolation à partir de la courbe d'inhibition du DPPH• en fonction des différentes concentrations testés).

Le pourcentage d'inhibition a été calculé en appliquant la formule suivante [257] :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH}\bullet = 100 \times [(A_X) - (A_{BE})] / [(A_T) - (A_{MeOH})]$$

A_X : Absorbance du mélange réactionnel ;

A_{BE} : Absorbance du blanc de l'échantillon ;

A_T : Absorbance du témoin négatif ;

A_{MeOH} : Absorbance du méthanol.

La CI50 a été également exprimée en [µg d'extrait/µg de DPPH] en vue de s'affranchir de l'influence de la variabilité des méthodes expérimentales sur l'analyse des résultats [258]. Les résultats ainsi convertis correspondent aux Indices du Potentiel Anti-Radicalaire (IPAR).

VI.2. Evaluation de l'activité anti-leishmanienne

L'évaluation *in-vitro* du potentiel anti-leishmanien des feuilles et des inflorescences a été conduite en deux étapes incluant, dans un premier temps, un criblage préliminaire des extraits et des huiles essentielles susceptibles de provoquer une inhibition de la croissance parasitaire ; suivi, dans un second temps, de la détermination de la concentration inhibitrice à 50% (CI50) relative aux seuls extraits et/ou huiles essentielles ayant révélé une activité pertinente lors du criblage préliminaire. Pour ces extraits, une évaluation complémentaire de la cytotoxicité a été réalisée dans le but d'estimer leur indice de sélectivité (IS)

respectif. L'ensemble des manipulations ont été effectuées en suivant les protocoles opératoires internes du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.

VI.2.1. Conditions de culture des parasites et détermination des jours de récolte

Les isolats parasitaires faisant l'objet de l'étude sont au nombre de cinq. Il s'agit de :

- *Leishmania major* : LIPA 32/06 « MON-25 » ;
- *L. major* : MHOM/DZ/2009/LIPA 100 « MON-25 » ;
- *L. infantum* : MCAN/DZ/2006/LEM 5285 « MON-281 » ;
- *L. kilicki* : MHOM/DZ/2011/LIPA281 « MON-301 » ;
- *L. donovani* : MHOM/IN/80/DD8 « MON-2 » (référence ATCC 50212).

L'entretien des souches a été assuré par la culture des formes promastigotes sur le milieu biphasique Novy-Mc Neal-Nicolle (milieu NNN) de pH 7.2, dans une étuve microbiologique réglée à la température de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Une bonne confluence des cultures, sur ce milieu, est atteinte après 5 à 7 jours d'incubation d'où l'intérêt d'un examen microscopique hebdomadaire des cultures et leur repiquage sur un milieu frais si besoin.

Au préalable à chaque test d'inhibition de la croissance parasitaire, une culture en masse des promastigotes a été réalisée en transférant progressivement ces derniers du milieu NNN vers le milieu de Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) ajusté au pH 7,2 et additionné à 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) inactivé par la chaleur (56°C pendant 30 min), sans ajout d'antibiotiques (Milieu complet). Ce transfert a été exécuté en condition de stérilité après vérification de l'état des cultures au microscope photonique (densité, forme et mobilité des parasites et absence de contaminations).

La culture des parasites sur le milieu complet a été opérée dans des flacons de culture cellulaire de 15 cm², à 25°C, pour une durée d'incubation variant en fonction des souches de 3 à 4 jours.

A cet égard et dans le but de déterminer le jour de récolte des promastigotes approprié à l'exécution des tests d'inhibition (promastigotes en stade de division), la cinétique de croissance parasitaire en milieu complet a été étudiée pour les 05 isolats.

L'évolution de la croissance parasitaire a été estimée sur 04 jours en calculant la concentration du milieu en parasite quotidiennement par comptage microscopique direct sur cellule de Thoma (annexe F).

Le comptage direct des promastigotes viables a été réalisé après coloration de ces derniers au bleu de trypan et leur fixation par du formaldéhyde à 10 %. Ces réactifs ont été ajoutés à volume égal à celui de l'échantillon examiné prélevé de la suspension cellulaire.

L'ensemble des manipulations ayant nécessité un environnement de travail stérile ont été exécutées à l'intérieur d'une hotte stérile à flux laminaire (hotte de sécurité type 2).

La composition des milieux de culture est détaillée dans l'annexe E.

VI.2.2. Tests d'inhibition *in vitro* de la croissance des parasites en milieu liquide

En amont des tests et selon leurs propriétés physico-chimiques respectives, les extraits méthanoliques et étheriques ainsi que les huiles essentielles ont été dissouts dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis dilués dans un volume de RPMI complet de manière à ce que la concentration finale du DMSO ne dépasse pas les 0,3 % (v/v) [259]. Les extraits aqueux ont, quant à eux, été directement dissouts dans un volume de milieu de culture, en absence de DMSO. La stérilité des extraits a été assurée par l'utilisation des membranes filtrantes en PTFE d'une porosité de 0,22 μm de diamètre.

Les tests d'inhibition de la croissance des *Leishmania* spp. ont été effectués sur des promastigotes pris en phase exponentielle de croissance (déterminée par l'étude de la cinétique de croissance) avec une concentration parasitaire initiale ajustée à 10^6 parasites/ml de RPMI complet.

L'ajustement de la concentration parasitaire a été précédé par un renouvellement du milieu de culture en centrifugeant la suspension cellulaire dans des tubes coniques (2500xG pendant 10 min), éliminant le surnageant (milieu épuisé) puis en remettant le culot (parasites) en suspension dans du RPMI complet frais. La numération des promastigotes par comptage direct sur cellule Thoma a permis alors le calcul de la concentration parasitaire et son ajustement à volume constant de milieu de culture.

La suspension parasitaire, de concentration ainsi ajustée (10^6 parasites/ml), a été mise à incuber en condition axénique dans une microplaque stérile de 96 puits (figure 2.6) à raison de 90 μ l de suspension par puits, auquel 10 μ l de l'extrait et/ou huile essentielle ont été préalablement introduits. Les puits en question possèdent un fond plat avec un diamètre interne de 6,2 mm. Le témoin négatif du test a été établi en remplaçant, à volume égal, l'extrait et/ou huile essentielle par du RPMI complet. L'amphotéricine B a, quant à elle, été utilisée comme témoin positif avec une concentration finale de 2 μ g/ml.

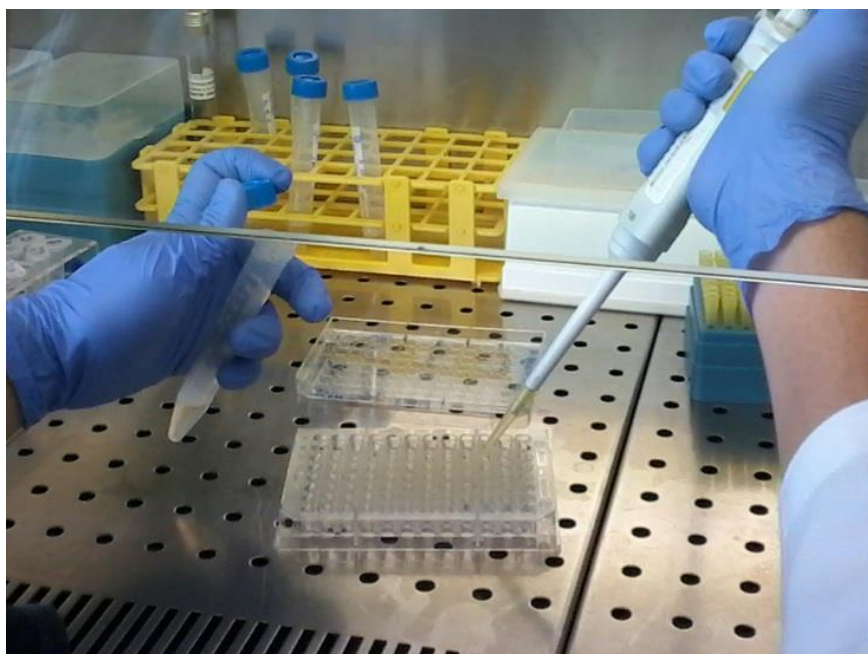


Figure 2.6 : Test d'inhibition de la croissance parasitaire mené en microplaque (96 puits)

Par ailleurs, un contrôle constitué de suspension parasitaire additionnée de DMSO, à la même concentration utilisée lors de la dissolution des extraits et

huiles essentielles (0,3%), a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales.

Après 72 heures d'incubation à 25°C, la lecture des résultats a été réalisée par comptage direct des promastigotes sur cellule de Thoma. Le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire a été déterminé en comparant la densité des parasites en milieux contenant l'échantillon testé avec celle du témoin négatif.

Lors du criblage préliminaire, l'ensemble des extraits et des huiles essentielles des deux organes végétaux ont été testés à la concentration finale de 250 µg/ml.

Les CI50 de l'activité leishmanicide, inhérente aux seuls extraits et/ou huiles essentielles sélectionnés à partir des résultats du criblage préliminaire, ont été déterminées en testant le potentiel anti-leishmanien de ces derniers à différentes concentrations : 3,12 µg/ml ; 6,25 µg/ml ; 12,5 µg/ml ; 25 µg/ml ; 50 µg/ml ; 100 µg/ml ; 150 µg/ml et 200 µg/ml. La détermination des CI50 a été effectuée à l'aide du logiciel informatique GraphPad, Prism 5.

A des fins de comparaison, la CI50 de l'amphotéricine B (témoin positif) a également été déterminée à partir de cinq concentrations différentes : 0,25 µg/ml ; 0,5 µg/ml ; 0,75 µg/ml ; 1 µg/ml et 1,5 µg/ml. L'ensemble des tests ont été exécutés en quadruplicata.

VI.2.3. Evaluation de la cytotoxicité

Le test de cytotoxicité des extraits et/ou des huiles essentielles a été mené sur des macrophages issus de la différenciation *in-vitro* de la lignée de cellules monocytaires THP-1.

Cette différenciation a été provoquée en incubant, dans des microplaques stériles (96 puits), la suspension de cellulaire de THP-1 à $5 \cdot 10^5$ cellules/ml de RPMI complet en présence de 20 ng/ml de phorbol myristate acétate (PMA). Les microplaques utilisées possèdent des puits à fond plat dont la surface a été traitée de manière à favoriser une adhérence optimale des cellules (Corning, CC). L'incubation a été opérée à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24 heures. Les macrophages ainsi différenciés ont adhéré aux fonds des puits et ont fait l'objet de deux rinçages successifs avec du RPMI exempt de PMA.

Les extraits dissouts et dilués dans du RPMI complet ont, par la suite, été introduits dans les puits contenant les macrophages à raison de 100µl/puits. L'incubation des microplaques a été réalisée à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 72 heures. Les échantillons ont été testés à la concentration de 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml et 250 µg/ml en vue de calculer leur CI50 respectif.

La viabilité cellulaire a été mesurée sur la base d'un comptage direct des cellules vivantes par observation des microplaques au microscope photonique inversé (Gx20 ph) après lavage des macrophages au tampon phosphate salin et leur coloration au bleu de trypan (annexe F).

VI.2.4. Détermination de l'indice de sélectivité

Le rapport des deux activités étudiées [CI50 Activité Cytotoxique / CI50 Activité Leishmanicide], a permis le calcul de l'indice de sélectivité (IS) dont l'interprétation renseigne sur le potentiel d'un échantillon testé à provoquer une activité toxique sélective envers les parasites. Si la valeur de l'IS est supérieure à 1, l'extrait et/ou l'huile essentielle étudiée est considérée comme sélective envers les parasites. Inversement, si l'IS est inférieur à 1, l'échantillon en question est plus cytotoxique qu'antiparasitaire [260 ; 261].

VII. ANALYSE STATISTIQUE ET ILLUSTRATION GRAPHIQUE DES RESULTATS

L'analyse descriptive des données a été effectuée par le calcul de la moyenne arithmétique et de l'intervalle de confiance à 95 % concernant les résultats de la teneur en humidité des organes végétaux, des rendements d'extraction, du dosage des polyphénols totaux et des activités biologiques des produits d'extraction.

En ce qui ce rapporte aux mesures biométriques des organes végétaux, le choix s'est porté sur la détermination du mode et de l'étendue des mesures réalisées. Le mode étant la valeur dominante de la variable dans une série de valeurs observées ; la mesure de cette tendance centrale correspond mieux à la nature des données biométriques recueillies, du fait que cette dernière ne soit pas

sensible aux valeurs extrêmes d'une population de données comme pourrait l'être une moyenne arithmétique [262].

La signification des différences existantes entre les résultats a été analysée par l'application du test t de Student pour la comparaison de deux moyennes et du test d'analyse de la variance (ANOVA) à un ou deux facteurs suivi respectivement des tests de Tukey et Bonferroni pour les comparaisons multiples. Le seuil de significativité α est de 0,05 ; la valeur $p > 0,05$ est considérée comme correspondant à une différence non significative [263]. L'analyse statistique des résultats a été accomplie via le logiciel informatique GraphPad, Prism 5 (les résultats détaillés sont rapportés à l'annexe I). L'illustration graphique des résultats a été réalisée à l'aide du même logiciel.

Chapitre 3 : **Résultats et discussions**

I. DESCRIPTION VISUELLE ET BIOMETRIQUE DES ORGANES VEGETAUX ETUDIES

I.1. Résultats

L'observation visuelle des organes végétaux non séchés et celle effectuée à l'aide d'une loupe binoculaire, sont illustrées dans la figure 3.1.

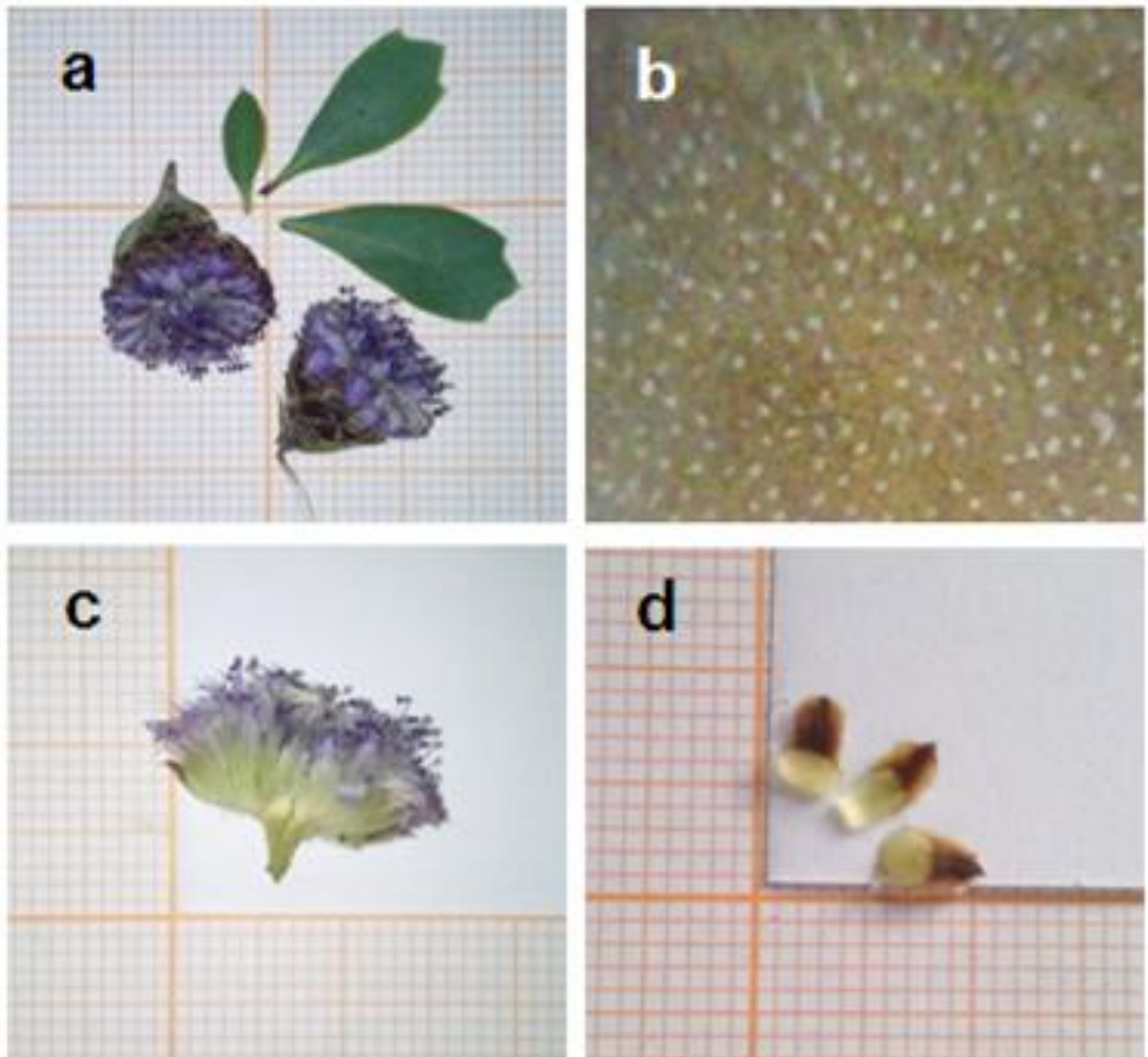


Figure 3.1 : Observations effectuées sur les organes végétaux étudiés ; a : feuilles et inflorescences, b : points blanchâtres observés sur les feuilles (Gx1,5), c : coupe axiale de l'inflorescence, d : bractées de l'involucre

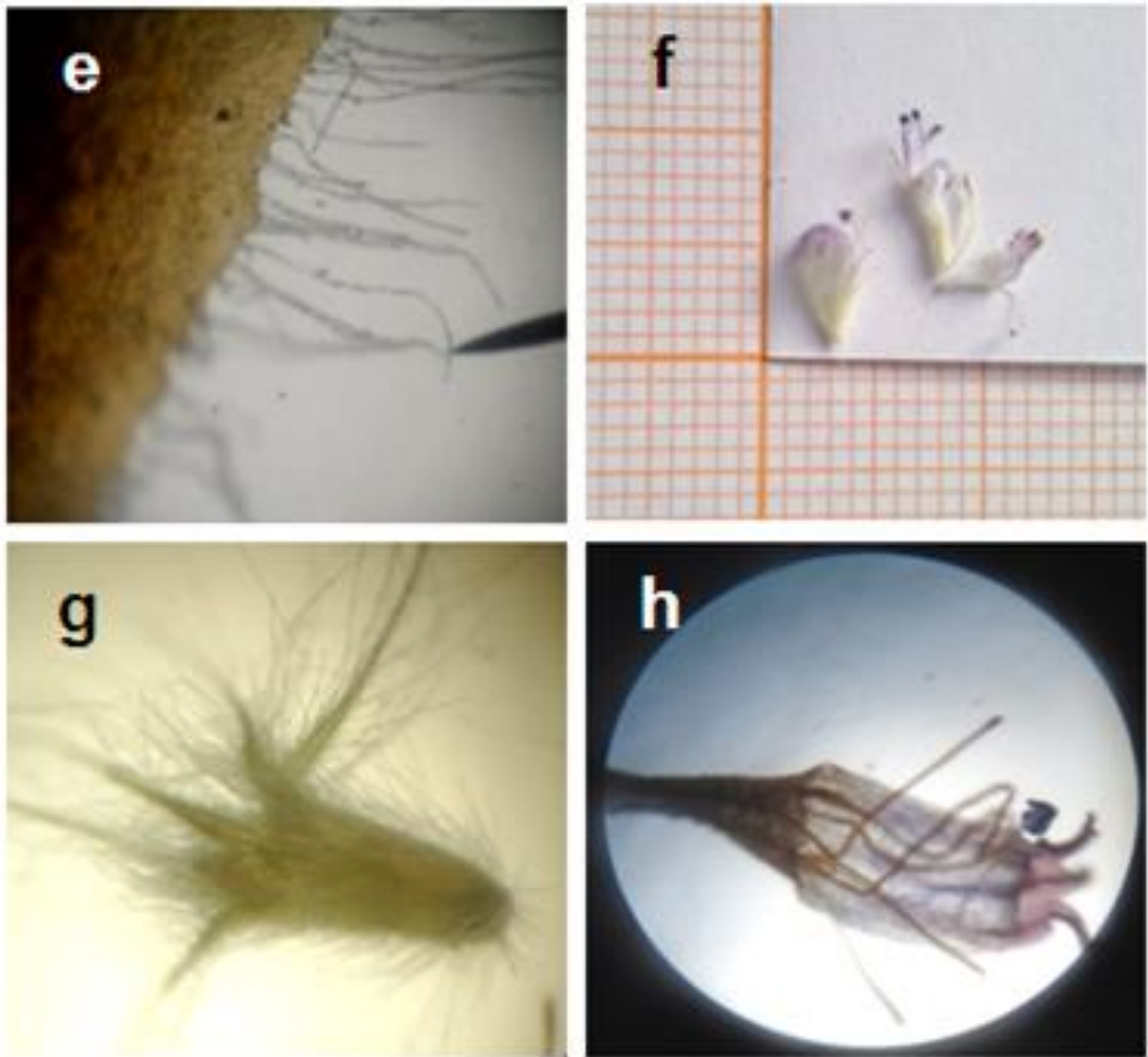


Figure 3.1 (suite) : Observations effectuées sur les organes végétaux étudiés ;
 e : bord cilié du bractée (Gx3), f : fleurs, g : calice (Gx1,5),
 h ; corolle, androcée et gynécée (Gx1,5)

Les feuilles récoltées se présentent de couleur vert-glaucue, de forme oblancéolées-cunéiformes, entières mucronées ou tridentées (figure 3.1 ; a) et présentant à la loupe de multiple points blanchâtres sur ses deux faces (figure 3.1 ; b).

Le réceptacle de l'inflorescence est hémisphérique (figure 3.1 ; c). Les bractées de l'involucre, sont ovales-oblongues, mucronées et ciliées sur les bords (figure 3.1 ; d et e). Les fleurs zygomorphes pentamériques, de couleur violacée, possèdent un calice profondément quinquefide, portant de longs poils, ainsi qu'une corolle bilabiée à lèvres inégales (lèvre supérieure petite, bifide et l'inférieure plus grande,

trifide). Les quatre étamines sont didynames et insérées sur la corolle (figure 3.1 ; f, g et h).

Le poids et les mensurations respectifs des feuilles et des inflorescences séchées de *Globularia alypum* L. sont décrits dans le tableau 2.1. Les résultats obtenus y sont représentés par le mode, exprimant la valeur la plus fréquente dans l'ensemble des données, ainsi que par l'étendue de la dispersion.

Tableau 2.1 : Poids et mensurations des organes végétaux séchés

Organe végétal	Poids (mg)	Mensurations (mm)		
		longueur	largeur	diamètre
	m _o [étendu]	m _o [étendu]	m _o [étendu]	m _o [étendu]
Feuille	11 [2-28]	11 [6-23]	4 [2-8]	/
Inflorescence	63 [57-119]	/	/	13 [9-14]

m_o : mode de la variable mesurée.

I.2. Discussion

Les clefs de détermination taxonomique proposées pour les espèces *Globularia* spp. sont notamment basées sur les caractères morphologiques de leurs feuilles et pièces florales respectives. L'ensemble des caractères observés dans nos échantillons correspondent bien à ceux décrits dans la littérature pour l'espèce *G. alypum* L. [13 ; 19 ; 30].

Les points blanchâtres observés, à la loupe, sur la surface de la feuille ont été assimilés aux sécrétions calcaires (CaCO₃) produites, par cet organe, au moyen des poils glanduleux [264 ; 265]. Ces sécrétions auraient probablement un rôle dans la régulation des quantités de calcium intracellulaire [266].

Des études antérieures ont précédemment fait état de l'induction, par divers facteurs stressants, de modifications physiomorphologiques des organes végétaux [267 ; 268 ; 269 ; 270].

Les mensurations des deux organes (feuilles et inflorescences) que nous avons relevées sont proches de celles rapportées par Oran *et al* (1999) dans une étude

biosystématique de *G. alypum* L. (longueur des feuilles : 5 à 20 mm ; diamètre des inflorescences : 10 mm) [30].

Les données statistiques recueillies, par ces mêmes auteurs, ne permettent, néanmoins, pas de réaliser une analyse comparative à effet de donner des indications sur un éventuel polymorphisme génétique et/ou sur l'état physiologique des pieds végétaux ayant fait l'objet de récoltes.

II. EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES

II.1. Résultats

Trois techniques d'extraction distinctes (décoction, extraction par soxhlet et hydrodistillation) ont été indépendamment appliquées sur les feuilles et inflorescences de *G. alypum* L., aboutissant à l'obtention de 06 extraits bruts aqueux, méthanoliques et étheriques ainsi que de 02 huiles essentielles.

Les rendements d'extraction obtenus ont été calculés à partir de la masse de la matière sèche initialement utilisée, nous conduisant ainsi à la détermination systématique des taux d'humidité des organes végétaux séchés ayant fait l'objet d'extraction.

Les résultats de ces deux paramètres (taux d'humidité et rendement) ainsi que ceux décrivant les caractéristiques visuelles des produits d'extraction, sont consignés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Résultats des rendements d'extractions et caractéristiques visuelles des extraits et huiles essentielles obtenus

Organe végétal	Taux d'humidité* (%)**	Produit d'extraction	Code	Rendement (m/m ; %) **	Caractéristiques visuelles
Feuilles	7,83 [7,79-7,87]	Extrait brut aqueux	EA.1	48,34 [46,77-49,91]	Granuleux, couleur ocre
		Extrait brut méthanolique	EM.1	52,01 [49,95-54,08]	Pâteux, couleur verdâtre
		Extrait brut étherique	EE.1	2,72 [2,33-3,11]	Pâteux, couleur vert-jaunâtre
		Huile essentielle	HE.1	0,023 [0,017-0,029]	Visqueuse, couleur jaune
Inflorescences	6,21 [6,09-6,33]	Extrait brut aqueux	EA.2	37,48 [35,53-39,43]	Poudreux, couleur rouge-pourpre
		Extrait brut méthanolique	EM.2	45,14 [43,76-46,53]	Pâteux, couleur brun-rougeâtre
		Extrait brut étherique	EE.2	1,34 [0,90-1,76]	Pâteux, couleur jaune-orangé
		Huile essentielle	HE.2	0,015 [0,013-0,018]	Visqueuse, couleur jaune-orangé

* Taux d'humidité du matériel végétal séché ; ** dispersion autour de la moyenne estimée par le calcul de l'intervalle de confiance (IC95).

Une variabilité des rendements est observable en fonction de la nature des extraits et de l'organe végétal utilisé ($p < 0,0001$).

Les meilleurs rendements enregistrés sont ceux relatifs aux deux extraits bruts méthanoliques ($p < 0,0001$). Les plus faibles étant ceux inhérents aux deux extraits étheriques et huiles essentielles.

De manière globale, les extractions réalisées à partir des feuilles ont abouti à des rendements supérieurs à ceux obtenus avec les inflorescences de la plante, à l'exception des huiles essentielles et des extraits étheriques dont la différence des rendements d'extraction s'est révélée non probante ($p > 0,05$).

Les rendements sont de la sorte agencés selon un ordre d'importance décroissant : EM1 > EA1 > EM2 > EA2 > EE1 ~ EE2 / EE2 ~ HE1 ~ HE2 (~ : différence non significative).

II.2. Discussion

Considérant la grande diversité chimique des composés bioactifs issus des substances végétales, l'extraction des différents métabolites requière le plus souvent des techniques, solvants et conditions d'extraction variés [271].

Dans notre travail expérimental, nous avons opté pour l'exécution de trois techniques d'extraction conventionnelles différentes, sélectionnées en fonction de la nature des métabolites ciblés et celle des solvants utilisés à cet effet.

Un nombre total de 06 extraits bruts (aqueux, méthanoliques et étheriques) et 02 huiles essentielles ont, ainsi, été obtenus à partir des feuilles et des inflorescences de *Globularia alypum* L. Les rendements de ces extractions ont été déterminés en prenant en considération la teneur en humidité résiduelle des organes séchés utilisés ; celle-ci est significativement inférieure à 10% ($p < 0,0001$) pour les feuilles et inflorescences de la plante étudiée (7,83% et 6,21%, respectivement), respectant ainsi les conditions de conservation préconisées [235].

Des résultats de même ordre que les notre ont précédemment été révélés par Chevolleau *et al.* (1992) [80], Taleb-Dida *et al.* (2011) [83] et Harzallah *et al.* (2010) [79] concernant, respectivement, les extraits méthanolique (47,8% ; lieu de récolte non précisé), aqueux (40% ; feuilles récoltées dans la région de Béjaia-Algérie) et étherique (2,9% ; feuilles récoltées dans la région de Wislatiya-Tunisie). En revanche, les rendements publiés par Djellouli *et al.* (2014) [272], pour ce qui est de l'extrait méthanolique (30% ; feuilles récoltées dans la région de Béjaia-Algérie), et par Khlifi *et al.* (2011) [81], au sujet de l'extrait étherique (15.6% ; feuilles récoltées dans la région de Sidi Bouzid- Tunisie), seraient, à priori, sensiblement différents des notres.

Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de l'hétérogénéité des résultats observés, comprenant les différences retrouvées dans les procédures et conditions opératoires (broyage de l'organe végétal, ratio matériel végétal/solvant adopté, températures et durée d'extraction) ainsi que les facteurs biotiques et abiotiques affectant la physiologie du végétal [273 ; 274 ; 275].

S'agissant du faible rendement de l'hydrodistillation obtenu à l'extraction de l'huile essentielle des feuilles (0,023%), celui-ci serait en accord avec les résultats

rapportés par Ramdani *et al.* (2014) (rendements <0,1% ; feuilles récoltées dans la région de Khanchla-Algérie) [49].

Dans la limite des quantités disponibles, la contrainte liée à la faible teneur des organes végétaux en huile essentielle (rendements inférieurs à 0,03%) a été compensée par la réalisation de nombreuses hydrodistillations successives en suivant des conditions opératoires strictement identiques.

Aucune étude comparative portant sur les rendements d'extraction, obtenus respectivement à partir des feuilles et des inflorescences de *G. alypum* L., n'a été retrouvée à l'issue de notre investigation bibliographique.

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

III.1. Résultats du criblage phytochimique préliminaire

Le tableau 2.3 regroupe l'ensemble des résultats du criblage phytochimiques mené sur les extraits bruts des deux organes végétaux étudiés.

La réaction des extraits aux différents tests qualitatifs nous suggèrent la présence des composés réducteurs et des flavonoïdes dans l'ensemble des extraits bruts testés. Des résultats positifs à la recherche des tannins ont également été observés à l'issue des tests menés sur les extraits aqueux et méthanolique des feuilles et ceux des inflorescences ; ce qui indiquerait la présence de ce groupe de métabolites dans la composition de ces extraits.

En revanche, aucune réaction positive à la mise en évidence des alcaloïdes n'a été observée à l'utilisation des deux réactifs de Dragendorff et de Hager.

S'agissant des glycosides cardiotoniques, ces derniers seraient contenus dans les seuls extraits aqueux, tandis que la présence potentielle des saponosides concernerait les extraits aqueux et méthanoliques.

Les résultats positifs au test de mise en évidence des mucilages n'ont, quant eux, pu être révélés que pour les extraits aqueux.

Tableau 2.3 : Résultats du criblage phytochimique préliminaire

Métabolites recherchés	Tests appliqués	Extraits	Résultats *
Composés réducteurs	Test à la solution de Fehling	EA.1	+
		EA.2	+
		EM.1	+
		EM.2	+
		EE.1	+
		EE.2	+
Tannins	Test au trichlorure de fer	EA.1	+
		EA.2	+
		EM.1	+
		EM.2	+
		EE.1	-
		EE.2	-
Flavonoïdes	Test de Shinoda	EA.1	+
		EA.2	+
		EM.1	+
		EM.2	+
		EE.1	+
		EE.2	+
	Test à l'hydroxyde de sodium	EA.1	+
		EA.2	+
		EM.1	+
		EM.2	+
		EE.1	+
		EE.2	+
Alcaloïdes	Test au réactif de Dragendorff	EA.1	-
		EA.2	-
		EM.1	-
		EM.2	-
		EE.1	-
		EE.2	-
	Test au réactif de Hager	EA.1	-
		EA.2	-
		EM.1	-
		EM.2	-
		EE.1	-
		EE.2	-
Glycosides	Test de Keller-Killiani	EA.1	+

cardiotoniques		EA.2	+
		EM.1	-
		EM.2	-
		EE.1	-
		EE.2	-
Saponosides	Test de formation de la mousse par agitation	EA.1	+
		EA.2	+
		EM.1	+
		EM.2	+
		EE.1	/
		EE.2	/
Mucilages	Test de précipitation à l'alcool absolu	EA.1	+
		EA.2	+
		EM.1	-
		EM.2	-
		EE.1	/
		EE.2	/

* (+) : résultat positif. (-) : résultat négatif.

III.2. Résultats de la détermination de la teneur des extraits bruts en composés phénoliques totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts aqueux, méthanoliques et étheriques a été déterminée graphiquement par extrapolation des absorbances y afférentes sur la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Celle-ci est présentée dans figure 3.2.

La relation entre les deux variables, absorbance et concentration de l'acide gallique, est linéaire et proportionnelle ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,9997$; $r = 0,9999$). L'ordonnée à l'origine étant proche de la valeur nulle (0,065). La gamme de concentrations utilisée est, par conséquent, conforme au domaine de validité de la loi de Beer-Lambert.

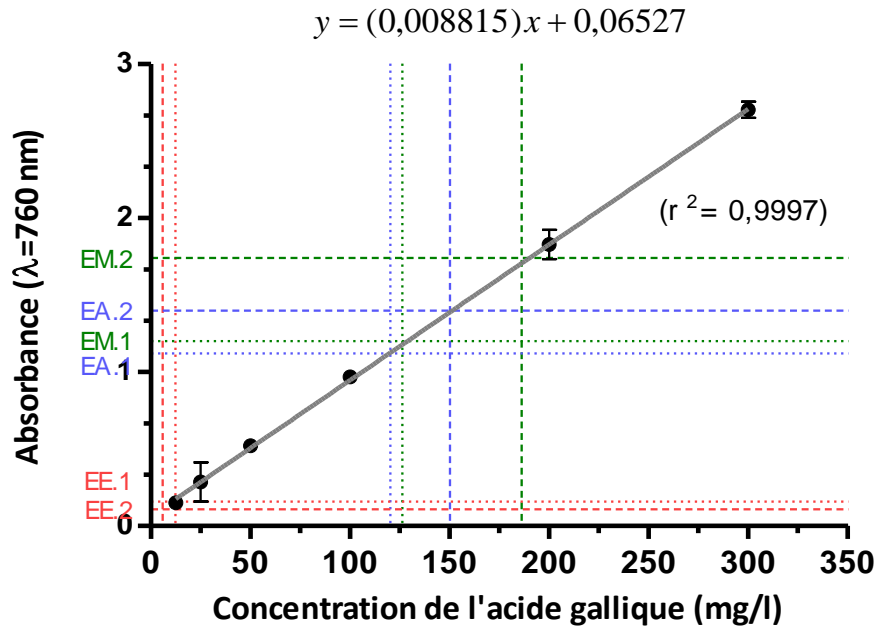
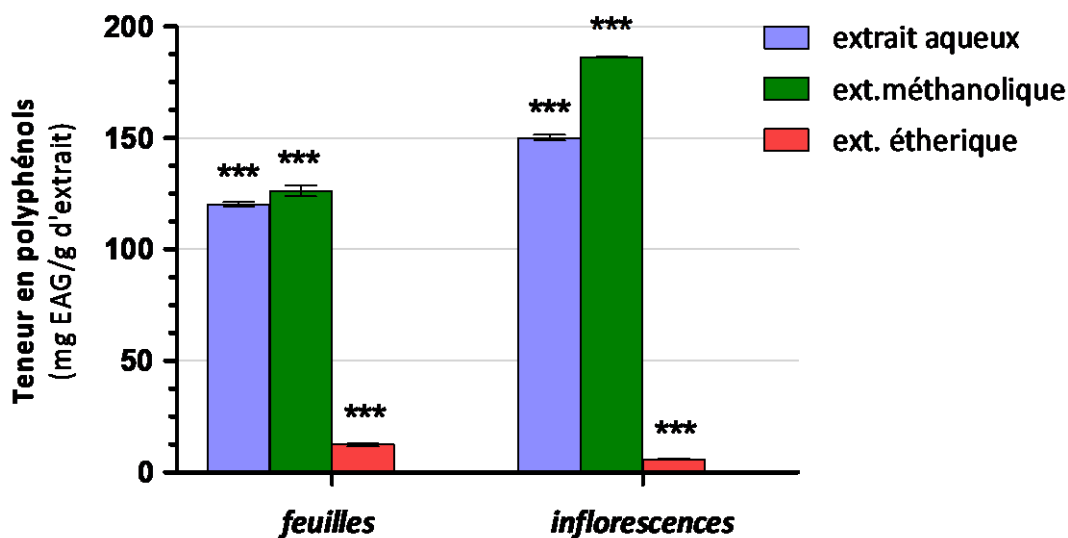


Figure 3.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats obtenus varient, en fonction des extraits, dans un intervalle allant de $5,85 \pm 0,22$ (IC95) à $186,21 \pm 0,22$ mg équivalent acide gallique (EAG)/g d'extrait ($p < 0,0001$). Ces deux valeurs correspondent, respectivement, à celles de l'extrait étherique des inflorescences et à l'extrait méthanolique du même organe végétal (dont la teneur en composés phénoliques totaux serait la plus élevée). La figure 3.3 illustre l'ensemble des valeurs relevées à l'issue du dosage.

A la comparaison des résultats opérée deux à deux pour les extraits de même nature, la teneur en polyphénols des inflorescences serait plus importante que celles déterminées pour les feuilles en ce qui concerne les extraits aqueux ($p < 0,0001$) et méthanoliques ($p < 0,0001$). S'agissant des extraits étheriques, cette teneur serait à l'inverse plus élevée pour les feuilles que pour les inflorescences de la plante ($p = 0,0002$).

La hiérarchisation des extraits par ordre croissant en quantité de composés phénoliques serait donc ainsi établi : $EM.2 > EA.2 > EM.1 > EA.1 > EE.1 > EE.2$.



Extrait	feuilles	inflorescences
<i>Ext. aqueux</i>	120,3 (± 1)	150,14 (± 1,20)
<i>Ext. méthanolique</i>	126,32 (± 2,45)	186,21 (± 0,22)
<i>Ext. étherique</i>	12,37 (± 0,78)	5,85 (± 0,22)

Figure 3.3 : Histogramme de la teneur en polyphénols des extraits bruts ([mg EAG/g d'extrait] ± IC95). (*) : résultat significativement différent de la valeur nulle, (**) : différence très significative, (***) : différence hautement significative

III.3. Résultats des analyses chromatographiques

L'étude de la composition chimique de la matière végétale par l'application de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a été conduite sur l'huile essentielle des feuilles et celle des inflorescences de *Globularia alypum* L. ainsi que sur leur extrait étherique respectif.

Le choix porté sur l'analyse de ces quatre produits d'extraction a été influencé par l'originalité des résultats obtenus lors de l'étude des activités biologiques de la plante ainsi que par les limites de la technique et de l'équipement utilisés.

III.3.1. Analyse des huiles essentielles

L'interprétation des spectres de masse a été confortée, lors de l'analyse des huiles essentielles, par la détermination des indices de Kovats (IK) des molécules détectées. Ces derniers ont été comparés avec ceux publiés par Adams (Adams, 1995 ; Adams, 2007) et par NIST (*National Institute of Standards and Technology*,

USA) [244 ; 245 ; 246]. L'identification des composés en résultant est consignée dans les tableaux 2.4 et 2.5.

Le pourcentage représentant la quantité relative d'un composé (tableaux 2.4 et 2.5) est déduit de la proportion de l'aire de son pic chromatographique par rapport à l'aire de l'ensemble des pics formés au terme de l'acquisition des données. Les chromatogrammes engendrés sont illustrés dans les figures 3.4 et 3.5.

Un nombre total de 37 sur 65 molécules détectées et 23 sur 37 autres ont respectivement été identifiées dans l'huile essentielle des feuilles (tableau 2.4) et celle des inflorescences (tableau 2.5). En terme quantitatif, cette identification concerne, dans le même ordre, près de 74,4 % et 80 % de la composition chimique des deux huiles essentielles.

Parmi les familles de composés constituant l'huile essentielle des feuilles, dont les proportions relatives sont illustrées dans la figure 3.6, les acides gras en sont majoritairement présents avec un taux de 47,8 % ; les deux acides palmitique (24,54 %) et linoléique (11,72 %) y prédominent.

Les composés terpéniques constituent le deuxième groupe quantitativement le plus important de l'huile essentielle. Ce groupe diversifié est présent à 16,2 % et inclut, par ordre d'importance décroissant, la famille des alcools terpéniques (α -Terpinéol, Linalool, Phytol, Isophytol), des cétones terpéniques (β -Damascenone, Geranyl acetone, Hexahydrofarnesyl acetone, Farnesyl acetone), des norisoprénoides (β -Ionone, β -Damascone), des monoterpènes (Naphthalène, α -Pinène, Limonène), des sesquiterpènes (α -Calacorene) et des aldéhydes terpéniques (β -Cyclocitral).

Des composés appartenant à la famille des monophénols (eugénol, 2-Methoxy-4-vinylphenol) sont également présents avec un taux appréciable de 2,68 %.

D'autres familles moléculaires ont, de même, été détectées ; il s'agit des alcools aliphatiques non-terpéniques (1-Octène-3-ol, 3-Octanol) dont la quantité relative est de 2,16 %, des alcanes avec un taux de 1,3%, des cétones aromatiques (Acétophénone), des alcènes (Octadécène, Dococène), des esters (Z -3-Hexenyl benzoate) et des aldéhydes aromatiques (Benzaldehyde) et non-

aromatiques (<E,E>-2,4-Decadienal, <E>-2-Decenal, <E,E>-2,4-Heptadienal). Les cinq dernières familles citées ont toutes des taux cumulatifs inférieurs à 1%.

Tableau 2.4 : Identification des composés constituant l'huile essentielle des feuilles

N°	Tr (min)	IK	Dénomination du composé *	Formule brute	Quantité relative (%)
1	5,60	926	α -Pinène	C ₁₀ H ₁₆	0,01
2	6,67	952	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	0,01
3	7,69	975	1-Octene-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	2,14
4	8,71	998	3-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	0,02
5	9,39	1009	(E,E)-2,4-Heptadienal	C ₇ H ₁₀ O	0,01
6	10,36	1024	Limonène	C ₁₀ H ₁₆	0,02
7	12,70	1061	Acétophenone	C ₈ H ₈ O	0,62
8	15,26	1100	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	2,31
9	20,22	1172	Naphtalène	C ₁₀ H ₈	0,55
10	21,29	1188	α-Terpinéol	C ₁₀ H ₁₈ O	2,80
11	23,68	1215	β -Cyclocitral	C ₁₀ H ₁₆ O	0,19
12	26,24	1261	(E)-2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	0,18
13	29,52	1309	2-Methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	0,29
14	29,81	1314	(E,E)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	0,25
15	32,45	1355	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	2,39
16	34,12	1381	(E)-β-Damascenone	C ₁₃ H ₁₈ O	4,43
17	35,36	1400	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	0,07
18	35,90	1409	β -Damascone	C ₁₃ H ₂₀ O	0,50
19	38,58	1453	Geranyl acetone	C ₁₃ H ₂₂ O	1,16
20	40,30	1481	β -Ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	0,62
21	41,42	1499	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	0,22
22	43,41	1533	α -Calacorene	C ₁₅ H ₂₀	0,35
23	45,26	1565	(Z)-3-Hexenyl benzoate	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	0,9
24	45,97	1577	Acide laurique	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	3,58
25	47,24	1599	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	0,33

26	57,15	1785	Acide myristique	$C_{14}H_{28}O_2$	7,94
27	57,53	1793	Octadecène	$C_{18}H_{36}$	0,23
28	57,90	1800	Octadecane	$C_{18}H_{38}$	0,19
29	60,13	1844	Hexahydrofarnesyl acetone	$C_{18}H_{36}O$	0,63
30	63,61	1915	Farnesyl acetone	$C_{18}H_{30}O$	0,50
31	65,16	1948	Isophytol	$C_{20}H_{40}O$	0,49
32	67,28	1993	Acide palmitique	$C_{16}H_{32}O_2$	24,54
33	72,16	2100	Heneicosane	$C_{21}H_{44}$	0,47
34	73,36	2128	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	2,02
35	74,49	2154	Acide linoléique	$C_{18}H_{32}O_2$	11,72
36	76,25	2194	1-Dococène	$C_{22}H_{44}$	0,31
37	76,52	2201	Docosane	$C_{22}H_{46}$	0,21

* Les molécules dont la quantité relative est $\geq 1\%$ sont inscrites en caractère gras.

S'agissant de l'huile essentielle des inflorescences, celle-ci comporte également une proportion dominante en acides gras de 56,65 % (acides palmitique, linoléique, myristique et laurique), telle que représentée dans la figure 3.6.

Les alcanes et les composés terpéniques y sont présents avec des taux respectifs de 9,43 % et 9,34 %. Ce dernier groupe de composés est représenté dans l'huile essentielle par des alcools terpéniques (α -Terpinéol, Linalool, $\langle E \rangle$ -Nerolidol), des cétones terpéniques (Hexahydrofarnesyl acetone, $\langle E \rangle$ - β -Damascenone) et des sesquiterpènes (epi- β -Santalène, β -Santalène).

L'huile essentielle renferme aussi des esters ($\langle Z \rangle$ -3-Hexenyl benzoate, Benzyl benzoate, Diisobutyl phtalate, Dibutyl phtalate) présents avec un taux de 3,67 %, des monophénols à 1,09 % (Thymol, Eugénol) et enfin un alcool aliphatique non terpénique (1-Octene-3-ol) avec un faible taux de 0,1%.

Tableau 2.5 : Identification des composés constituant l'huile essentielle des inflorescences

N°	Tr (min)	IK	Dénomination du composé	Formule brute	Quantité relative (%)
1	7,60	972	1-Octene-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	0,10
2	15,20	1099	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0,91
3	21,20	1186	α-Terpinéol	C ₁₀ H ₁₈ O	3,62
4	28,79	1289	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	0,54
5	32,39	1354	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0,55
6	34,03	1379	(E)-β-Damascenone	C ₁₃ H ₁₈ O	0,32
7	38,62	1454	epi-β-Santalène	C ₁₅ H ₂₄	0,50
8	39,67	1471	β-Santalène	C ₁₅ H ₂₄	0,30
9	45,05	1562	(E)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,21
10	45,24	1565	(Z)-3-Hexenyl benzoate	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	0,23
11	45,55	1570	Acide laurique	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1,16
12	55,52	1754	Benzyl Benzoate	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	0,64
13	56,26	1768	Acide myristique	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	2,30
14	60,11	1844	Hexahydrofarnesyl acetone	C ₁₈ H ₃₆ O	3,48
15	61,08	1864	Diisobutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1,19
16	62,86	1900	Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	0,43
17	65,05	1946	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1,61
18	66,33	1973	Acide palmitique	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	48,14
19	72,14	2100	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	2,73
20	73,90	2141	Acide linoléique	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	5,05
21	80,67	2300	Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	1,60
22	88,54	2500	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₆	1,95
23	95,86	2700	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	2,72

Des différences, d'ordre qualitatif et quantitatif, sont observables à l'analyse comparative de la composition chimique des deux huiles essentielles (figure 3.6). Celle extraite des feuilles serait chimiquement plus diversifiée (65 molécules détectés contre 37 appartenant à l'huile essentielle des inflorescences).

Dans la limite des molécules ayant pu être identifiées (23 sur 37 molécules détectées ; soit près des deux tiers), l'absence de la famille des composés aldéhydes, des monoterpènes (sans fonction alcoolique), des norisoprénoïdes et celle des alcènes dans l'huile essentielle des inflorescences illustre cette différence qualitative. Le geranyl acetone, l'acétophenone, le farnesyl acetone, le phytol, l'isophytol, l' α -calacorene et le 2-methoxy-4-vinylphenol seraient également absents ou présents en traces non détectables. De plus, cette huile essentielle posséderait, à la différence de celle des feuilles, le dibutyl phtalate, le diisobutyl phtalate, le benzyl benzoate, le thymol, l'epi- β -santalène, le santalène et le nerolidol.

Du point de vue quantitatif, les disparités les plus remarquables sont celles qui concernent notamment les taux proportionnels du (E)- β -Damascenone, de l'hexahydrofarnesyl acetone, de 1-Octene-3-ol, de l'eugénol, des acides palmitique et linoléique ainsi que celle des alcanes.

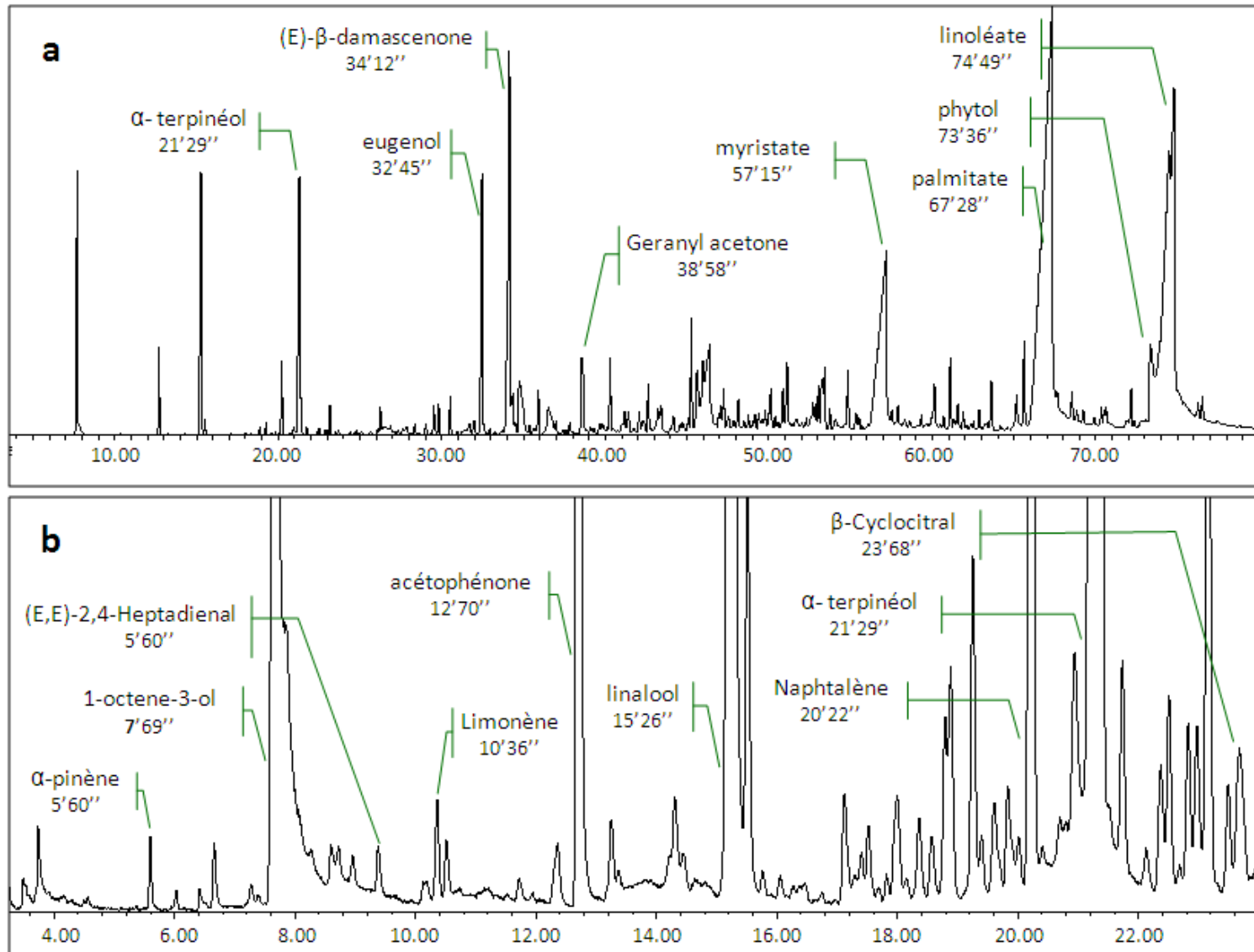


Figure 3.4 : Chromatogramme produit à l'analyse de l'huile essentielle des feuilles
 a : l'ensemble du chromatogramme, b : agrandissement de la 4 à la 24^{ème} minute

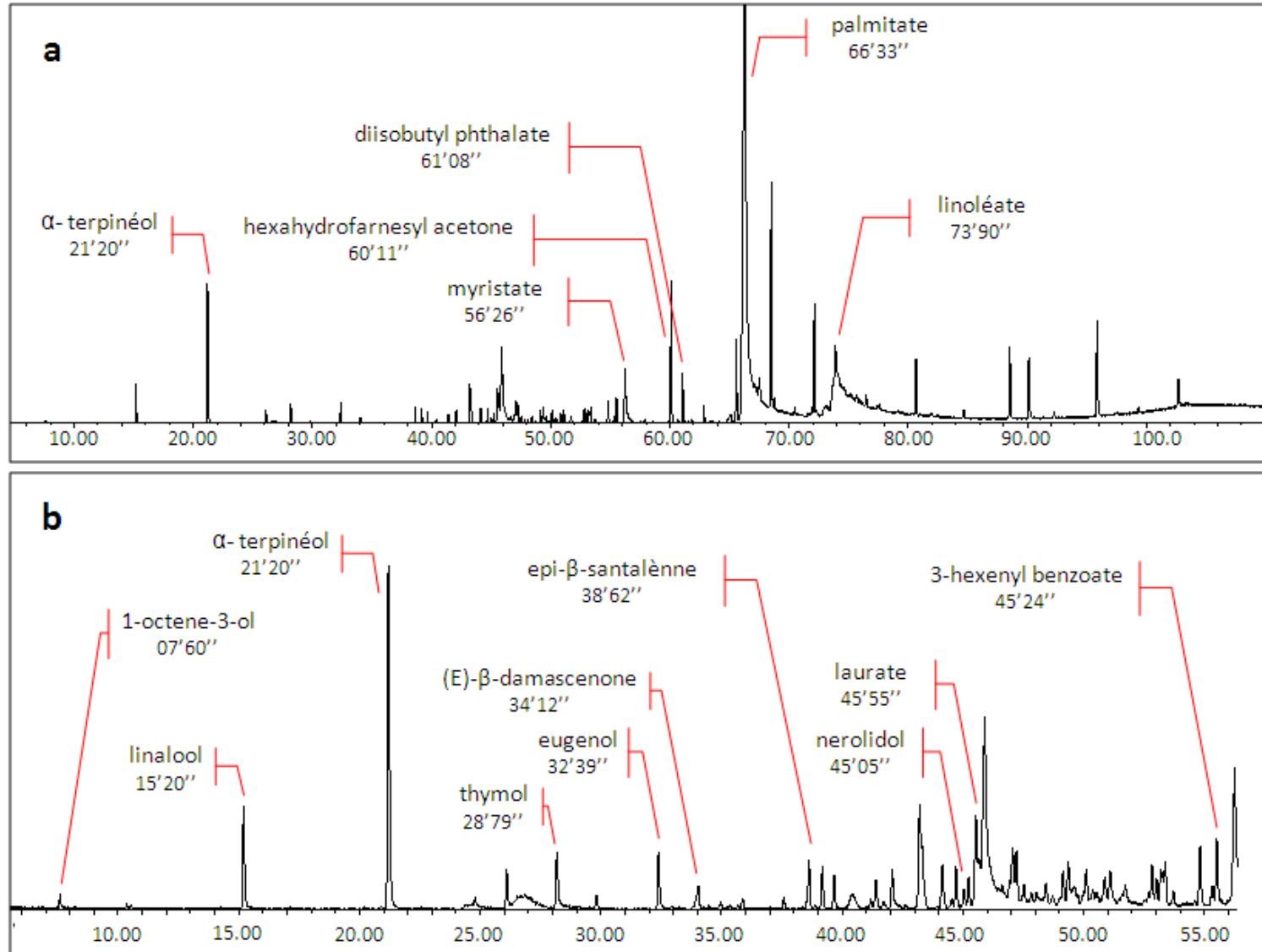


Figure 3.5 : Chromatogramme produit à l'analyse de l'huile essentielle des inflorescences

a : l'ensemble du chromatogramme, b : agrandissement de la 5 à la 55^{ème} minute

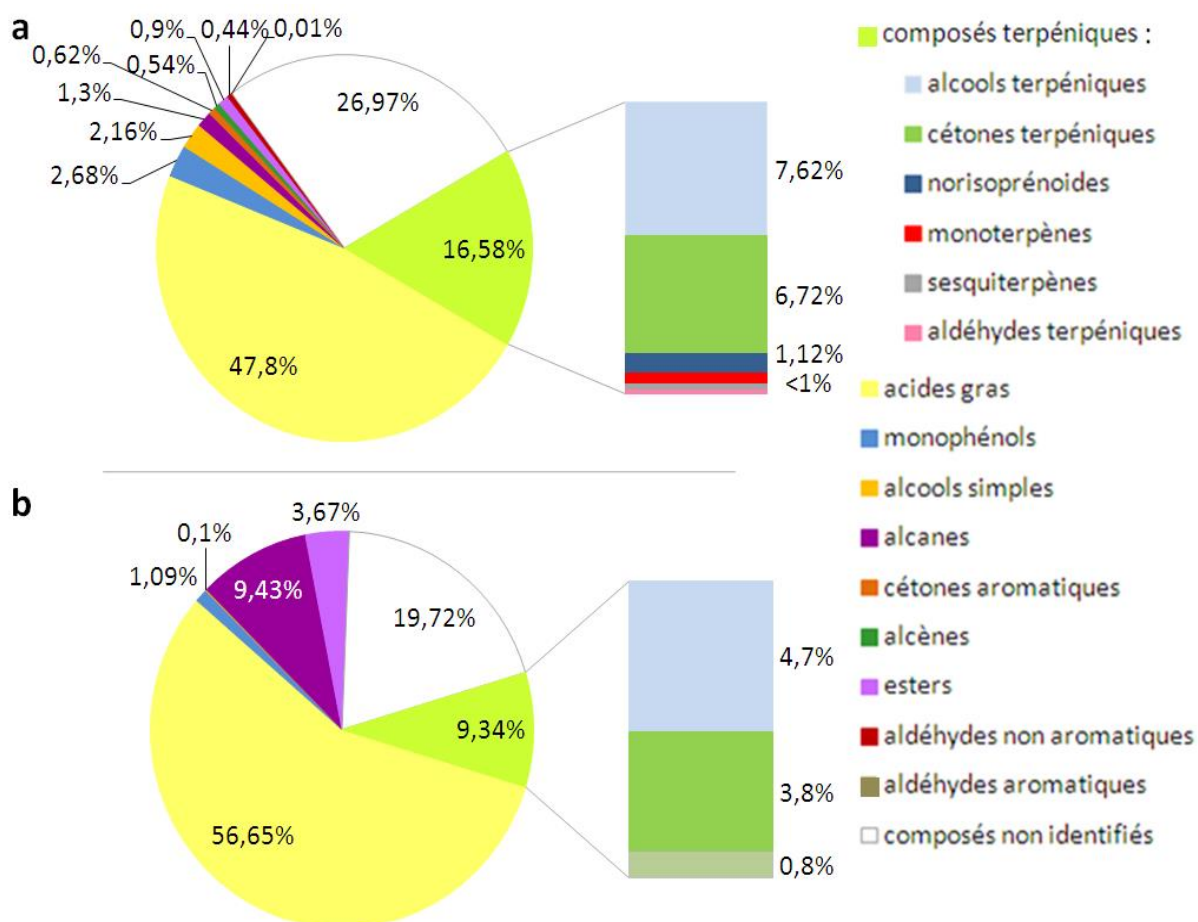


Figure 3.6 : Représentation en secteurs et barres des groupes chimiques constituant les huiles essentielles. a : composition de l'huile essentielle des feuilles, b : composition de l'huile essentielle des inflorescences

III.3.2. Analyse des extraits étheriques

L'analyse, par CG-SM, des constituants des extraits étheriques des feuilles et des inflorescences de *Gloularia alypum* L. a été rendue possible grâce au protocole d'estérification exécuté en amont de l'injection chromatographique.

Les composés identifiés à travers cette analyse sont rapportés dans les tableaux 2.6 et 2.7. Les chromatogrammes sont, quant à eux, illustrés dans les figures 3.7 et 3.8.

Seules les molécules ayant révélé un taux de concordance spectrale (qualité du spectre de masse) supérieur ou égal à 80 % ont été prises en considération dans l'étape d'identification.

Tableau 2.6 : Identification des composés constituant l'extrait étherique des feuilles

N°	Tr (min)	IK	Dénomination du composé	Qualité (%)	Quantité relative (%)
1	18,04	1725	Ester méthylique de l'acide myristique	94	3,42
2	20,10	1919	Ester méthylique de l'acide palmitique	98	13,42
3	22,16	2089	Ester méthylique de l'acide 9,12-octadecadiénoïque (ester méthylique de l'acide linoléique)	99	13,26
4	22,27	2097	Ester méthylique de l'acide (Z,Z,Z) 9,12,15-octadécatriénoïque (ester méthylique de l'acide linoléique)	99	35,24
5	22,62	2118	Ester méthylique de l'acide stéarique	98	5,86
6	51,28	nd	α -tocophérol	81	2,59

Tableau 2.7 : Identification des composés constituant l'extrait étherique des inflorescences

N°	Tr (min)	IK	Dénomination du composé	Qualité (%)	Quantité relative (%)
1	18,07	1728	Ester méthylique de l'acide myristique	85	0,2
2	20,21	1929	Ester méthylique de l'acide palmitique	97	11,32
3	22,39	2105	Ester méthylique de l'acide 9,12-octadecadiénoïque	99	26,59
4	22,49	2110	Ester méthylique de l'acide (Z) 9-octadécénoïque (ester méthylique de l'acide oléique)	99	25,62
5	22,80	2129	Ester méthylique de l'acide stéarique	90	2,58
6	27,15	2329	Ester méthylique de l'acide arachidique	94	0,83

7	35,11	2537	Ester méthylique de l'acide béhénique	98	3,36
8	42,68	2738	Ester méthylique de l'acide lignocérique	97	4,52
9	47,65	nd	Ester méthylique de l'acide cérotique	95	0,77
10	54,75	nd	β -sitosterol	99	2,52

Un nombre de 06 composés, sur 12 détectés, ont été identifiés à l'analyse de l'extrait étherique des feuilles ; ce qui représente en terme quantitatif 73,8 % de la proportion détectée. Hormis l' α -tocophérol, l'ensemble des molécules identifiées seraient des esters méthyliques d'acides gras (ester méthylique de l'acide myristique, Ester méthylique de l'acide palmitique, Ester méthylique de l'acide 9,12-octadecadiénoïque, ester méthylique de l'acide (Z,Z,Z) 9,12,15-octadecatriénoïque, ester méthylique de l'acide stéarique).

L'analyse de l'extrait étherique estérifié des inflorescences a permis, quant à elle, de suggérer la présence de 09 acides gras différents (ester méthylique de l'acide myristique, ester méthylique de l'acide palmitique, ester méthylique de l'acide 9,12-octadecadiénoïque, ester méthylique de l'acide (Z) 9-octadécénoïque, ester méthylique de l'acide stéarique, ester méthylique de l'acide arachidique, ester méthylique de l'acide béhénique, ester méthylique de l'acide lignocérique, Ester méthylique de l'acide cérotique) constituant près de 75,8 % de la proportion globale des composés détectés, ainsi que la présence du phytostérol β -sitosterol à 2,52 % (structures chimiques présentées à l'annexe G).

Les acides myristique, palmitique, 9,12-octadecadiénoïque (linoléique) et stéarique seraient en commun présents dans la composition des deux organes végétaux.

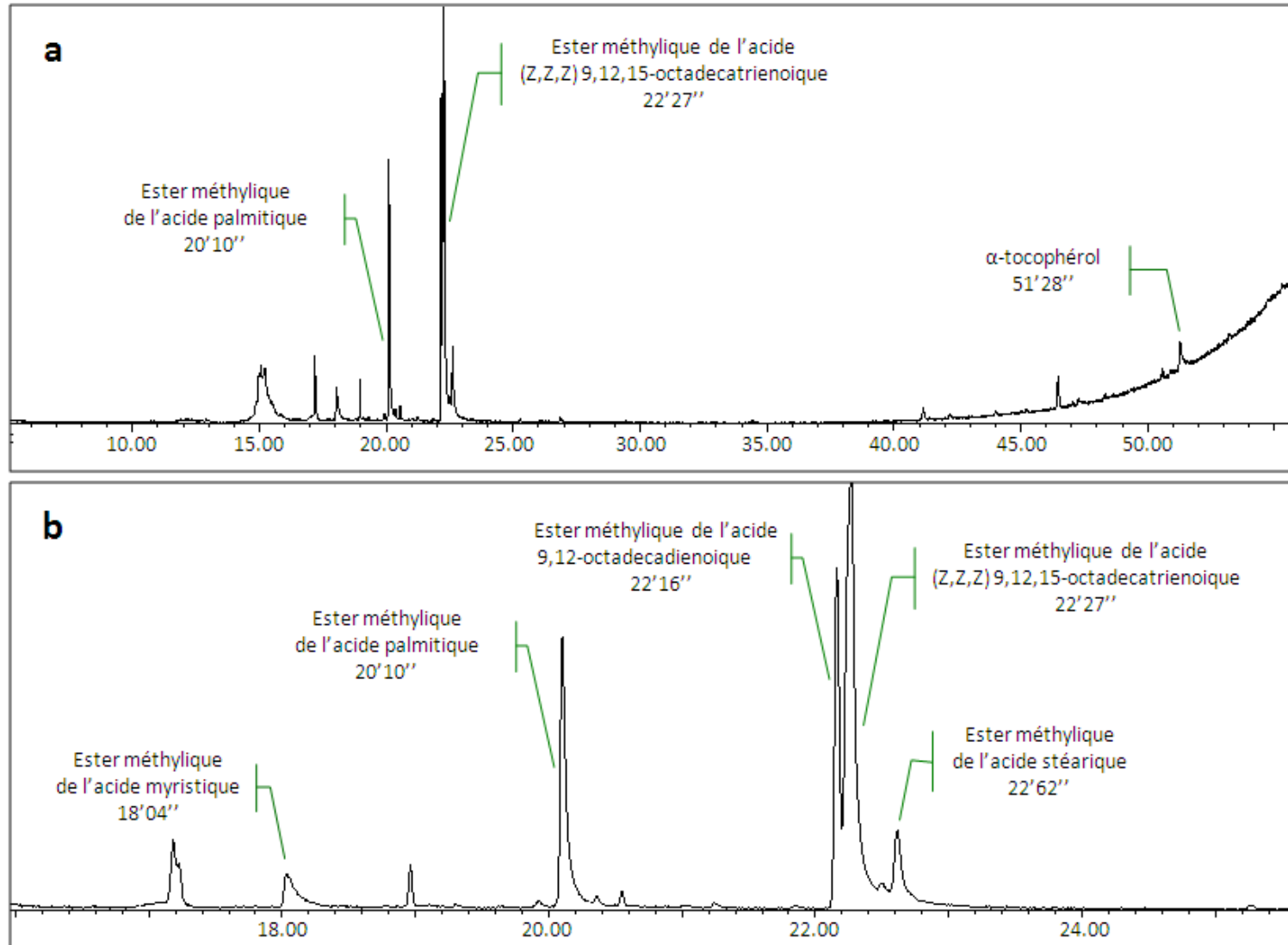


Figure 3.7 : Chromatogramme produit à l'analyse de l'extrait étherique des feuilles
a : l'ensemble du chromatogramme, b : agrandissement de la 16 à la 25^{ème} minute

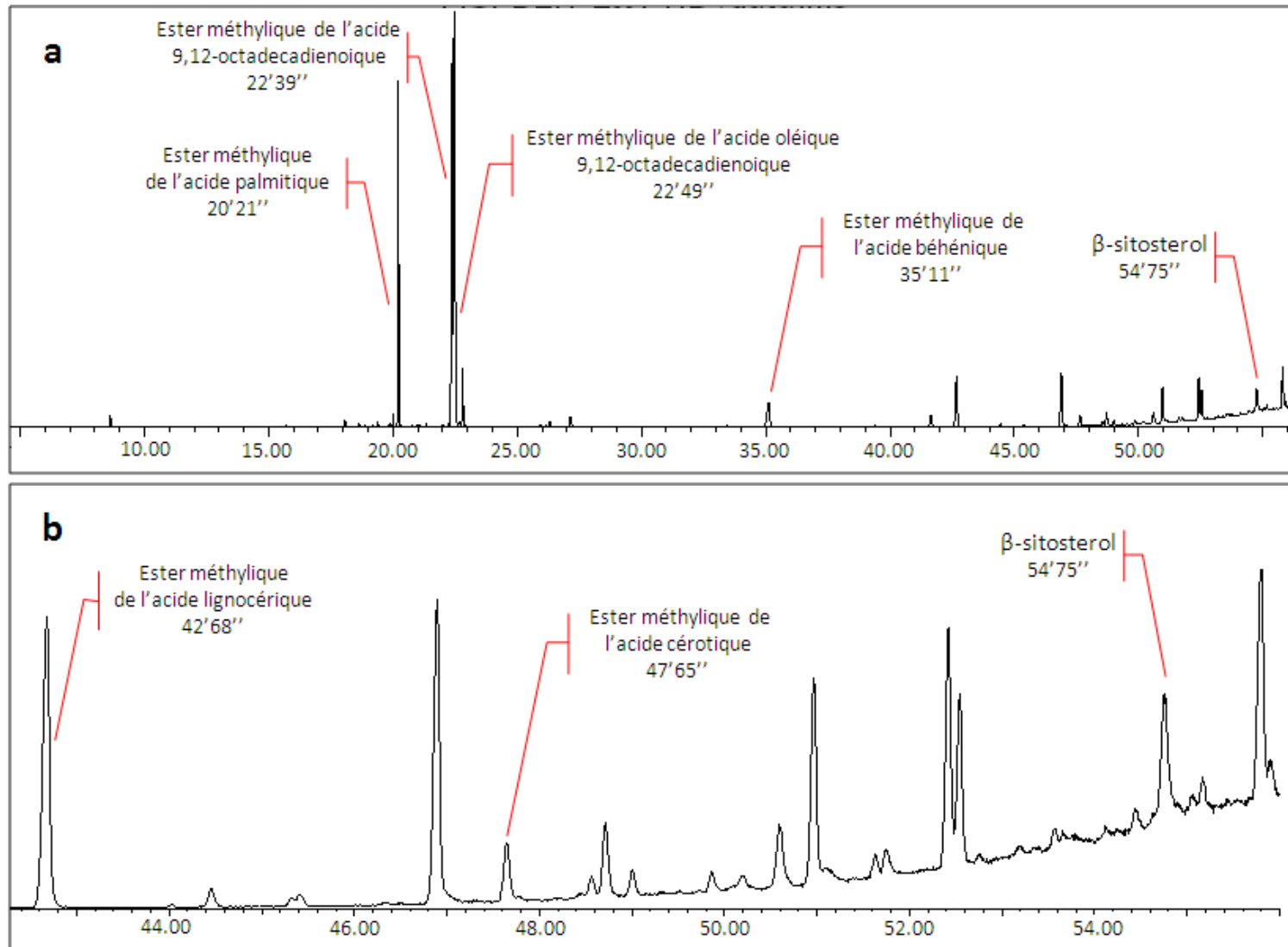


Figure 3.8 : Chromatogramme produit à l'analyse de l'extrait étherique des inflorescences

a : l'ensemble du chromatogramme, b : agrandissement de la 42 à la 56^{ème} minute

III.4. Discussion

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (à l'exemple des alcaloïdes, des terpènes et des composés phénoliques) qui sont très inégalement réparties chez les végétaux. Leur mise en évidence dans un extrait végétal fait souvent l'objet d'une étude préliminaire basé sur les résultats de réactions généralement chromogènes et/ou de précipitation spécifiques [276].

Le seuil minimal de détection des composés, l'observation de résultats faussement positifs et la solubilité différentielle des molécules appartenant à la même classe chimique représentent, à eux trois, les limites majeures de l'analyse phytochimique qualitative par l'application des tests standards. La simplicité de ces techniques s'avère, néanmoins, avantageuse lors de la formulation d'hypothèse sur la composition globale d'un matériel végétal donné [277 ; 278].

L'étude phytochimique préliminaire des extraits de *G. alypum* L. nous ont permis de révéler l'éventuelle présence de métabolites appartenant aux différents groupes recherchés. Des résultats positifs ont ainsi été observés à la mise en évidence des composés réducteurs, des tannins, des flavonoïdes, des glycosides cardiotoniques, des saponosides et des mucilages ; ce qui suggère leur présence aussi bien au niveau des feuilles qu'au niveau des inflorescences de la plante (la réaction des deux organes végétaux aux tests étant similaire pour les extraits de même nature).

L'absence de réaction positive aux tests révélant la présence des alcaloïdes dans les 06 extraits analysés est contraire aux résultats de l'analyse qualitative obtenus par Viladomat *et al.* (1986) [279]. Lors de notre investigation bibliographique, aucune étude phytochimique réalisée ultérieurement n'a pu confirmer l'identification des alcaloïdes dans les tissus végétaux des *Globularia* spp.

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par Harzallah *et al.* (2010) s'agissant des tests de mise en évidence des tannins et des flavonoïdes dans l'extrait aqueux, méthanolique et étherique des feuilles de *G. alypum* L. [79]. Djellouli *et al.* (2014) ont également conclu à la présence de ces deux groupes de composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des feuilles ainsi qu'à l'absence des alcaloïdes dans ce même extrait [272].

La présence des saponosides dans l'extrait aqueux des feuilles a précédemment été mentionnée dans les résultats des travaux de Meriah (2007) [280]. Ces travaux ont, par ailleurs, rapporté l'absence d'alcaloïdes dans l'extrait aqueux, éthanolique et étherique du même organe. La présence des glycosides cardiotoniques dans la plante a, quant à elle, déjà été signalée dans l'extrait aqueux de ses racines (Zerriouh, 2008) [281].

Dans la limite de la recherche bibliographique effectuée, l'analyse préliminaire de la composition chimique globale des inflorescences n'a fait l'objet d'aucun résultat publié à l'exception de la mise en évidence des tannins et des flavonoïdes dont la présence a été révélée lors des dosages antérieurement réalisés.

Suivant ces résultats préliminaires, la teneur des 06 extraits bruts en composés phénoliques a été estimée par l'application de la méthode de dosage spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. En dépit des paramètres de sensibilité et de reproductibilité très satisfaisants, cette méthode de référence présente néanmoins des limites quant à sa sélectivité [242 ; 282 ; 283]. Plusieurs travaux citent en exemple les acides aminés aromatiques, l'acide ascorbique (vitamine C), les ions inorganiques Fe(II) et les sucres réducteurs comme éléments pouvant éventuellement biaiser les résultats du dosage lorsque ces derniers sont présents à des concentrations relativement importantes dans l'échantillon à analyser [284 ; 285 ; 286].

En raison des faibles quantités en ion Fe(II) généralement contenues dans les extraits végétaux, l'interférence causée par ses ions s'avère souvent négligeable pour les dosages menés sur ce type d'échantillon. L'oxydation des sucres réducteurs par le réactif de Folin-Ciocalteu est, par ailleurs, très lente est nécessite de ce fait une élévation de la température pour améliorer la cinétique de cette réaction [242 ; 282 ; 287].

La méthode modifiée par Singleton et Rossi (1965) réduit la réactivité des sucres par l'exécution du dosage à température ambiante du laboratoire et empêche la survenue de biais liés à l'estérification des composés phénoliques causée par la nature alcaline du milieu réactionnel. Cette méthode limite également l'apparition probable des endiols réducteurs produits lors de la dégradation des sucres en milieu hautement basique [242 ; 282].

La quantité la plus élevée de composés phénoliques estimée par ce dosage est celle correspondant à l'extrait méthanolique des inflorescences ($186,21 \pm 0,22$ mg EAG/g d'extrait). Cette quantité est suivie, par ordre décroissant, de celle de l'extrait aqueux des inflorescences, de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles, de l'extrait étherique de ces derniers et celui des inflorescences (résultats obtenus pour des feuilles et inflorescences prélevées respectivement à des périodes de récoltes distinctes).

Les extraits végétaux contenant une quantité supérieure à 40 mg équivalent acide gallique (EAG)/g d'extrait sont considérés comme étant riches en composés phénoliques. A l'inverse, ceux qui en contiennent moins, leur teneur est qualifiée de modérée à faible (<10 mg EAG/g d'extrait) à l'instar des extraits étheriques des deux organes végétaux étudiés [288].

Les travaux de Khilifi, *et al.* (2011) ont abouti à des résultats proches des nôtres, marqués par un écart similaire de teneur en polyphénols totaux entre les deux extraits méthanolique et étherique des feuilles de la plante ($116,9 \pm 2,8$ mg EAG/ g d'extrait méthanolique contre $8,5 \pm 0,1$ mg EAG/ g d'extrait étherique des feuilles) [81]. La quantité en polyphénols totaux relativement faible des extraits étheriques est vraisemblablement due à la nature apolaire de l'éther de pétrole peu compatible à l'extraction de la majorité des composés appartenant à ce groupe chimique [289 ; 290 ; 291].

Par ailleurs, nos résultats suggèrent, pour les extraits à forte teneur en polyphénols totaux (aqueux et méthanoliques), une supériorité des quantités EAG/ g d'extrait d'inflorescences par comparaison à celles des feuilles.

Cette observation a également été rapportée par Amessis-Ouchemoukh *et al.* (2014) dont les résultats du dosage des extraits méthanoliques des feuilles ($102,3 \pm 0,5$ mg EAG/ g d'extrait) et des inflorescences de l'espèce ($157 \pm 1,1$ mg EAG/ g d'extrait) se rapprochent eux aussi des nôtres [69].

Les dosages précédemment menés sur les extraits aqueux des deux organes végétaux par Rached *et al.* (2010) ($112,01 \pm 6,2$ mg EAG/ g d'extrait aqueux de feuilles contre $103,7 \pm 7,9$ mg EAG/ g d'extrait aqueux d'inflorescences) [77], ainsi que ceux réalisés par Chograni *et al.* (2013) sur leurs extraits méthanoliques

respectifs ($22,3 \pm 1,2$ mg EAG/ g d'extrait méthanolique de feuilles contre $15,5 \pm 1,2$ mg EAG/ g d'extrait méthanolique d'inflorescences) [78], ne s'accordent cependant pas avec la suggestion d'une supériorité quantitative des inflorescences en composés phénoliques.

De plus, les résultats des dosages réalisés par Chograni *et al.* (2013) sont caractérisés par des teneurs faibles en composés phénoliques [78] ; de même ordre que ceux exprimés par Djeridane *et al.* (2006) concernant la partie aérienne de l'espèce [75]. Ben Mansour *et al.* (2012) en aurait estimé, quant à eux, des quantités à priori supérieures lors du dosage de l'extrait éthanolique des feuilles ($247,2 \pm 5,1$ mg EAG/ g d'extrait) [82].

L'hétérogénéité des conditions opératoires adoptées par les différents auteurs lors des procédures d'extraction et celle relatives au dosage serait, en partie, à l'origine de l'obtention de résultats variables voir contradictoires [285].

La divergence des résultats peut également être expliquée par l'influence des facteurs écologiques biotiques (interactions symbiotiques et antagonistes) et abiotiques (pollutions, photopériodisme et conditions édaphiques, météorologiques et topographiques) différemment exercée sur la plante [292 ; 293 ; 294 ; 295 ; 296], des facteurs génétiques, ainsi que ceux liés à l'ontogénie de l'organe étudié [274 ; 297].

En dernière étape de notre analyse phytochimique, l'application de la CG-SM a concerné l'étude de la composition des huiles essentielles et celles des extraits étheriques de notre matériel végétal (feuilles et inflorescences).

L'analyse de l'huile essentielle des feuilles a révélé la présence de 37 molécules identifiées comprenant des composés terpéniques (16,2%), des monophénols (2,68%), des alcools simples (2,16%), des alcanes (1,3%), des cétones, des aldéhydes, des esters (proportions <1%) ainsi que des acides gras majoritairement présents (47,8%).

En concordance avec nos résultats, l'analyse chromatographique de deux huiles essentielles des feuilles de *G. alypum* L., récoltées en mois d'avril et en deux régions distinctes (Boutaleb et Khenchela, Algérie), ont permis à Ramdani *et al.* (2014) de mettre en évidence la prédominance de l'acide palmitique dans la

composition chimique de ces dernières (huiles essentielles) ainsi que la présence de plusieurs composés de même identifiés à l'issue de notre analyse : 1-octène-3-ol, linalool, α -terpinéol, 2-Methoxy-4-vinylphenol, eugénol, (E)- β -damascenone, geranyl acetone, β -ionone, (Z)-3-Hexenyl benzoate, myristate, isophytol, docosane [49]. L' α -terpinéol et l'eugénol ont, par ailleurs, été retrouvés dans la composition de l'hydrolat des feuilles analysée par Barhouchi et al. (2014) [53]. La proportion relative de chacune de ces molécules est néanmoins variable en fonction de la provenance géographique des feuilles. La fluctuation la plus remarquable est celle du 1-octène-3-ol dont la proportion relative passe respectivement de 10,32%, à 0,82% dans les régions semi-arides de Boutaleb et Khenchela et à 2,14% dans la région sub-humide de Hammam-Righa (étages bioclimatiques estimés à partir de quotient d'Emberger) [49 ; 298 ; 299 ; 300].

D'autres molécules encore ne sont pas uniformément présentes dans la composition de ces huiles essentielles. L' α -pinène, le benzylaldehyde, le 3-octanol, le 2-4-heptadienal, le limonène, l'acétophénone, le naphthalène, le β -cyclocitral, le β -damascone, l' α -calacorène, l'acide laurique, le farnesyl acetone, le phytol et l'acide linoléique, dont la présence a été révélée par notre étude, sont cependant absents parmi les composés identifiés par Ramdani *et al.* (2014) [49]. A l'inverse, le camphène, le camphor, le geraniol, le cis-3-hexenyl tiglate, le β -fanesene, le nérolidol, l'épizonarène, le zerumbone, et le germacrene-B ne seraient pas présents dans la composition de notre huile essentielle, sous réserve des limites de détection. Toutefois, les indices de Kovats respectifs de l'épizonarène, du zerumbone et celui du germacrene-B, tels que mentionné dans les résultats de ces mêmes auteurs ne semblent pas correspondre à ceux publiés dans la littérature pour le même type de colonnes chromatographiques [244 ; 245 ; 246 ; 301 ; 302]. L'identification de ces molécules pourrait de ce fait être incertaine.

L'étude comparative réalisée par Crkvencic et al, 2016 [303] sur la composition chimique de 03 huiles essentielles, appartenant respectivement à *Globularia cordifolia*, *G. meridionalis* et à *G. punctata*, a révélée chez ces trois espèces européennes la présence du 1-octène-3-ol, du linalool, de l' α -terpineol, du 2-Methoxy-4-vinylphenol, du (E)- β -damascenone, du β -ionone, de l'hexahydrofarnesyl acétone, du farnesyl acetone, de l'isophytol et de l'acide

palmitique, tous retrouvés dans la composition de notre huile essentielle extraite des feuilles de *G. alypum* L. (région de Hammam-Righa). Le geranyl acetone et l'eugénol ont, quant à eux, été identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *G. meridionalis*, *G. punctata* et *G. alypum* (régions de Hammam-Righa, Boutaleb et Khenchela). Le 3-octanol dans celles des espèces *Globularia cordifolia*, *G. meridionalis* et *G. alypum* L. (Hammam-Righa). Tandis que l'identification du benzylaldehyde et le 2-4-heptadienal est rattachée aux huiles essentielles des espèces *Globularia cordifolia*, *G. punctata* et *G. alypum* (Hammam-Righa).

Additivement à la variable bioclimatique, les mêmes facteurs précédemment évoqués (au sujet du dosage des composées phénoliques) sont aussi susceptibles de moduler l'anabolisme des métabolites secondaires volatiles [274].

Les différences de composition recensées seront d'un apport utile en vue d'une éventuelle reconnaissance de marqueurs chimiotaxonomiques pour le genre *Globularia* [303 ; 304].

L'huile essentielle des inflorescences inclut dans sa composition des acides gras (56,65 %), des alcanes (9,43 %), des composés terpéniques (9,34 %), des esters (3,67 %), des monophénols (1,09 %) et des alcools simples (0,1%).

Dans une étude antérieure, Farré-Armengol *et al.* (2015) ont analysé la nature chimique des composés terpéniques volatiles constituant, en partie, les émissions naturelles des inflorescences de la plante [305]. L'analyse en question a mis en évidence la présence de 04 composés absents de la composition de l'huile essentielle de nos inflorescences. Ces composés ont été identifiés au camphène et au 3-carène ainsi qu'à l' α -pinène et au limonène qui, tout deux, ont été retrouvés parmi les constituants de l'huile essentielle des feuilles analysée dans notre étude.

La composition de l'huile essentielle des inflorescences présente également des dissimilitudes, tant qualitatives que quantitatives, par comparaison à celle extraite des feuilles. Parmi les 23 molécules identifiées, 09 ne l'ont pas été à l'analyse de l'huile essentielle des feuilles : le thymol, l'epi- β -Santalène, le β -Santalène, le (E)-nerolidol, le diisobutyl phthalate, le dibutyl phthalate, le tricosane, le pentacosane

et l'heptacosane. Le (E)-nerolidol aurait, cependant, été détecté dans les huiles essentielles des feuilles par Ramdani *et al.* (2014) [49].

Dans une certaine mesure, la diversité des fonctions biologiques propres à chaque organe végétal aurait un lien direct avec les différences observées dans leur composition respective en métabolites secondaires [274]. La supériorité quantitative de l'huile essentielle des inflorescences en hexahydrofarnesyl acétone (teneur relative de 3,48% pour l'huile essentielle des inflorescences contre 0,63% pour celle des feuilles) pourrait, à titre d'exemple, être justifiée par la nature entomophile des ces organes reproducteurs [274 ; 305 ; 306]. En effet, les résultats publiés par Eltz *et al.* (2010) mettent en exergue l'activité attractive qu'exerce l'hexahydrofarnesyl acétone sur des espèces arthropodes pollinisatrices appartenant à la famille des apidés [307].

Excepté la fraction terpénique du volatilome émise par les inflorescences de *G. alypum* L. [305], l'étude phytochimique de l'huile essentielle extraite de ces dernières n'aurait fait l'objet, à notre connaissance, d'aucun résultat précédemment publié, ni même celle de l'appareil reproducteur des autres membres du genre *Globularia*.

S'agissant de l'analyse chromatographique des extraits étheriques des deux organes végétaux étudiés, celle-ci n'a globalement révélée que des molécules ayant subi une estérification de leur fonction carboxylique - exception faite pour l' α -tocophérol et le β -sitosterol, respectivement identifiés à l'analyse des extraits des feuilles et des inflorescences de la plante -. L'injection d'un échantillon comportant des molécules lourdes (non volatiles) non dérivatisées provoquerait une usure prématurée de la colonne capillaire chromatographique. A cet effet, suivant le protocole adopté, seul le surnageant a du être recueilli en vue de son analyse, réduisant sensiblement la possibilité de détection de l'ensemble des composés constitutifs de l'échantillon [251].

Aucune référence bibliographique ne mentionne, à notre connaissance, l'existence de travaux antérieurs sur l'analyse de la composition de ces mêmes extraits.

IV. ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

IV.1. Evaluation de l'activité anti-antioxydante

IV.1.1. Résultats

La capacité anti-radicalaire des 06 extraits bruts et celle des 02 huiles essentielles a été évaluée par l'application de la méthode spectrophotométrique de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•).

La figure 3.9 correspond à la courbe de calibration du DPPH en solution méthanolique. L'analyse des paramètres de cette courbe (pente hautement significative : $p < 0,0001$; $r^2 = 0,999$; $r = 0,999$; l'ordonnée à l'origine = $0,00094$) nous renseigne sur la linéarité et la proportionnalité des absorbances relevées en fonction de la gamme de concentrations du DPPH utilisée.

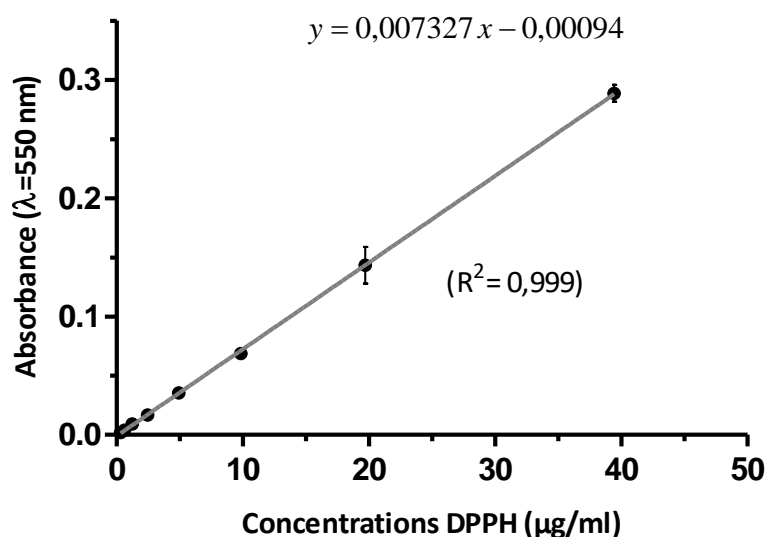


Figure 3.9 : Courbe de calibration du DPPH en solution méthanolique

Les concentrations inhibitrices des échantillons réduisant la quantité de DPPH à 50% (CI50) ont été déterminées graphiquement à partir des courbes d'inhibition présentées dans la figure 3.10.

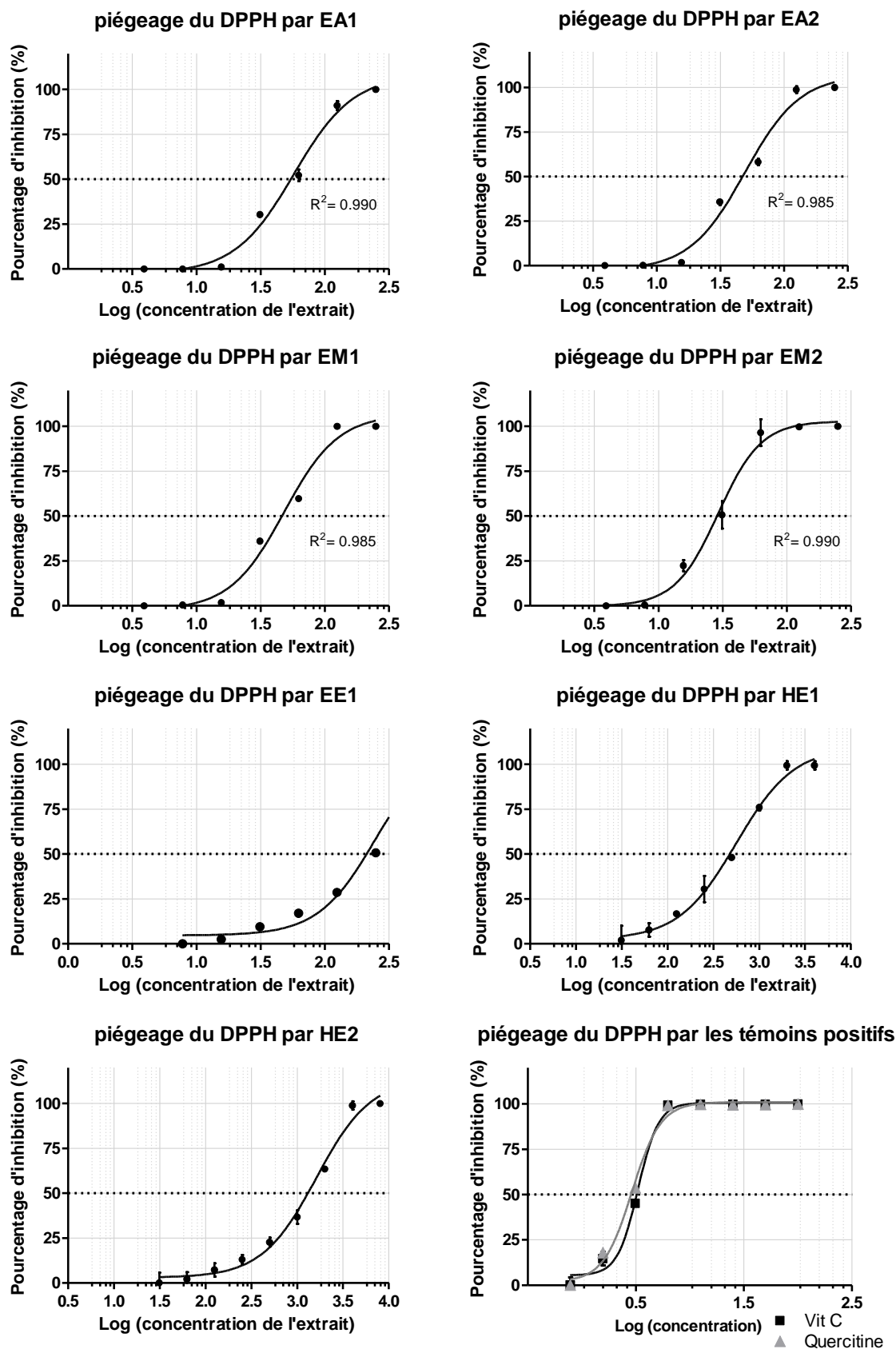


Figure 3.10 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des échantillons

Les valeurs obtenues à partir des graphiques sont regroupées dans le tableau 2.8 et sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$ ainsi qu'en μg d'antioxydants (AO)/ μg de DPPH dans une perspective de standardisation des résultats.

Les indices exprimant le potentiel anti-radicalaire (IPAR) des échantillons correspondent à l'inverse des IC50 estimés ($1/\text{IC}_{50}$) : $[\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$.

Tableau 2.8 : Résultats de l'activité anti-oxydante des extraits et huiles essentielles

Echantillons	CI50 ($\mu\text{g/ml}$)	CI50 ($\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}$)	IPAR ($[\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$)
	m [IC95]	m [IC95]	m [IC95]
EA.1	57,39 [49,80 - 66,14]	1,45 [1,26 - 1,68]	0,690 [0,595 - 0,794]
EA.2	49,24 [42,12 - 57,55]	1,24 [1,07 - 1,46]	0,806 [0,685 - 0,935]
EM.1	48,20 [39,2 - 57,74]	1,22 [1,05 - 1,42]	0,820 [0,704 - 0,952]
EM.2	29,14 [26,46 - 32,09]	0,74 [0,67 - 0,81]	1,350 [1,235 - 1,492]
EE.1	247,8 [201,2 - 305,1]	6,28 [5,10 - 7,74]	0,159 [0,129 - 0,196]
EE.2	> 250	> 6,34	< 0,158
HE.1	560,4 [483,1 - 649,9]	14,21 [12,25 - 16,48]	0,070 [0,061 - 0,082]
HE.2	1613 [1326 - 1961]	40,90 [33,63 - 49,73]	0,024 [0,020 - 0,030]
Acide ascorbique	3,31 [3,16 - 3,48]	0,084 [0,080 - 0,088]	11,90 [11,36 - 12,50]
Quercitine	2,91 [2,72 - 3,11]	0,074 [0,069 - 0,079]	13,51 [12,66 - 14,49]

Dans l'ensemble, les IPAR ainsi déterminées varient significativement en fonction des échantillons végétaux testés ; passant de 0,024 à 1,350 $[\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$ (différences hautement significatives : $p < 0,0001$), respectivement de l'huile essentielle à l'extrait méthanolique des inflorescences. Les différences observées entre les résultats des extraits EA.1, EA.2 et EM.1 seraient, quant à eux, non significatives ($p = 0,35$).

Par défaut de quantités nettement supérieures à 500 µg d'extrait par essai répété, la détermination de la CI50 de l'extrait EE2 n'a pu être concrétisée à l'issue de notre étude. Nos résultats indiqueraient néanmoins une CI50 supérieure à 250 mg/ml de l'extrait en question ($IPAR < 0,158 [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$).

Par ordre décroissant de leur potentiel antioxydant respectif, les extraits et huiles essentielles testés sont ainsi classés :

$$EM.2 > EM.1 \sim EA.2 \sim EA.1 > EE.1 > HE.1 > HE.2$$

Les témoins positifs de l'essai ont révélé des résultats supérieurs à ceux obtenus avec le reste des échantillons ($p < 0,001$). Le potentiel antioxydant de la quercétine et celui de l'acide ascorbique (vitamine C) seraient, respectivement, 10 et 09 fois supérieurs ($p < 0,001$) à celui de l'extrait le plus actif de plante étudiée (EM.2).

- **Régression linéaire simple**

L'analyse statistique définissant la nature de la relation éventuellement établie entre l'activité anti-oxydante de nos extraits et leur teneur respective en polyphénols totaux a été réalisée sur la base des résultats relatifs aux extraits aqueux et méthanoliques des deux drogues végétales étudiées ainsi qu'à l'extrait étherique des feuilles.

La figure 3.11 illustre l'ajustement du modèle linéaire aux données recueillies. Les paramètres inhérents à l'étude de la corrélation et à la régression linéaire simple sont, quant à eux, regroupés dans le tableau 2.9.

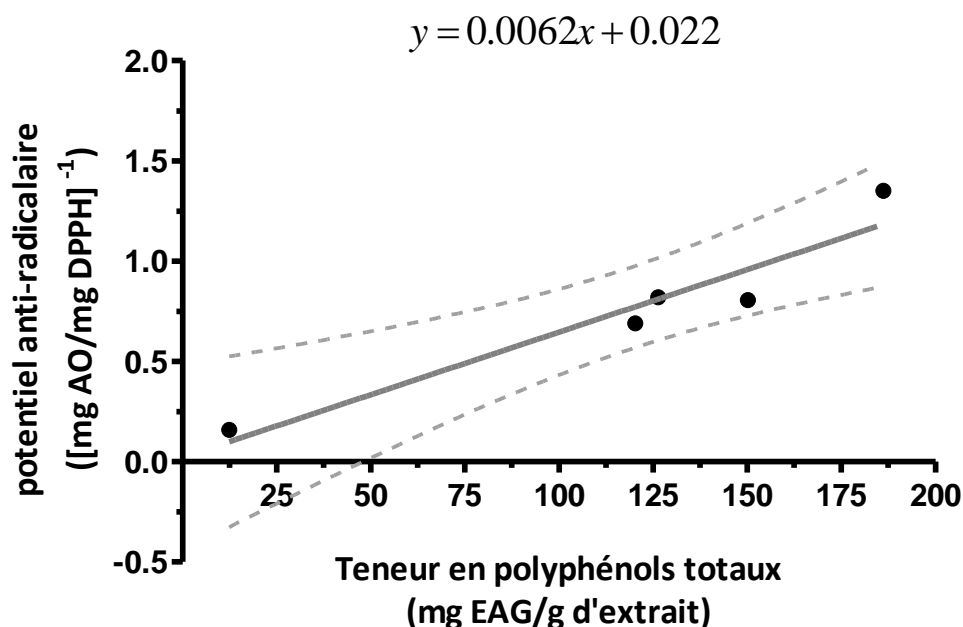


Figure 3.11 : Ajustement des données de l'activité anti-oxydante et des teneurs en composés phénoliques au model linéaire simple

Tableau 2.9 : Paramètres de la corrélation et de la régression linéaire simple des données de l'activité anti-oxydante et des teneurs en composés phénoliques

Paramètres	m	[IC95]
Coefficient de corrélation (r)	0,9564 ($p = 0,0109$)	[0,4740 – 0,9972]
Coefficient de détermination (r^2)	0,9146	[0,2247 – 0,9944]
Coefficient directeur de l'ajustement (la pente α)	0,0062	[0,0027 – 0,0097]
L'ordonné à l'origine en y (lorsque $x = 0,0$)	0,0211	[-0,4419 – 0,4862]

Dans le domaine des résultats analysés, l'interprétation du coefficient de corrélation suggère l'existence d'une dépendance linéaire significative entre les deux variables étudiées ($p = 0,0109$).

Ainsi, le potentiel antioxydant d'un des extraits serait positivement corrélé ($r = 0,9564$) à sa teneur en composés phénoliques et expliqué par cette dernière suivant l'équation de la régression présentée dans la figure 3.11 ([Potentiel antioxydant] = $0,0062$ [Teneur en polyphénols] + $0,022$). Le coefficient de

détermination étant égal à 0.9146, environ 91 % de la variation de l'activité anti-radicalaire des extraits serait expliquée par cette équation.

IV.1.2. Discussion

Au regard de l'intérêt grandissant dans la recherche de nouvelles molécules anti-oxydantes, de nombreuses méthodes consacrées à l'évaluation du potentiel anti-radicalaire ont été développées. Parmi celles les plus utilisées, est fréquemment citée la méthode basée sur le piégeage du radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle), en raison des avantages qu'offre cette dernière en terme de simplicité, de rapidité, de sensibilité et de reproductibilité [255 ; 308 ; 309].

Les divergences de procédures opératoires que connaît cette méthode aboutissent généralement à l'obtention de résultats non comparables par défaut de standardisation. Les paramètres divergents concernent le plus souvent le choix du solvant de dissolution, le temps de réaction, la concentration initiale du radical libre DPPH• et le ratio extraits/ DPPH• (v/v) adopté [258].

Scherer et Godoy (2009) proposent une solution permettant un affranchissement de l'influence des deux derniers paramètres évoqués par la détermination des indices inhérent au potentiel anti-radicalaire des échantillons testés (IPAR) exprimés en $[\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$ [258]. Un critère d'évaluation de ce potentiel anti-radicalaire a également été présenté par ces mêmes auteurs : faible activité anti-oxydante pour des extraits ayant un IPAR $< 0,5 [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$; activité modérée pour des extraits à IPAR inclus entre 0,5 et 1,0 $[\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$; forte à très forte activité anti-oxydante respectivement pour des extraits révélant des IPAR inclus entre 1,0 et 2,0 $[\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$ et ceux affichant des IPAR $> 2,0 [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$.

Dans notre travail expérimental, l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des 06 extraits bruts et des 02 huiles essentielles, propres aux feuilles et inflorescences de *Globularia alypum* L., a été concrétisée par l'application de la méthode de Brand-William (1995) telle que modifiée par Zhang (2009) [252 ; 253]. Les modifications apportées concèdent à la méthode une adaptabilité nécessaire à sa

réalisation en microplaques, nous permettant ainsi une optimisation du temps d'exécution et une réduction des quantités relatives au mélange réactionnel.

Le mode opératoire en microplaques serait, à juste titre, jusqu'à 06 fois plus rapide et 33 fois moins consommateur en réactifs et en échantillons à tester que celui exécuté à l'aide de cellules spectrophotométriques conventionnelles [310]. De plus, les paramètres de validation de la méthode menée en microplaques, en termes de sensibilité, de répétabilité et de reproductibilité, seraient similaires à ceux obtenus avec la procédure classique [311 ; 312].

En référence au critère d'évaluation établi par Scherer et Godoy (2009) [258], nos résultats suggèrent la présence d'une activité à fort potentiel anti-radicalaire exercée par l'extrait méthanolique des inflorescences ($1,350 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$), suivie, selon un ordre de potentiel décroissant, par les activités modérées analogues des trois extraits méthanolique des feuilles, aqueux des inflorescences et celui des feuilles ($0,69\text{-}0,82 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$) ; par la faible activité anti-radicalaire des extraits étheriques des feuilles et des inflorescences ($0,159 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$ et IPAR inférieur à $0,158 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$, respectivement) et enfin par celle de leur huile essentielle correspondante ($0,070$ et $0,024 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$, respectivement).

De manière similaire, Amessis-Ouchemoukh *et al.* (2014) ont constaté une supériorité du potentiel anti-radicalaire relatif à l'extrait méthanolique des inflorescences ($\text{CI}_{50} = 4 \text{ } \mu\text{g/ml}$, soit un $\text{IPAR} = 5,77 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$) par comparaison à celui des feuilles ($\text{CI}_{50} = 31 \text{ } \mu\text{g/ml}$, soit $\text{IPAR} = 0,77 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$) [69]. Par ailleurs, l'IPAR de ce dernier (extrait méthanolique des feuilles), déduit à partir des résultats de ces mêmes auteurs, serait comparable à celui présenté dans notre étude ($p = 0,5$). Quant aux extraits méthanoliques des inflorescences, une différence de potentiel anti-radicalaire ($p = 0,001$) a été observée à la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par Amessis-Ouchemoukh *et al.* (2014) [69].

L'activité anti-oxydante révélée par notre extrait méthanolique des feuilles serait, à priori, non concordante avec les résultats publiés par Khlifi *et al.* (2011) ($\text{IC}_{50} = 27,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$, soit $\text{IPAR} = 1,43 \text{ } [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$) [81]. Il en est, en

revanche, le contraire s'agissant de l'extrait étherique des feuilles dont l'IPAR déduit ($IC_{50}=285,22 \mu\text{g/ml}$, soit $IPAR= 0,138 [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$) serait semblable au notre ($p=0,1$).

Nos résultats et ceux de Rached *et al.* (2010) [77] convergent vers la conclusion d'absence de différence significative ($p > 0,05$) entre l'activité anti-radicalaire des deux extraits aqueux des feuilles ($IC_{50}=24,43 \mu\text{g/ml}$) et des inflorescences ($IC_{50}=25,50 \mu\text{g/ml}$) avec des IPAR respectivement proches ($IPAR= 0,94 [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$) et similaires aux nôtres ($IPAR= 0,90 [\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}]^{-1}$; $p= 0,1$).

L'efficacité de piégeage du DPPH a également été observée par Touaibia et Chaouch (2016) lors des travaux menés sur l'extrait éthanolique des feuilles : l' IC_{50} de cet extrait serait inférieure à celle de la quercitine [11].

L'étude de la capacité anti-radicalaire des deux huiles essentielles relatives aux feuilles et aux inflorescences de la plante, ainsi que celle de l'extrait étherique de ces dernières, n'ont été retrouvées dans aucune publication antérieure.

Tout en n'omettant pas la possibilité de survenu d'éventuelles erreurs de manipulation, l'observation d'une fluctuation significative des résultats pour la même nature d'extrait serait en partie expliquée par l'influence des mêmes facteurs modulant le métabolisme des composés phénoliques au sein des tissus végétaux [313 ; 314 ; 315 ; 316].

A cet égard, l'étude de la corrélation suivie par l'ajustement au modèle linéaire simple des données relatives à l'activité anti-oxydante des extraits et à celles de leur teneur en polyphénols totaux ($r=0,9564$; $r^2=0,9146$; $\alpha=0,0062$), nous permettent de suggérer que le potentiel anti-radicalaire de nos extraits serait fortement lié à leur quantité respective en composés phénoliques.

Plusieurs résultats précédemment mis au jour sur l'activité anti-oxydante remarquable de nombreux extraits végétaux ont été positivement corrélés à la prédominance des polyphénols totaux dans la composition de ces derniers [317 ; 318 ; 319 ; 320]. Sont compris parmi ces résultats, ceux de Crkvenčić *et al.* (2013) dont les travaux se sont intéressés aux extraits de trois espèces appartenant au genre *Globularia* : *G. punctata*, *G. meridionalis* et *G. cordifolia* [321].

IV.2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-LEISHMANIENNE

IV.2. 1. Résultats

- **Croissance parasitaire en milieu RPMI**

Les courbes des cinétiques de croissance des formes promastigotes en milieu RPMI complet sont représentées dans la figure 3.12. L'ensemble des courbes décrivent une phase à multiplication parasitaire exponentielle suivie d'un plateau correspondant à la phase stationnaire de croissance.

Des différences sont néanmoins observables entre les cinétiques de croissance des cinq isolats parasites ; tant au niveau des taux de croissance spécifique maximaux ($p < 0,0001$) qu'au niveau des concentrations à confluence maximale des cultures ($p < 0,0001$) (tableau 2.10).

Tableau 2.10 : Paramètres de la cinétique de culture des cinq isolats parasites en milieu RPMI complet

Isolats parasites	μ_{\max} (h^{-1})	Concentrations maximales (10^6 parasites/ml)
	m [IC]	m [IC]
<i>L. major</i> (LIPA 100)	0,027 [0,011-0,043]	5,6 [5-6,2]
<i>L. major</i> (LIPA 32/06)	0,040 [0,008-0,072]	4,3 [3,7-4,9]
<i>L. killicki</i>	0,075 [0,072-0,078]	7,6 [7-8,2]
<i>L. infantum</i>	0,118 [0,102-0,134]	20,7 [19,8-21,6]
<i>L. donovani</i>	0,108 [0,102-0,114]	16,1 [15,5-16,7]

μ_{\max} : taux de croissance spécifique maximal ; m : moyenne déterminée à partir de quatre répétitions de mesure ; IC : intervalle de confiance à 95%.

L'allure des courbes de croissance est semblable pour les souches *Leishmania killicki* (LIPA 281), *L. infantum* (LEM 5285) et *L. donovani* (LDD8), et ce, dans le fait de l'absence d'une phase de latence notable et l'entame d'une phase de croissance stationnaire après 48 à 72 heures de culture.

Les deux isolats *L. major*, LIPA 100 et LIPA 32/06, possèdent, quant à eux, une courbe de croissance caractérisée par une cinétique relativement plus lente que

les souches viscérotropes ($p < 0,0001$), avec des taux de croissance spécifiques maximaux respectifs de $0,027 (\pm 0,016) \text{ h}^{-1}$ et $0,04 (\pm 0,032) \text{ h}^{-1}$, ainsi que par la présence d'une phase de latence à moins de 24 heures de la culture. Après 48 heures d'incubation, la culture des deux isolats parasites se trouve en pleine phase de croissance exponentielle.

Le suivi de la cinétique de croissance des cinq isolats parasites nous a ainsi permis d'estimer au mieux la période correspondante à la phase de croissance exponentielle propre à chaque souche.

Les tests d'inhibition de la croissance des leishmanies ont, par conséquent, été conduits sur les isolats LIPA 281, LEM 5285 et LDD8 récoltés après 24 heures de culture, tandis que les deux isolats LIPA 100 et LIPA 32/06 ont été pris après 48 h d'incubation.

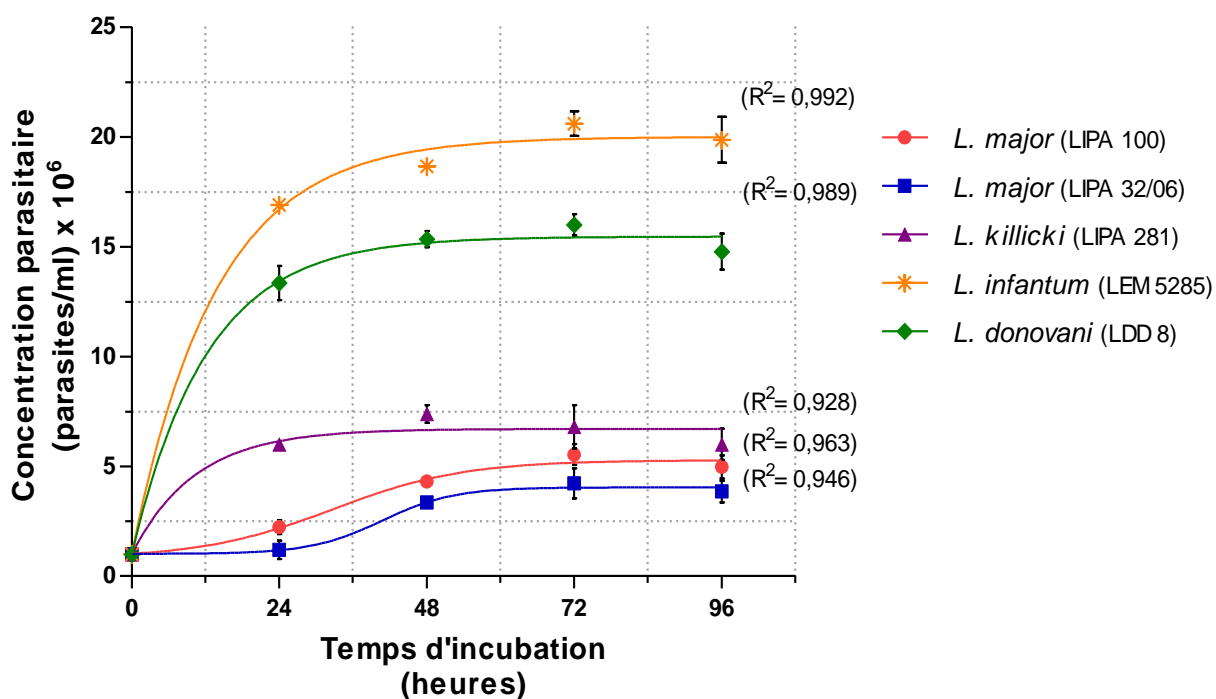


Figure 3.12 : Courbes des cinétiques de croissance des isolats parasites en milieu RPMI complet

- **Criblage préliminaire**

Le criblage préliminaire de l'évaluation de l'activité antileishmanienne a été réalisé *in-vitro* en testant l'effet, sur la croissance des promastigotes, des 06 extraits méthanoliques, aqueux et étheriques ainsi que les deux huiles essentielles inhérentes aux deux organes végétaux étudiés (feuilles et inflorescences de *Globularia alypum* L.). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire par comparaison avec le témoin négatif. Ces derniers sont illustrés par un histogramme dans la figure 3.13 (les résultats sont recueillis dans le tableau de l'annexe H). Les valeurs obtenues sont, par série de données, statistiquement homogènes (coefficient de variation <15%).

L'observation de ces résultats nous a permis de distinguer, en particulier, deux extraits révélant une activité leishmanicide remarquable à 250 µg/ml. Il s'agit en l'occurrence des deux extraits bruts étheriques des feuilles (EE.1) et celui des inflorescences (EE.2) avec des pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire atteignant les 100% d'inhibition et traduisant une altération totale de l'intégrité cellulaire pour l'ensemble des souches ayant fait l'objet des tests. La figure 3.13 illustre une diminution de la concentration parasitaire (*L. donovani*-LDD8) remarquable après 18 heures d'incubation des parasites dans du RPMI contenant 250 µg/ml d'extrait étherique de feuillies.

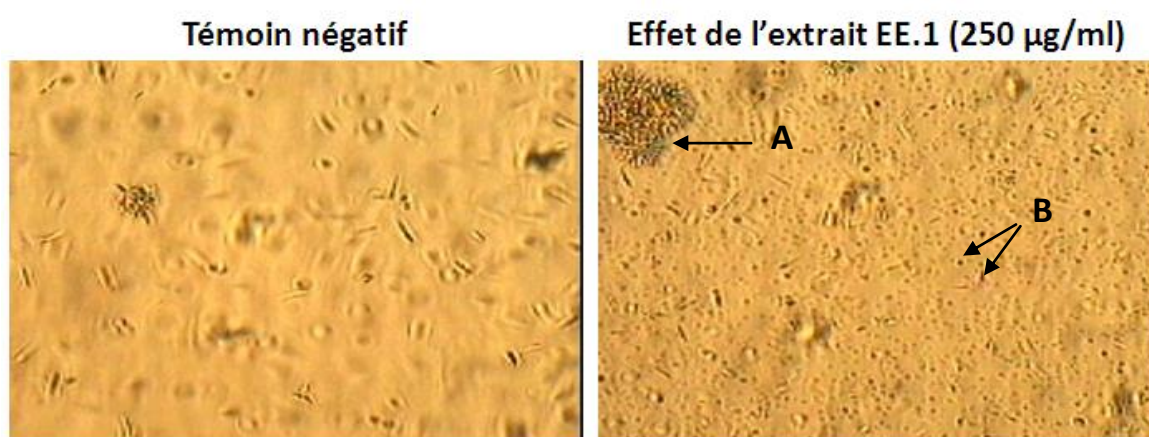


Figure 3.13 : Champs d'observation microscopiques de *L. donovani* après 18 heures de culture en absence et en présence de l'extrait EE.1 (Gx40).

(A : rosette de promastigotes ; B : débris cellulaires)

Des résultats identiques ont été obtenus avec le témoin positif (amphotéricine B) testé à la concentration finale leishmanicide de 2 µg/ml.

Les extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et ceux des inflorescences (EM.1, EA.1, EM.2 et EA.2) ainsi que les huiles essentielles (HE.1 et HE.2) ont respectivement affecté variablement la croissance des souches parasites (figure 3.14). L'exemple le plus éloquent exprimant cette variabilité de réponse est celui de l'essai inhérent à l'huile essentielle extraite des inflorescences (HE.2) dont l'activité est à l'origine de l'inhibition de la croissance de l'isolat *L. major* (LIPA 100) à $80,4 \pm 0,7$ % par comparaison au témoin négatif, tandis qu'aucun effet d'inhibition, à la même concentration de l'huile essentielle (250 µg/ml), n'a été constaté à l'issue des tests menés sur *L. killicki*, *L. infantum* et *L. donovani* (les différences entre les valeurs des témoins négatifs et ceux de l'huile essentielle sont toutes non significatives ; $p > 0,05$).

Concernant le contrôle de l'activité du solvant utilisé pour la dissolution des extraits (blanc du test), les résultats suggèrent que l'addition du diméthyl sulfoxyde (DMSO) seul au milieu de culture, en quantité équivalente à 0,3 % (v/v), n'a eu aucun effet significatif ($p > 0,05$) sur la croissance des promastigotes cultivés dans les mêmes conditions de culture que ceux de l'ensemble des tests réalisés.

Les résultats des tests ayant été biaisés, par la présence de contaminants microbiologiques ou par l'occurrence de très faibles taux de croissance parasites des témoins négatifs, n'ont pas été pris en considération dans la présentation et l'exploitation du produit de ce travail expérimental.

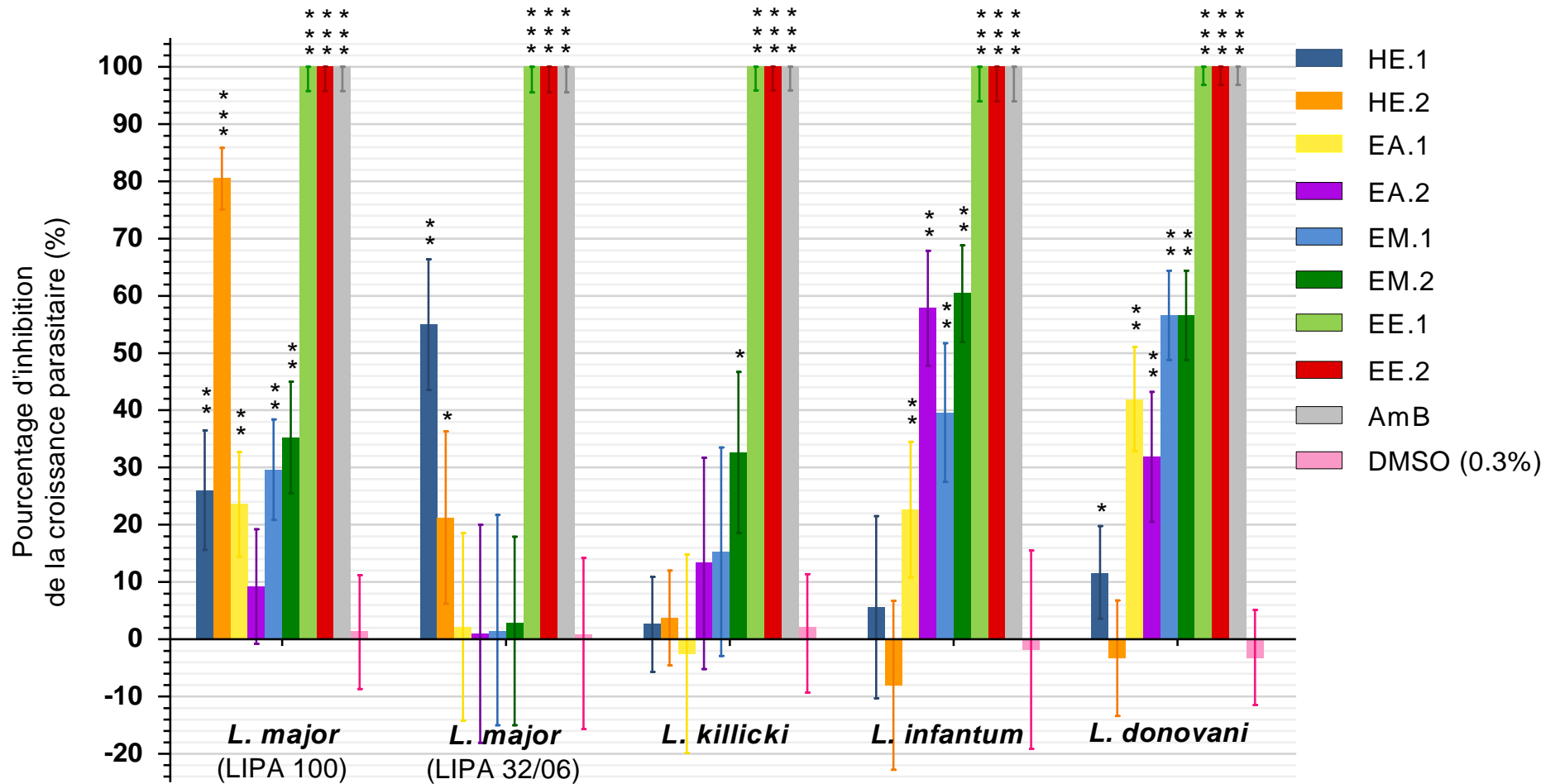


Figure 3.14 : Représentation graphique des résultats du criblage préliminaire des extraits en fonction de l'inhibition de la croissance parasitaire. (*) : résultat significativement différent de la valeur nulle, (**) : différence très significative, (***) : différence hautement significative

- **Détermination des CI50**

L'analyse quantitative de l'activité leishmanicide par la détermination des CI50 n'a été engagée que pour les extraits végétaux ayant révélé des résultats préliminaires remarquables à 250 µg/ml ; à savoir, les deux extraits bruts étheriques EE.1 et EE.2.

Les CI50, présentées dans le tableau 2.11, ont été déterminées graphiquement à partir de courbes d'inhibition de la croissance parasitaire en fonction des concentrations de l'extrait testé : 12,5 à 200 µg/ml (figure 3.15). Le modèle mathématique utilisé pour le traçage des courbes d'inhibition est statistiquement satisfaisant pour l'ensemble des tests effectués ($R^2 > 0,97$).

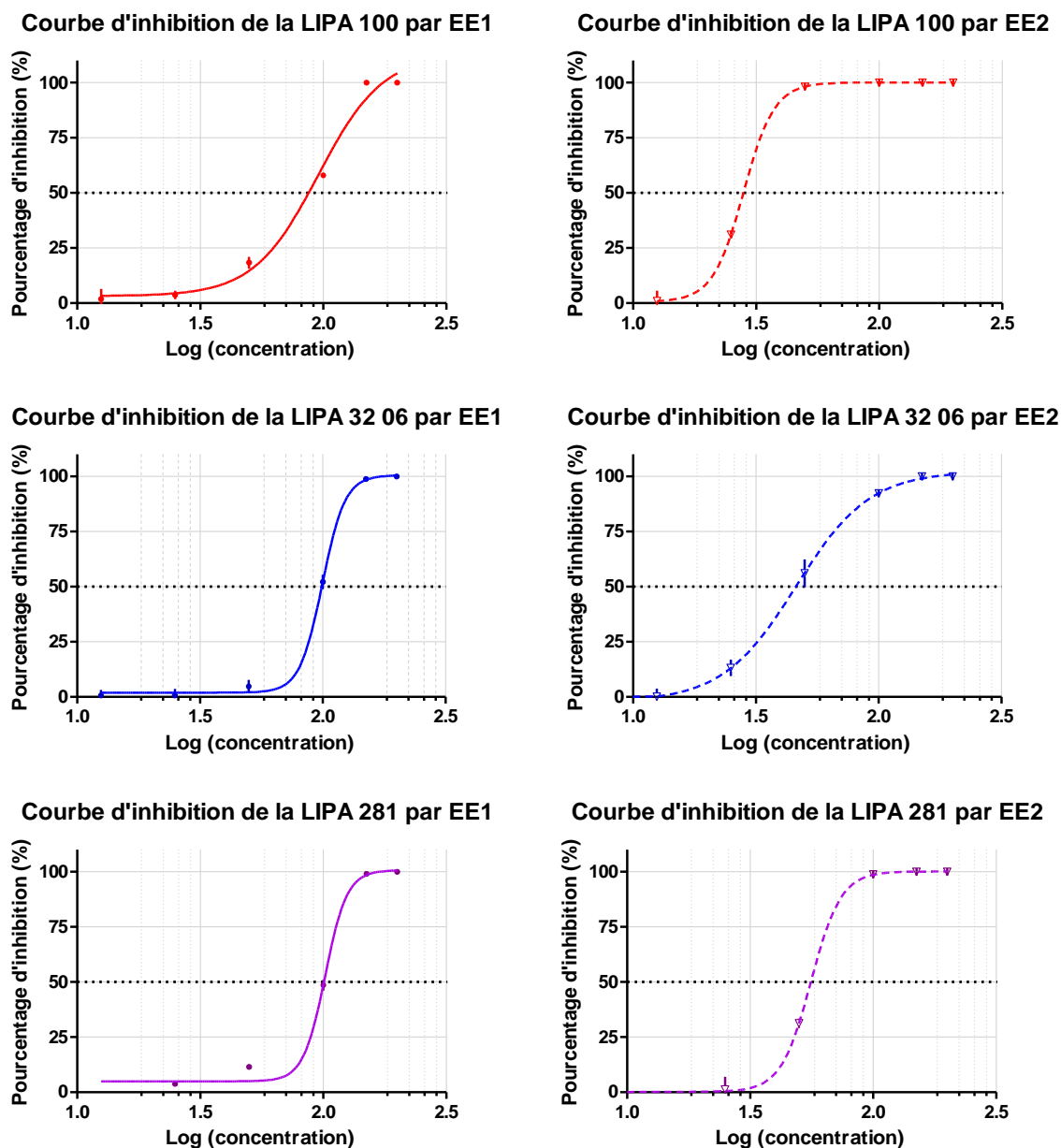


Figure 3.15 : Pourcentages d'inhibition parasitaire en fonction des concentrations des extraits

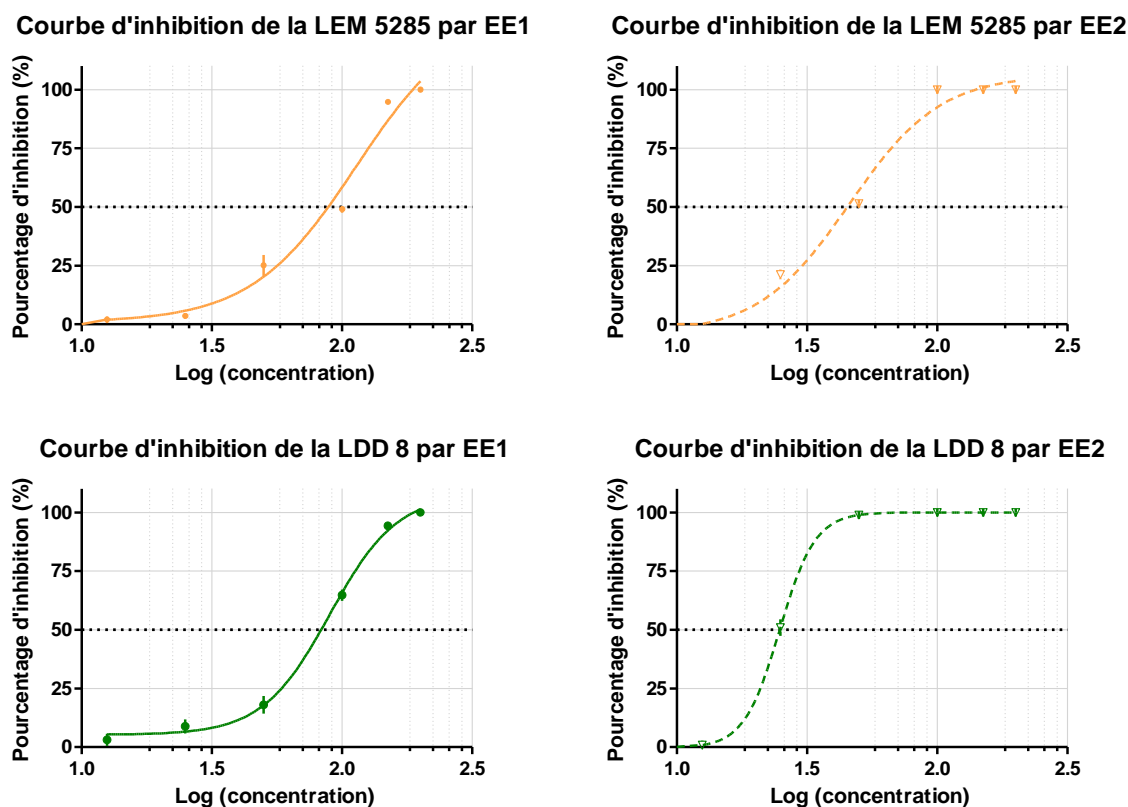


Figure 3.15 (suite) : Pourcentages d'inhibition parasitaire en fonction des concentrations des extraits

Tableau 2.11 : Concentrations inhibitrices à 50% de la croissance parasitaire relatives aux extraits EE1 et EE2

Isolats parasitaires	CI50 ($\mu\text{g/ml}$)		
	extrait « EE.1 »	extrait « EE.2 »	AmB
	m [IC95]	m [IC95]	m [IC95]
<i>L. major</i> (LIPA 100)	95,4 [85,1 – 107,0]	28,1 [26,2 – 30,1]	0,29 [0,28-0,31]
<i>L. major</i> (LIPA 32/06)	99,6 [97,2 – 102,1]	46,1 [41 – 51,8]	0,9 [0,77-1,3]
<i>L. killicki</i> (LIPA 281)	101,8 [98,6 – 105,1]	55,9 [50,2 – 62,3]	0,46 [0,32-0,67]
<i>L. infantum</i> (LEM 5285)	113 [77,8 – 165,4]	45,9 [40,8 – 51,6]	0,56 [0,48-0,65]
<i>L. donovani</i> (LDD 8)	89,7 [81,9 – 98,3]	24,8 [24,1 – 25,5]	0,23 [0,18-0,28]

m : moyenne déterminée à partir de quatre répétitions de mesure ;

IC95 : intervalle de confiance à 95%.

Le degré d'inhibition de la croissance parasitaire étant inversement proportionnel à la CI50, l'analyse des résultats conduit à la conclusion d'une activité leishmanicide supérieure de l'extrait EE2 par comparaison à celle de l'extrait EE1. En effet, les différences entre les CI50 des deux extraits, comparées deux à deux pour chaque isolat parasitaire, sont toutes hautement significatives ($p < 0,001$).

Contrairement à l'extrait EE2, l'activité inhibitrice de l'extrait EE1 ne présente pas une variabilité de réponse significative en fonction des cinq isolats parasitaires ($p = 0,058$) et possède, de ce fait, une CI50 globale égale en moyenne à $99,9 \pm 5$ $\mu\text{g/ml}$ (\pm ESM : erreur standard de la moyenne).

Les résultats obtenus, quant à l'évaluation de l'extrait EE2, varient significativement selon les isolats parasitaires ($p < 0,0001$) ; allant d'une CI50 de $55,9 \mu\text{g/ml}$, s'agissant du test mené sur la culture de *L. killicki* (LIPA 281), à une CI50 de $24,8 \mu\text{g/ml}$ pour ce qui est de l'inhibition de la croissance de la souche *L. donovani* (LDD 8). Cette dernière serait par voie de conséquence la plus sensible à l'activité leishmanicide induite par l'extrait EE2.

Le classement des isolats parasitaires du plus au moins sensible à l'activité de l'extrait EE2 abouti à l'agencement suivant :

L. donovani-LDD8 > *L. major*-LIPA100 > *L. infantum*-LEM5285 ~ *L. major*-LIPA32/06 ($p = 0,9$: différence non significative) > *L. killicki*-LIPA281.

La comparaison des CI50 traduisant l'activité inhibitrice des deux extraits bruts EE1 et EE2 avec ceux du témoin positif (amphotéricine B) dénote d'un effet leishmanicide plus important de ce dernier sur l'ensemble des souches ayant fait l'objet des différents tests.

- **Cytotoxicité**

L'évaluation de la cytotoxicité a été menée sur des macrophages issus de la différenciation *in-vitro* des monocytes appartenant à la lignée cellulaire humaine THP1. Les extraits étheriques respectifs des feuilles et des inflorescences, EE.1 et EE.2, ont été testés à partir d'une gamme de concentration allant de $25 \mu\text{g/ml}$ à $250 \mu\text{g/ml}$.

A l'analyse des résultats représentés dans la figure 3.16, aucune activité cytotoxique significative, imputable aux plus hautes concentrations testées des deux extraits EE.1 et EE.2, n'a été observée sur la croissance des macrophages à l'issu des 72 heures d'incubation.

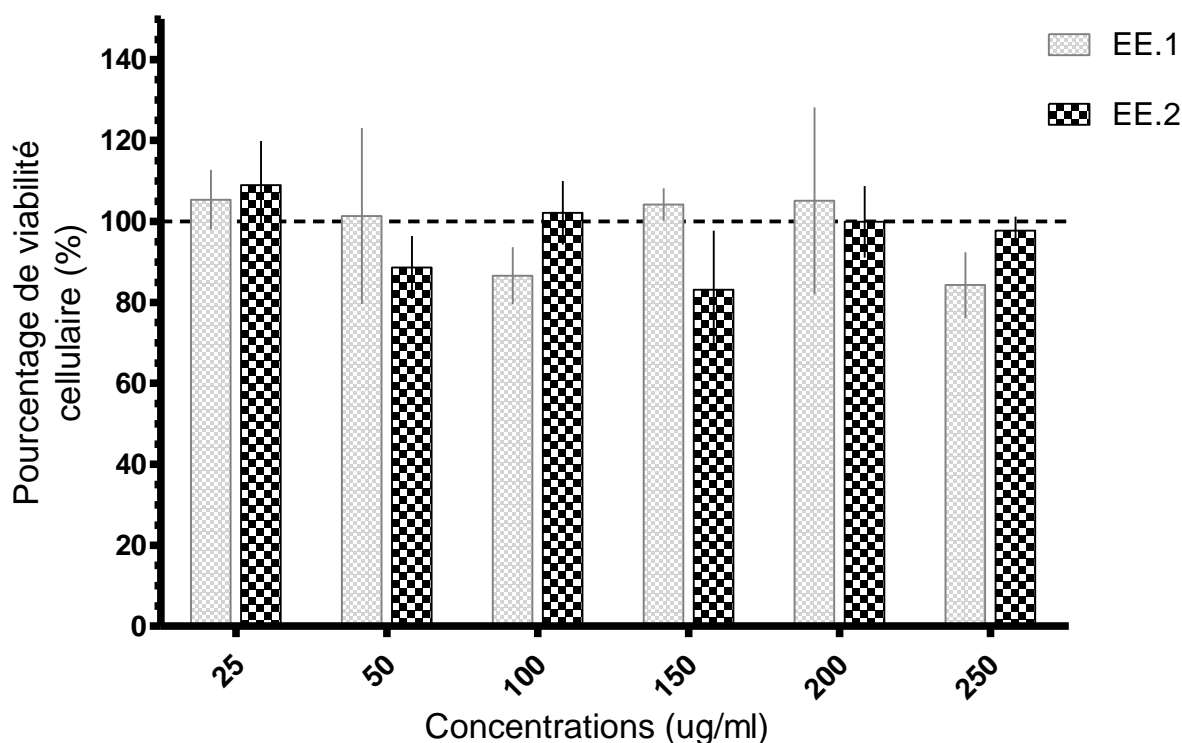


Figure 3.16 : Histogramme des résultats de l'activité cytotoxique des extraits étheriques

La comparaison des résultats du dénombrement de cellules viables inhérents aux témoins négatifs avec ceux des extraits testés à la concentration finale de 250 $\mu\text{g/ml}$ abouti à la conclusion d'absence de différences significatives. La variabilité des pourcentages de viabilité serait donc le résultat de l'échantillonnage aléatoire pour les valeurs de 84 ± 08 % ($p= 0,19$) et 109 ± 11 % ($p= 0,58$) obtenues respectivement avec les concentrations maximales testées de EE.1 et de EE.2. Les concentrations minimales actives des deux extraits seraient par conséquent supérieures à 250 $\mu\text{g/ml}$. Le blanc du test (DMSO à 0,3%) n'a également pas révélé un résultat significatif de cytotoxicité ; le pourcentage de viabilité étant de 102 ± 07 % ($p= 0,86$).

Dans les limites de la gamme de concentrations utilisée, l'examen microscopique de l'aspect général des cultures (détachement, vacuolisation, réduction du volume et lyse cellulaires) incubées en absence et en présence des deux extraits testés, nous suggère l'absence de l'éventuelle induction de modifications morphologiques et/ou structurales majeures des cellules potentiellement décelables au microscope photonique inversé (Gx20 ph). La figure 3.17 regroupe des prises photographiques des champs d'observation microscopiques des cultures illustrant ce constat (observations effectuées après 72 heures d'incubation).

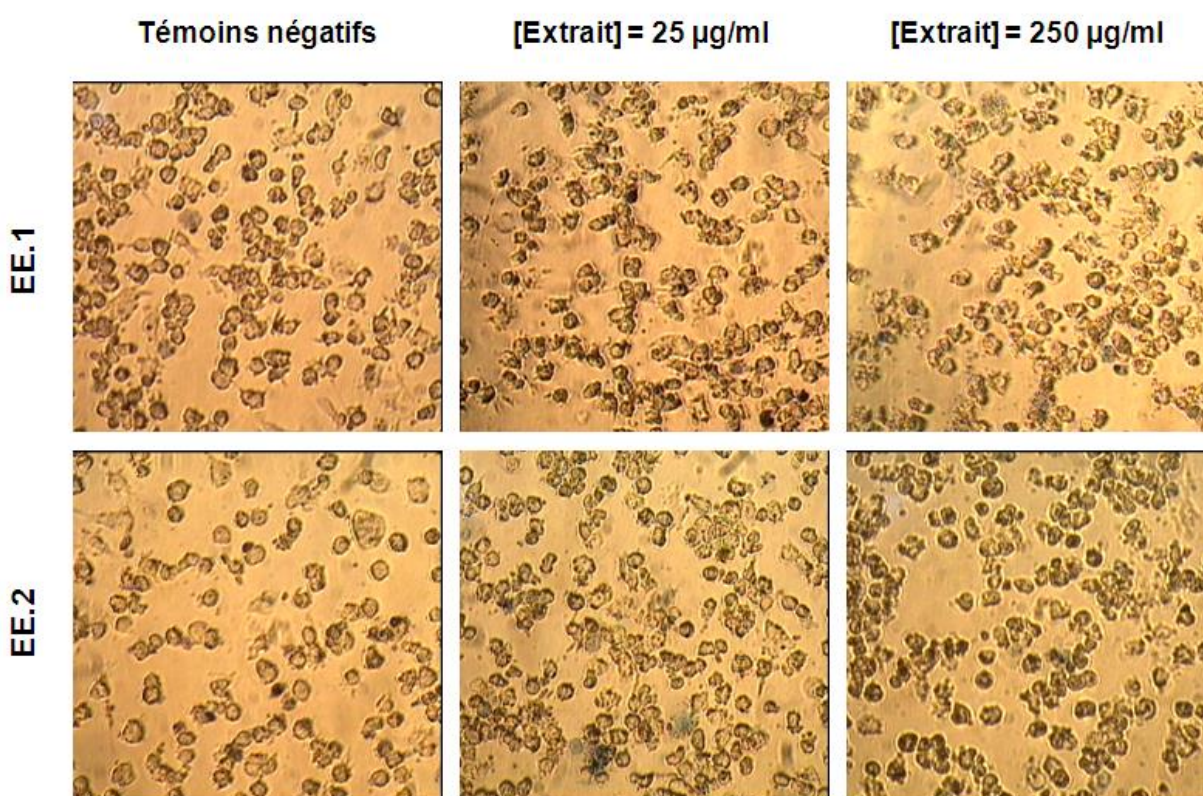


Figure 3.17 : Champs d'observation microscopiques des cultures de THP1 (transformées) incubées à différentes concentrations des extraits étheriques (Gx20Ph)

En dépit de l'utilisation du solvant diméthyl sulfoxyde (DMSO), la nature hydrophobe des extraits étheriques a constitué un facteur limitant la solubilisation de ces derniers dans le milieu de culture. Ce qui nous a contraints à écarter la possibilité de recourir à des concentrations bien plus supérieures à 250 µg/ml en extrait, en vue de la détermination de la CI50 d'une éventuelle activité cytotoxique,

tout en utilisant des proportions raisonnables en DMSO inférieures à 0,5 % (v/v) [259 ; 322 ; 323 ; 324].

Au vue des résultats obtenus, l'indice de sélectivité (IS) (égal au rapport : CI50 de l'activité leishmanicide / CI50 de l'activité cytotoxique sur les macrophages) serait, tel que présenté dans le tableau 2.12, en moyenne supérieur à 2,5 pour l'extrait EE.1 et variable en fonction des souches pour l'extrait EE.2 ; incluant, au minimum, des valeurs supérieures à 4,5 et atteignant au meilleur résultat (cas du test menée sur *L. donovani* - LDD8) des valeurs supérieures à 10,1. Les indices de sélectivité, ainsi estimés, nous renseigne, de ce fait, sur la nature sélective de la toxicité induite par l'activité des deux extraits étheriques envers les leishmanies.

Tableau 2.12 : Indices de sélectivité inhérents à l'activité antileishmanienne des extraits étheriques

Extraits	CI50 de l'activité cytotoxique (µg/ml)	Indice de sélectivité (IS)				
		<i>L. major</i> (LIPA 100)	<i>L. major</i> (LIPA32/06)	<i>L. killicki</i> (LIPA 281)	<i>L. infantum</i> (LEM 5285)	<i>L. donovani</i> (LDD 8)
Extrait « EE.1 »	> 250	> 2,6	> 2,5	> 2,5	> 2,2	> 2,8
Extrait « EE.2 »	> 250	> 8,9	> 5,4	> 4,5	> 5,4	> 10,1

IV.2.2. Discussion

Les leishmanioses font partie du groupe des dix-sept pathologies qualifiées par l'Organisation Mondiale de la Santé de « maladies tropicales négligées », et ce, notamment du fait du manque d'investissement engagé par l'industrie pharmaceutique dans la recherche et le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique, pouvant éventuellement palier à la recrudescence des cas de résistance clinique aux traitements conventionnels [6 ; 143].

Le métabolisme secondaire des végétaux offre, en cela, un éventail des plus riches en molécules bioactives [6 ; 325 ; 326]. Pas moins de 122 composés à emploi pharmaceutique actuel en sont issus, dont environ 80 % possèdent une activité biologique positivement corrélée avec l'usage ethnobotanique attribué aux espèces végétales desquelles ils ont été isolés [7 ; 327].

Dans un même contexte, un usage traditionnel antileishmanien accordé à la plante médicinale *Globularia alypum* L. a été mis au jour par l'étude ethnomédicinale réalisée par Boudjelal *et al.* (2013) [60]. A partir de ces données, le potentiel antileishmanien de 06 extraits bruts (aqueux, méthanoliques et étheriques) et de deux huiles essentielles respectifs des feuilles et des inflorescences de la même espèce a été évalué à travers l'analyse des résultats de notre étude. Un nombre total de 05 isolats parasites du genre *Leishmania* ont fait l'objet des tests ; trois d'entre eux appartiennent aux souches dermatropes (*L. major* /MON-25 et *L. killicki* /MON-301) et deux autres viscerotropes (*L. infantum* /MON-281 et *L. donovani* /MON-2).

Différents modèles expérimentaux, dédiés à l'évaluation de l'activité leishmanicide des composés, sont décrits dans la littérature ; incluant des tests *in-vivo* et d'autres *in-vitro* sur des promastigotes axéniques, des amastigotes libres axéniques ou sur des amastigotes intramacrophagiques [328].

Le modèle *in-vitro* impliquant l'emploi direct de promastigotes en culture axénique offre l'avantage d'une exécution relativement simple et rapide des manipulations comparé aux autres modèles cités, avec une utilisation quantitativement minimale du composé à tester [328 ; 329]. La principale limite de ce modèle réside dans l'existence de différences significatives, entre les deux formes promastigote extracellulaire et amastigote (forme cliniquement pertinente), dans le degré de susceptibilité à l'activité de nombreux composés antileishmaniens [330 ; 331 ; 332] ; les amastigotes axéniques en sont généralement plus sensibles [333]. Une seconde limite du modèle correspond au fait que le test mené sur des formes extracellulaires du parasite serait insensible à l'activité antileishmanienne engendrée par un éventuel effet immunomodulateur des composés ou résultant d'une transformation chimique des molécules à l'intérieur des macrophages, à l'exemple de composés antimoniés pentavalents [334 ; 335 ; 336].

Les deux formes parasitaires, promastigote et amastigote, partagent en commun plusieurs caractères biochimiques et métaboliques. Ce qui permet néanmoins, dans les limites des tests menés sur des promastigotes, une identification de principes actifs à potentiel antileishmanien [334]. Pour cette raison et au vue des avantages évoqués précédemment, le modèle expérimental appliqué sur des promastigotes trouve tout son intérêt dans une première intention de criblage bioguidé de molécules ou complexes de molécules à activité antileishmanienne [212 ; 330 ; 335]. Notre choix a, par conséquent, été porté sur l'utilisation de promastigotes pour une première évaluation de l'activité antileishmanienne des feuilles et des inflorescences de la plante étudiée.

En prélude aux tests réalisés, la cinétique de croissance des leishmanies a été analysée dans le but principal de déterminer les jours de récolte des promastigotes correspondant à la phase exponentielle de croissance. Majoritairement retrouvés en cette phase lors d'une culture asynchrone, les promastigotes de stade procyclique (*sensu lato*) sont les seuls responsables de la multiplication active des formes extracellulaires [337 ; 338 ; 339 ; 340]. Suivant cette analyse, la récolte de ces derniers a donc été réalisée au commencement du 2^{ème} et 3^{ème} jour de croissance, en fonction du profil cinétique propre à chaque souche ainsi que des conditions de culture opérées (inoculum primaire, milieu de culture, température, volumes et atmosphère de culture) et non pas aux jours standards généralement admis, c'est-à-dire les 3-4 jours de culture [341]. Les vitesses de croissance spécifiques obtenues pour les deux souches viscérotropes, *L. infantum* (LEM 5285) et *L. donovani* (LDD8), sont significativement plus importantes que celle relatives aux deux isolats dermatropes *L. major* LIPA100 et LIPA 32/06. Ce résultat correspond à celui précédemment décrit par Hide *et al.* (2004) [341].

L'approche méthodologique adoptée dans notre travail nous a permis d'identifier, à l'issue du criblage préliminaire, deux extraits ayant révélés les plus forts potentiels leishmanicides parmi les extraits et huiles essentielles testés. Il s'agit des deux extraits étheriques EE.1 et EE.2, respectifs des feuilles et des inflorescences de *Globularia alypum* L. Ce criblage a été suivi par la détermination des CI50 relatives à l'activité leishmanicide des deux extraits en question ainsi que

par l'estimation de leur indice de sélectivité par l'évaluation complémentaire de leur cytotoxicité envers les macrophages.

Considérant les CI50 obtenues pour l'ensemble des souches testés, l'activité leishmanicide de l'extrait EE.2 serait plus importante que celle induite par EE.1 ($p < 0,0001$). Ce dernier a révélé en moyenne des CI50 de $99,9 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ (\pm ESM) tandis que l'extrait EE.2 a été à l'origine des CI50 variant, en fonction des isolats parasitaires, de $24,8 [24,1 - 25,5] \mu\text{g/ml}$ (sur *L. donovani*) à $55,9 [50,2 - 62,3] \mu\text{g/ml}$ (sur *L. killicki*) ; soit environ 2 à 4 fois plus actif que l'extrait EE.1.

D'après le critère d'évaluation établi par Cos *et al.* (2006) [342], l'activité leishmanicide d'un extrait (complexe de molécules) est considérée comme probante à partir d'une CI50 inférieure à $100 \mu\text{g/ml}$. L'évaluation de l'efficacité antileishmanienne ne peut, néanmoins, être satisfaisante qu'après estimation des indices de sélectivité (IS), représentant le ratio des deux activités leishmanicide et cytotoxique d'un extrait donné. Cette efficacité antileishmanienne est généralement qualifiée d'intéressante pour des extraits ayant une activité leishmanicide 10 fois plus importante que celle relative à la cytotoxicité envers les macrophages, ou meilleure encore ; ce qui correspond à un IS calculé supérieur ou égal à 10 [260 ; 343 ; 344 ; 345].

A la concentration maximale testée ($250 \mu\text{g/ml}$) aucun des deux extraits bruts EE.1 et EE.2 n'a exercé une cytotoxicité significative vis-à-vis des macrophages.

Bien que les CI50 de cytotoxicité n'aient pu être déterminées quantitativement avec exactitude ($\text{Ci}50 > 250 \mu\text{g/ml}$), l'estimation des IS nous suggère que l'activité toxique serait sélective envers les leishmanies. Cette interprétation est d'autant plus pertinente pour l'extrait EE.2 du fait que ses IS seraient au moins supérieurs à 4,5 concernant la souche *L. killicki* (LIPA 281) et à 10,1 pour la souche *L. donovani* (LDD 8).

Nous déduisons à partir de ces résultats la présence de composés à activité sélective antileishmanienne potentiellement intéressante au niveau de l'extrait étherique des inflorescences de *Globularia alypum* L. (EE.2) et dans une moindre mesure au niveau de l'extrait étherique des feuilles de la même espèce (EE.1).

La différence du potentiel leishmanicide observée entre les deux extraits bruts serait probablement due à la distribution inégale des métabolites secondaires au niveau des organes de la plante.

Quant à la variabilité de réponses d'inhibition des parasites à l'activité de EE.2 ainsi qu'à celle des extraits bruts aqueux, méthanoliques et des huiles essentielles, celle-ci serait manifestement le résultat de la sensibilité différentielle des souches vis-à-vis des molécules bioactives. De la même manière qu'elles le sont à l'égard de la majorité des molécules antileishmaniennes compte tenu des différences inter et intraspécifiques d'ordre biochimique, génétique et physiologique [212 ; 346 ; 347 ; 348].

De nombreuses études consacrées à l'évaluation de l'activité antileishmanienne d'extraits ou de molécules isolées de diverses ressources biologiques ont été publiées [349 ; 350]. A notre connaissance, aucune d'entre elles n'ont porté sur le potentiel leishmanicide des espèces appartenant au genre *Globularia*. Le même constat a été vérifié en ce qui concerne l'activité cytotoxique des extraits étheriques bruts des feuilles ou des inflorescences de *Globularia alypum* L.

Des résultats pertinents, quant à l'activité antimicrobienne des feuilles et de la partie aérienne de la globulaire, ont précédemment été obtenus. Ces derniers ont concerné l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de la plante [76 ; 88] ; notamment, celui de l'extrait étherique des feuilles dont l'activité bactéricide à l'encontre de *Mycobacterium tuberculosis* (CI50 =77 mg/ml) a été démontrée *in-vitro* par Khlifi *et al.* (2011) [81; 351].

Notre étude menée sur l'activité antileishmanienne de *Globularia alypum* L. s'ajoute à celles des espèces, antérieurement étudiées, appartenant à la large famille des Plantaginaceae. Six de ces espèces ont révélé des résultats pertinents. Il s'agit de *Plantago major* (activité immunomodulatrice) ; *Plantago palmata* (activité immunomodulatrice) [352 ; 353] ; *Conobea scoparioides*, active sur les promastigotes de *L. braziliensis*, de *L. infantum* et de *L. amazonensis* (à 100 µg/ml) ainsi que sur les amastigotes intracellulaires de *L. panamensis* (IS = 48,8) [260] ; *Scoparia dulcis*, active sur les amastigotes axéniques de *L. donovani* (IS = 5,9) [354] ; *Otacanthus azureus*, active sur les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* (IS = 51) [355] et *Bacopa monniera* dont la

saponine triterpénoïde « Bacopasaponine C », responsable de l'activité leishmanicide sur *L. donovani*, a été isolée (provoque la réduction *in-vivo* de 91% de la charge parasitaire lorsque administrée sous forme de microsphères) [349 ; 356 ; 357].

V. DISCUSSION GENERALE

Les études menées sur les métabolites secondaires des végétaux ont atteint, depuis ces 50 dernières années, de larges proportions parmi les travaux publiés. Ces molécules connues pour avoir un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement, représente également une importante source de composés bioactifs alimentant la recherche pharmaceutique, notamment [358 ; 359].

Dans notre travail expérimental, nous nous sommes intéressés à l'étude des éventuelles activités anti-leishmanienne et anti-oxydante des 06 extraits bruts et des 02 huiles essentielles, obtenus à partir des feuilles et inflorescences de la plante médicinale méditerranéenne *Globularia alypum* L.

Dans l'ensemble, la variabilité des résultats observée en fonction des solvants d'extraction utilisés illustre bien l'intérêt de notre démarche expérimentale dans l'extraction différentielle des métabolites secondaires par le recours à des solvants de nature physicochimique distincte (polarité, densité, point de fusion).

Les extraits étheriques des deux organes végétaux ont ainsi révélé les résultats les plus probants parmi les extraits et huiles essentielles testés pour leur activité leishmanicide, avec respectivement, des CI50 variant en fonction des cinq souches utilisées (*Leishmania major*-LIPA 100, *L. major*-LIPA32/06, *L. killicki*-LIPA281, *L. infantum*-LEM5285 et *L. donovani*-LDD8) de 55,9 à 24,8 µg/ml pour l'extrait des inflorescences et de 89,7 à 113 µg/ml concernant l'extrait des feuilles. La cytotoxicité de ces deux extraits a, par ailleurs, été évaluée en vue de la détermination de leurs indices de sélectivités respectifs. Le meilleur résultat obtenu étant celui de l'activité de l'extrait étherique des inflorescences avec un indice de sélectivité dépassant la valeur seuil de 10 sur la souche viscérale *L. donovani*-LDD8.

A l'inverse de nombreuses autres matières végétales, aucune étude antérieure n'a porté, à notre connaissance, un intérêt sur l'évaluation du potentiel anti-leishmanien des extraits propres aux *Globularia spp.*

Plusieurs composés phytochimiques, à effet leishmanicide variable, ont précédemment été identifiés chez respectivement plus d'une centaine d'espèces végétales. Ces composés, de structure chimique très diversifiée, sont notamment rattachés aux quinones, lignanes, alcaloïdes, chalcones, terpènes, iridoïdes, lipides, lactones, coumarines et aux flavonoïdes [143 ; 360 ; 361 ; 362].

Les résultats des tests qualitatifs, préliminairement réalisés durant notre étude phytochimique, nous ont permis de suggérer l'éventuelle présence de composés réducteurs et de flavonoïdes dans la composition des deux extraits étheriques de *G. alypum* L. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux de ces derniers, laisserait, à priori, supposer que leur activité leishmanicide ne serait pas en relation avec une éventuelle forte teneur en ces métabolites (12,37±0,78 mg EAG/g d'extrait de feuilles et 5,85±0,22 mg EAG/g d'extrait d'inflorescences).

L'analyse approfondie de ces mêmes extraits par l'application CG-SM, nous a permis d'identifier parmi les composés détectés la présence majoritaire d'acides gras estérifiés pour les deux organes végétaux étudiés ainsi que l' α -tocophérol dans l'extrait étherique des feuilles (EE.1) et le β -sitostérol dans celui des inflorescences (EE.2).

Des travaux menés sur des modèles *in vivo* et/ou *in vitro*, ont précédemment attribué à des acides gras insaturés une activité anti-protozoaire non négligeable [363 ; 364 ; 365 ; 366 ; 367]. Les acides gras linoléique et oléique (qui seraient respectivement présents dans l'extrait EE.1 et EE.2) ainsi que l'acide linoléique (rentrant dans la composition des deux extraits étheriques) exerceraient, à titre d'exemple, un effet inhibiteur sur la croissance de *Plasmodium falciparum* (4 μ g/ml \leq CI50 \leq 92 μ g/ml) [365 ; 366]. Kumaratilake *et al* (1992) ont, par ailleurs, observé que l'activité antimalariale des acides gras augmentait en fonction du degré d'insaturation de ces molécules. Ces mêmes auteurs suggèrent que les acides gras polyinsaturés seraient impliqués dans l'accroissement de la susceptibilité des parasites au stress oxydatif (par l'oxydation du glutathion) et/ou dans l'altération de des fonctions membranaires de ces derniers [367].

Tasdemir *et al.* (2007) rapportent une activité inhibitrice de l'acide palmitique (retrouvé dans l'extrait EE.1 et EE.2) et hexadécynoïque envers la croissance des amastigotes axéniques de *Leishmania donovani* (CI50= 4,1–14,5 µg/ml) [368] ; l'inhibition enzymatique de la voie de biosynthèse des acides gras pourrait être à l'origine de cette activité (Tasdemir 2010). L'acide 2-octadécynoïque aurait, quant à lui, un effet leishmanicide sur les amastigotes de *L. donovani* (CI50= 11,0 µM) par inhibition de l'ADN topoisomérase IB (CI50= 5,17 µM) [369].

Le β-sitosterol posséderait de même, selon Kirmizibekmez *et al.* (2011) [370], une activité anti-parasitaire (CI50= 35.4 µg/ml) vis-à-vis de *Trypanosoma cruzi* ; espèce apparentée à la même famille taxonomique que celle des *Leishmania spp.* (Trypanosomatidae). Les résultats de Nweze *et al.* (2011) ont également conduit à la conclusion d'un effet anti-trypanosomal de cette molécule, observé sur l'espèce *T. brucei* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 12,5 µg/ml [371].

Les huiles essentielles, testées en phase préliminaire de notre évaluation de l'activité antileishmanienne, ont exercé une inhibition de la croissance parasitaire variable en fonction des souches incubées à la concentration finale de 250 µg/ml ($p < 0,0001$). Le plus fort taux d'inhibition induit par l'huile essentielle des feuilles aurait été enregistré à l'issue du test mené sur la souche *L. major*-LIPA 32/06 (55% d'inhibition), tandis que le meilleur résultat pour l'huile essentielle des inflorescences serait celui de l'inhibition de la souche *L. major*-LIPA 100 (80,5% d'inhibition).

Parmi les composés identifiés à l'analyse chromatographique de nos huiles essentielles, l'α-pinène, le limonène, le terpinéol, le nérolidol, le thymol, l'eugénol, le naphthalène et l'acide palmitique possèderaient une activité leishmanicide [372 ; 373 ; 374 ; 375 ; 376 ; 377 ; 378].

S'agissant de l'évaluation du potentiel anti-radicalaire de la plante, les résultats obtenus sont caractérisés par une variabilité de réponses anti-oxydantes en fonction des extraits testés. Celle-ci serait associée, selon l'étude de la corrélation, à la teneur différentielle de ces derniers en composés phénoliques.

Une forte activité anti-oxydante a été observée à l'évaluation de l'extrait méthanolique des inflorescences. Celui-ci comporterait en sa composition des

mucilages, saponosides, des sucres réducteurs, des tannins, des flavonoïdes et la plus forte teneur en polyphénols totaux $186,21 \pm 0,22$ mg EAG/g d'extrait. L'indice exprimant son potentiel anti-radicalaire (IPAR) serait égal à $1,3 \pm 0,1$ [$\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}$]⁻¹. Tandis que l'IPAR de l'extrait étherique de cette même drogue végétale serait inférieur à $0,158$ [$\mu\text{g AO}/\mu\text{g DPPH}$]⁻¹.

La présence de l' α -tocophérol dans l'extrait étherique des feuilles ainsi que sa teneur en polyphénols totaux relativement supérieure à celui des inflorescences ($p=0,0002$) expliquerait vraisemblablement la différence de potentiel antioxydant remarquée entre ces deux extraits [377].

L'évaluation de la capacité anti-radicalaire de l'huile essentielle des feuilles et celle des inflorescences de *G. alypum* L. n'a été retrouvée dans aucune étude similaire publiée. A la comparaison de l'activité de ces deux huiles essentielles, celle extraite à partir des feuilles induirait un mécanisme de piégeage des radicaux libres plus marqué que celui des inflorescences (IPAR, respectivement égal à $0,07 \pm 0,01$ et $0,024 \pm 0,005$; $p < 0,0001$).

Les dissemblances de la composition chimique constatées à l'analyse par CG-SM de ces deux produits de l'hydrodistillation, expliquerait de ce fait la disparité des résultats.

Le 1-octène-3-ol, l'eugénol et le linalool, dont la présence est quantitativement plus importante dans la composition de l'huile essentielle des feuilles que celle des inflorescences, posséderaient une activité anti-oxydante remarquable [380 ; 381 ; 382 ; 383].

Un potentiel anti-radicalaire avéré a, de même, été rapporté pour le phytol [384], le β -ionone [385] et l' α -pinène [386], absents de la composition de l'huile essentielle extraite des inflorescences.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de recherche avait pour but l'étude phytochimique de l'espèce méditerranéenne *Globularia alypum* L. en relation avec ses deux potentiels antileishmanien et antioxydant évalués dans ce même travail expérimental.

A l'issue des procédures d'extractions des métabolites secondaires appliquées sur les feuilles et les inflorescences de la plante, six extraits bruts méthanoliques, étheriques et aqueux ainsi que deux huiles essentielles ont été obtenus.

Les résultats de l'évaluation *in-vitro* du potentiel anti-leishmanien de ces produits d'extraction, nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une activité leishmanicide avérée de l'extrait étherique des feuilles (EE.1), et en particulier celui des inflorescences (EE.2), sur les promastigotes de cinq isolats parasites : *Leishmania major*-LIPA 100, *L. major*-LIPA32/06, *L. killicki*-LIPA281, *L. infantum*-LEM5285 et *L. donovani*-LDD8. L'étude complémentaire de leur éventuelle cytotoxicité n'a révélé, quant à elle, aucune activité délétère sur les macrophages (cellules de lignée humaine Thp1 différenciées) aux concentrations testées ; ce qui nous renseignerait sur la nature sélective de la toxicité exercée par ces extraits.

S'agissant de l'étude de la capacité anti-oxydante de la plante, le plus remarquable résultat enregistré est celui de l'extrait méthanolique des inflorescences (EM.2) qui a révélé un fort potentiel anti-radicalaire aux essais de piégeage du radical libre diphényl-picrylhydrazyl (DPPH). Cette activité et celle des autres extraits testés seraient fortement corrélées aux quantités de polyphénols totaux rapportées dans ce travail.

Le criblage phytochimique préliminaire et l'analyse par l'application de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) nous a permis de caractériser la présence de famille de molécules et d'en identifier un certain nombre de composés bioactifs pouvant être en lien avec les résultats obtenus ; à l'exemple du phytostérol β -sitostérol retrouvé dans la composition de l'extrait EE.2 ou encore de l'eugénol dont la présence a été identifiée dans les huiles essentielles extraites.

Dans la limite de notre connaissance, aucun résultat précédemment publié n'a été rattaché à l'évaluation de l'activité anti-leishmanienne de *G. alypum* L., ni même celle de l'ensemble des membres taxonomiques du genre *Globularia*.

Ce même constat d'absence de résultats antérieurs, concerne pareillement, l'étude de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles extraites des deux organes végétaux étudiés ainsi que celle de l'extrait EE.2. Notre étude a mis au jour l'existence d'un potentiel anti-radicalaire de ces derniers, qui seraient, néanmoins, sensiblement faibles à leur comparaison aux extraits aqueux et méthanoliques de la plante.

En perspective à nos investigations expérimentales, le fractionnement successif des extraits ayant exercé une activité biologique intéressante et l'évaluation de leur potentiel sur des modèles *in-vitro* et/ou *in-vivo* pourrait, dans une étude complémentaire, menée à l'isolement et à l'identification des molécules responsables de cette même activité ou, éventuellement, mettre en relief l'existence d'un effet synergique d'un complexe de molécules bioactives.

Concernant les essais menés sur l'activité antileishmanienne des composés d'intérêt, le recours à la forme amastigote du parasite et/ou le passage au modèle *in vivo* permettra d'établir, dans une phase ultérieure, une évaluation cliniquement pertinente de l'activité en question.

L'étude pharmaco-toxicologique des molécules isolées ou complexes de molécules, serait également nécessaire à l'évaluation de leur intérêt pharmaceutique antileishmanien et/ou anti-oxydant.

ANNEXES

ANNEXE A

Liste des abréviations

Amb	Amphotéricine B
AO	Antioxydant
APG	Groupe de la phylogénétique des angiospermes (<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>)
ATCC	Centre de ressource biologiques américaine (<i>American Type Culture Collection</i>)
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
EA1	Extrait aqueux des feuilles
EA2	Extrait aqueux des inflorescences
EAG	Equivalent acide gallique
EE1	Extrait étherique des feuilles
EE2	Extrait étherique des inflorescences
EM1	Extrait méthanolique des feuilles
EM2	Extrait méthanolique des inflorescences
HE1	Huile essentielle des feuilles
HE2	Huile essentielle des inflorescences
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IPAR	Indice du potentiel anti-radicalaire
IS	Indice de sélectivité
IK	Indice de Kovats
LC	Leishmaniose cutanée
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse
LCL	Leishmaniose cutanée localisée
LCM	Leishmaniose cutanéomuqueuse
LGP	Lipophosphoglycane
LV	Leishmaniose viscérale

ANNEXE B

Tableau I : Synthèse des résultats des principales études phytochimiques antérieures menées sur les extraits de *Globularia alypum* L.

Composés identifiés	Familles moléculaires	Drogues végétales investiguées	Références
globularidine, globularimine, globularinine, globularicisine, globularine	Iridoides	Plante entière	[50 ; 387]
Liriodendrine	Lignane		
Syringine	Phénylpropanoïdes		
aucubine, aspéruloside	Iridoides	/	[51]
Globularioside	Iridoides	Partie aérienne de la plante	[74 ; 388 ; 389]
acide cinnamique, acide <i>p</i> -coumarique	Acides phénoliques		
syringine, 6'-O-coumaroyl-1'-O-[2-(3,4-dihydroxyphényl)éthyl]- β -D-glucopyranoside	Phénylpropanoïdes		
actéoside, isoactéoside, forsythiaside	Phényléthanoïdes		
lutéoline, apigénine, eriodictyol 7-O-sophoroside, 6-hydroxylutéoline 7-O- β -D-glucopyranoside, 6-hydroxylutéoline 7-O-laminaribioside, lutéoline 7-O-sophoroside	Flavonoïdes		
globularioside, globularidine, globularimine, globularinine, globularine, globularicisine, acide mussaenosidique, catalpol, acide loganique, ester méthylé d'acide aspérulosidique, déacétyl-aspéruloside, alpinoside, gardoside, acide géniposidique, verminoside, aucubine, lyanthosaline, specioside, shanzhiside, minécocide, 6-O-veratroyl catalpol, décumbeside, serratoside, acide coumaroyl géniposidique	Iridoides et secoiridoides	Feuilles	[390 ; 391 ; 392 ; 393 ; 394]

syringarésinol 4'-O-β-glucopyranoside	Lignane		
acide protocatéchique, acide <i>p</i> -coumarique, acide synapique, acide syringique, acide salicylique, acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide quinique, acide β-résorcylique, acide caféique, acide férulique, cafféoyl hexose, <i>p</i> -coumaroyl hexoside, O-hexoside d'acide sinapique, gentisoyl glycoside, hexoside d'acide tubéronique	Acides phénoliques et dérivés des acides phénoliques		
Syringine	Phénylpropanoïdes		
calcéolarioside, galypumoside, verbascoside, decafféoyl actéoside, globularitol, hebitol II, cornoside, néosyringalide	Phényléthanoïdes		
6-hydroxylutéoline, hydroxylutéoline-7-laminaribioside, 6-hydroxylutéoline 7-O-sophoroside, lutéoline-disaccharide, cynaroside, ériodictyol O-disaccharide, icariside, glucoside de quercétine, amurensine, phellamurine, népitrine	Flavonoïdes		
catalpol, aucubine	Iridoides	Fleurs	[393]
catalpol, aucubine	Iridoides	Tiges	
acide protocatéchique, acide <i>p</i> -coumarique, acide synapique, acide vanillique, acide salicylique, acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque, acide syringique, acide β-résorcylique, acide caféique, acide férulique,	Acides phénoliques		[392 ; 393]
acide protocatéchique, acide <i>p</i> -coumarique, acide synapique, acide vanillique, acide salicylique, acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque, acide syringique, acide β-résorcylique, acide caféique, acide férulique,	Acides phénoliques	Racines	[392 ; 393]

ANNEXE C

Tableau II : Synthèse des usages thérapeutiques traditionnels de *Globularia alypum* L.

Usages thérapeutiques	Parties utilisée de la plante	Préparations / Voies d'administration	Références
Purgatif	Partie aérienne, feuilles, racines	Infusion ou Décoction /Voie interne	[39 ; 59 ; 63 ; 395 ; 396 ; 397 ; 398]
Digestif	Feuilles, sommités fleuries	Infusion / Voie interne	[60 ; 395 ; 398 ; 399]
En cas d'anorexie	Feuilles	Infusion / Voie interne	[400]
En cas d'anémie	Feuilles, graines		[401]
En cas de goutte	Feuilles	Décoction / Voie interne	[52]
Hypocholestérolémiant	/	/	[63]
Cholagogue	Feuilles	Infusion orale	[395 ; 398 ; 401 ; 402]
Dépuratif	Feuilles, Fleurs	Décoction/ Voie interne	[39 ; 48 ; 403]
Hypoglycémiant	Partie aérienne, Feuilles, sommités fleuries	Infusion ou décoction /Voie interne	[60 ; 62 ; 63 ; 395 ; 396 ; 397 ; 403 ; 404 ; 405 ; 406 ; 407]
Antihypertensif	Partie aérienne, Feuilles	Décoction/ Voie interne	[61 ; 408]
Diurétique	Feuilles	Décoction /Voie interne	[39]
Sudorifique	Feuilles	Infusion ou décoction/Voie interne	[398 ; 402]
En cas de nervosité	Feuilles, graines	/	[399 ; 401]
Tonique	Feuilles	/	[39]
Aphrodisiaque	/	/	[409]
En cas de douleurs iliaques et dorsales	Partie aérienne, Feuilles	Décoction/Voie interne	[54 ; 410]
En cas de douleurs abdominales	Plante entière	Infusion	[411]
Antirhumatismal	Feuilles	Décoction /Voie interne	[39 ; 43 ; 52]
En cas d'hémorroïdes	Feuilles, Fleurs	/	[69]
En cas de céphalées	/	/	[405]

Fébrifuge	Partie aérienne, Feuilles	Décoction /Voie interne	[59 ; 396 ; 402]
En cas de gonorrhée	graines	Décoction / Voie externe	[39]
En cas d'aphtes et muguets	/	Décoction / Voie externe (en bain de bouche)	[39 ; 48]
En cas d'abcès	Feuilles	Décoction ou cataplasme / Voie externe	[63]
En cas d'angine	Feuilles	Décoction /Voie externe (gargarisme)	[39 ; 43]
En cas de bronchite chronique	Partie aérienne	Décoction / Voie interne	[39]
En cas de tuberculose	sommités fleuries	/	[39]
En cas d'ulcère gastrique	Feuilles	Décoction /Voie interne	[59 ; 63]
Antiseptique	Feuilles	Décoction / Voie externe	[39 ; 54]
Antipaludique	Sommité	Décoction /Voie interne	[412]
Antileishmanien	Sommité fleuries	Infusion ou décoction/Voie interne	[60]
Cicatrisante	Feuilles	Décocté .../Voie externe	[63]
Dermatoses : acné, mycose, eczéma, furoncle, ulcérations et affections du cuir chevelu	Plante entière, Partie aérienne, Feuilles, sommité fleuries	Décoction ou cataplasme / Voie externe	[60 ; 396 ; 62]
Cancer de la peau	Feuilles	Décoction / Voie externe	[63 ; 413]
Cancer du tube digestif	Feuilles	Voie interne	[63 ; 413]
En cas d'incontinence d'urinaire	/	/	[39]
Favorisation de la croissance	/	/	[39]

ANNEXE D

Liste du matériel non biologique utilisé aux laboratoires

- **Description visuelle et biométrique des drogues végétales**
 - Loupe binoculaire (Motic), balance de précision (Pioneer), vernier.
- **Préparation et conservation des huiles essentielles**
 - Clevenger (Pierron) ; Balance de précision ; Papier filtre Whatman (grade 1) ; Chauffe-ballons (Electromantle MA) ; Broyeur analytique (IKA A11 basic) ; Thermomètre ; Congélateur antigivre (Ocean), Sacs de congélation.
 - Verrerie : ballons, entonnoirs, béchers, viales.
- **Préparation et conservation des extraits bruts**
 - Soxhlet (Pierron) ; Broyeur analytique (IKA A11 basic) ; Balance de précision (Pioneer) ; Chauffe-ballons avec agitateur magnétique (Electromantle MA) ; Thermomètre ; Hotte chimique (Thermo-Scientific) ; Evaporateur rotatif (Buchi) ; Pompe à vide ; Lyophilisateur (Alpha 2-4 LSC plus, Martin Christ) ; Congélateur antigivre (Ocean).
 - Verrerie : ballons, entonnoirs, béchers, boîtes de Pétri, rampe de filtration, éprouvettes.
 - Consommable : cartouches poreuses cellulosiques, papier filtre Whatman (grade 1), microfiltres (0,45 µm), Parafilm, Sacs de congélation.
- **Dosage de la teneur en humidité**
 - Broyeur analytique (IKA A11 basic) ; Boîtes de Pétri ; Dessiccateur ; Balance de précision (Pioneer), Etuve (Mermmet).
- **Tests du criblage phytochimique préliminaire**
 - Balance de précision (Pioneer) ; Poire à pipeter ; plaque chauffante (Stuart) ; Hotte chimique (Thermo-Scientific).
 - Verrerie : fioles, entonnoirs, béchers, tubes à essai, pipettes Pasteur.
- **Détermination de la teneur des extraits bruts en composés phénoliques totaux**
 - Balance de précision (Pioneer) ; Micropipettes automatiques ; Hotte chimique (Thermo-Scientific) ; Spectrophotomètre (OptizenPOP, Mecasys).
 - Verrerie : fioles, entonnoirs, béchers, tubes à essai, éprouvettes.

- **Analyse chromatographique des huiles essentielles et extraits bruts**
 - Chromatographe (Hewlett-Packard, HP 6890) ; injecteur automatique (Agilent7683B) ; Détecteur sélectif de masse quadripôle (HP 5973) ; Colonne capillaire apolaire à 5 % phenyl-methylpolysilixane (HP-5 MS) ; Balance de précision (Pioneer) ; Verrerie.
- **Evaluation de l'activité antioxydante**
 - Balance de précision (Kern) ; Micropipettes automatiques ; Hotte chimique (Thermo-Scientific) ; lecteur spectrophotométrique de microplaque (PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories).
 - Verrerie : fioles, entonnoirs, béchers, éprouvettes.
 - Consommable : Microplaques 96 puits.
- **Evaluation de l'activité anti-leishmanienne**
 - Verrerie ; Micropipettes automatiques ; Pipeteur automatique ; Microscope optique (Motic) ; Microscope optique inversé (Motic AE 31) ; Hotte de type II (Faster BH-EN 2004) ; Bec Bunsen (Propangas) ; Bain-marie (Mettler) ; Incubateur (Mettler) ; Incubateur à CO₂ (Binder) ; Balance de précision (Kern) ; Autoclave ; Centrifugeuse (Sigma) ; Agitateur vortex (Velp Scientifica) ; Compteur manuel ; Cellule de Thoma,
 - Consommable : Microplaques stériles 96 puits à fond plat avec couvercle (Thermo-Scientific, Nunclon Delta Surface, CAT. No 167008), Parafilm, Tubes coniques stériles de 15 ml (Falcon), flacons de culture (Falcon), tubes Eppendorf, pipettes graduées stériles pour pipeteur automatique, pipettes Pasteur, embouts stériles pour micropipettes automatiques, filtres stériles de 0.22 µm, Lames, Lamelles.

ANNEXE E

Composition des milieux de culture

- **Milieu Novy-Mc Neal-Nicolle (NNN), IPA**
 - Bacto-Agar.....5 g
 - NaCl.....3 g
 - Eau distillée stérile.....500 ml
 - Sang de lapin.....10%

- **Milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Sigma Aldrich)**
 - Chlorure de calcium x 2H₂O 62,27 mg/l.
 - Chlorure de potassium.....400 mg/l.
 - Sulfate de magnésium anhydre.....69,77 mg/l.
 - Chlorure de sodium.....5950,49 mg/l.
 - Nitrate de sodium..... 72 mg/l
 - L'hydrogénophosphate de sodium anhydre800 mg/l
 - D(+)-Glucose anhydre2000 mg/l
 - L-Glutamine.....300 mg/l
 - L-Glutathion1 mg/l
 - L-Arginine x HCl241,86 mg/l
 - L-Asparagine x H₂O.....50 mg/l
 - L-Acide aspartique20 mg/l
 - L-Cystine50 mg/l
 - L-Acide glutamique20 mg/l
 - Glycine10 mg/l
 - L-Histidine base15 mg/l
 - L-Hydroxyproline.....20 mg/l
 - L-Isoleucine.....50 mg/l
 - L- Leucine50 mg/l
 - L-Lysine x HCl40 mg/l
 - L-Méthionine.....15 mg/l
 - L-Phénylalanine15 mg/l
 - L-Proline.....20 mg/l

- L-Serine.....	30 mg/l
- L-Thréonine.....	20 mg/l
- L-Tryptophane	5 mg/l
- L-Tyrosine	20 mg/l
- L-Valine	20 mg/l
- 4-Amino benzoïque acide.....	1 mg/l
- D(+)-Biotine	0,2 mg/l
- D-Pantothenate de calcium	0,25 mg/l
- Chlorure de choline	3 mg/l
- Acide folique	1 mg/l
- myo-Inositol.....	35 mg/l
- Nicotinamide	1 mg/l
- Pyridoxine x HCl.....	1 mg/l
- Riboflavine	0,2 mg/l
- Thiamine x HCl.....	1 mg/l
- Vitamine B12.....	0,005 mg/l
- Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (HEPES)	25 mM

ANNEXE F

Méthodes utilisées pour le dénombrement cellulaire par comptage direct

I. Dénombrement sur cellule de Thoma

- **Description du matériel**

La cellule correspond à une plaque, en verre optique spécial, à la taille d'une lame porte-objets. Celle-ci comporte un ou deux plateaux centraux sur lesquels un réseau de numération (zone de comptage) y est gravé : entrecroisement de lignes horizontales et verticales formant 16 grands carrés contenant chacun 16 petits carrés (figure I). Les côtés de chaque petit carré possèdent une longueur de 0,05 mm, tandis que sa profondeur est de 0,1mm (volume égale à $2,5 \times 10^{-7}$ ml).

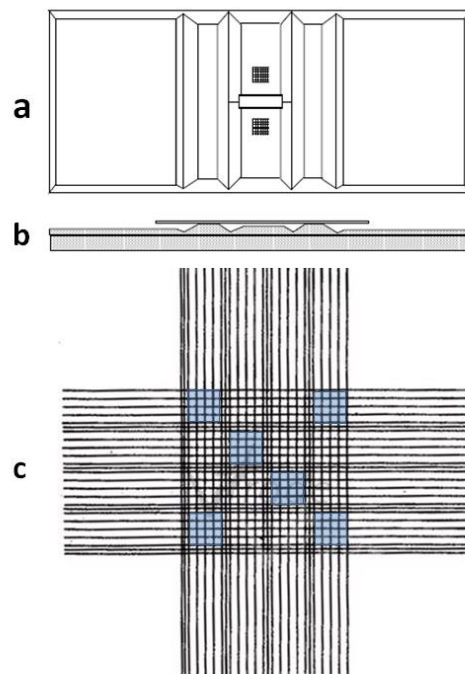


Figure I : représentation schématique de la cellule de Thoma. a : cellule représentée de face, b : cellule représentée de profile, c : représentation du réseau de numération.

- **Procédure**

- Homogénéiser de la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette automatique ;

- Déposer, au bord de la lamelle recouvrant la zone de dénombrement, un petit volume de la suspension cellulaire de manière à ce que cette dernière pénètre (par capillarité) dans l'espace délimitée par les rigoles du plateau central de la cellule de Thoma.
- Laisser un temps de décompter les cellules (environ 10 min).
- Dénombrer les cellules contenues dans les grands carrés du réseau de numération selon une procédure préétablie : le dénombrement est effectué sur les six grands carrés représentés en bleu sur la figure I ; le comptage inclus les cellules situées à l'intérieur des lignes délimitant la surface du grand carré et celles touchant la ligne du haut et de droite, tandis que les cellules touchant la ligne du bas et celle de gauche ne sont pas comptabilisées.
- Rendre le résultat en appliquant la formule prenant en compte le facteur de dilution, le volume et le nombre de carrés dénombrés :

$$\text{Concentration cellulaire} = (\text{Nombre de cellules} / 6) \times 16 \times (1/\text{dilution}) \times 10^4$$

cellules/ml.

II. Dénombrement sur microplaque par l'utilisation du microscope photonique inversé

- Insérer le quadrillage de 1 cm² dans l'oculaire du microscope photonique inversé,
- Compter le nombre de cellules vivantes (blanches) et mortes (bleues) sur le quadrillage entier et compter 3 champs/puits.

Formule du comptage des cellules:

$$\text{Nombre de cellules/puits} = \text{moyenne des trois champs} \times \text{Gr}^2 \times \text{surface du puits}$$

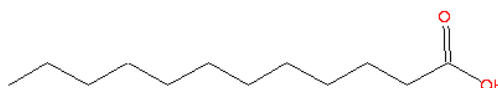
(cm²)

ANNEXE G

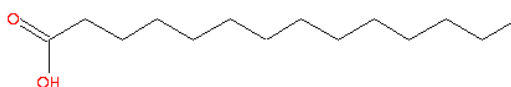
Structure chimique des composés identifiés par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Seuls les composés majoritaires, ou ayant été précédemment identifiés pour avoir une activité biologique en lien avec nos résultats, sont concernés par cette annexe. Les composés sont classés par ordre alphabétique :

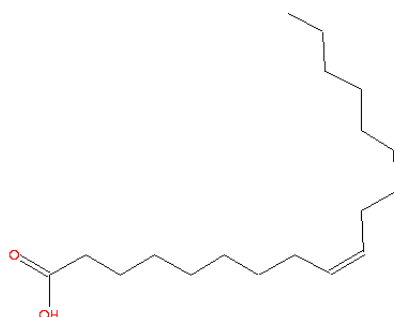
- **Acide laurique** ($C_{12}H_{24}O_2$; Numéro de CAS : 143-07-7)



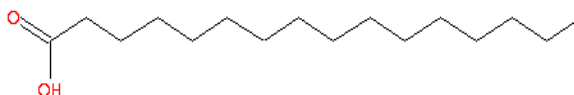
- **Acide myristique** ($C_{14}H_{28}O_2$; Numéro de CAS : 544-63-8)



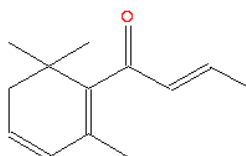
- **Acide linoléique** ($C_{18}H_{32}O_2$; Numéro de CAS : 60-33-3)



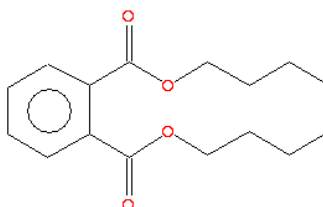
- **Acide palmitique** ($C_{16}H_{32}O_2$; Numéro de CAS : 57-10-3)



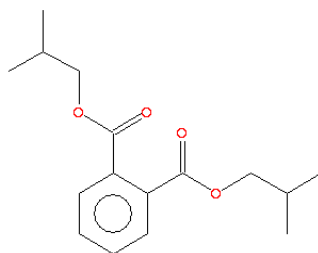
- **(E)-β-damascenone** ($C_{13}H_{18}O$; Numéro de CAS : 23726-93-4)



- **Dibutylphthalate** ($C_{16}H_{22}O_4$; Numéro de CAS : 84-74-2)



- **Diisobutylphthalate** ($C_{16}H_{22}O_4$; Numéro de CAS : 84-69-5)



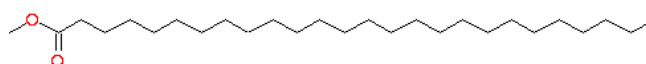
- **Ester méthylique de l'acide arachidique** ($C_{21}H_{42}O_2$; N° de CAS : 1120-28-1)



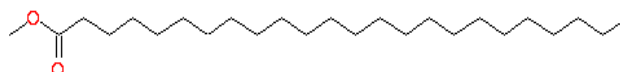
- **Ester méthylique de l'acide béhénique** ($C_{23}H_{46}O_2$; N° de CAS : 929-77-1)



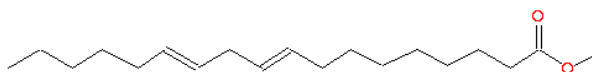
- **Ester méthylique de l'acide cérotique** ($C_{27}H_{54}O_2$; N° de CAS : 5802-82-4)



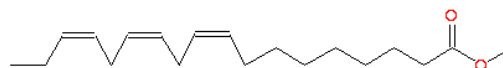
- **Ester méthylique de l'acide lignocérique** ($C_{25}H_{50}O_2$; N° de CAS : 2442-49-1)



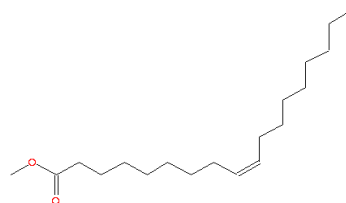
- **Ester méthylique de l'acide 9,12-octadécadiénoïque** ($C_{19}H_{34}O_2$; Numéro de CAS : 2462-856-3)



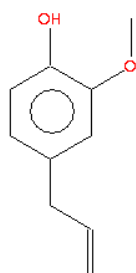
- **Ester méthylique de l'acide (Z,Z,Z) 9,12,15-octadécatriénoïque** ($C_{19}H_{32}O_2$; Numéro de CAS : 301-00-8)



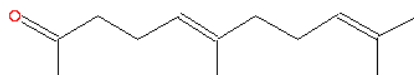
- **Ester méthylique de l'acide (Z) 9-octadécénoïque** ($C_{19}H_{36}O_2$; N° de CAS : 112-62-9)



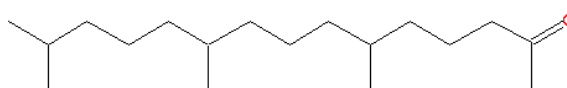
- **Eugénol** ($C_{10}H_{12}O_2$; Numéro de CAS : 97-53-0)



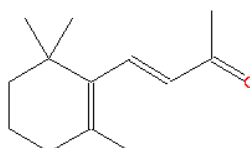
- **Geranyl acétone** ($C_{13}H_{22}O$; Numéro de CAS : 3796-70-1)



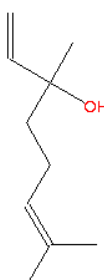
- **Hexahydrofarnesyl acétone** ($C_{18}H_{36}O$; Numéro de CAS : 502-69-2)



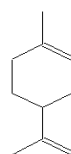
- **β -ionone** ($C_{13}H_{20}O$; Numéro de CAS : 14901-07-6)



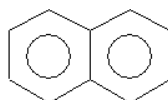
- **Linalool** ($C_{10}H_{18}O$; Numéro de CAS : 78-70-6)



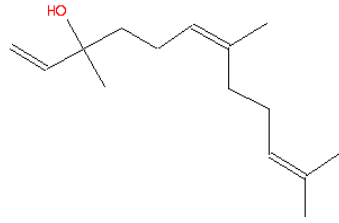
- **Limonène** ($C_{10}H_{16}$; Numéro de CAS : 138-86-3)



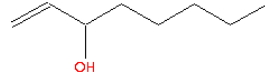
- **Naphtalène** ($C_{10}H_8$; Numéro de CAS : 91-20-3)



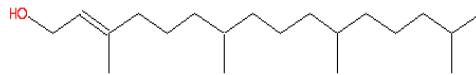
- **Nerolidol** ($C_{15}H_{26}O$; Numéro de CAS : 142-50-7)



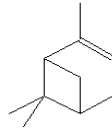
- **1-octene-3-ol** (C₈H₁₆O ; Numéro de CAS : 3391- 86- 4)



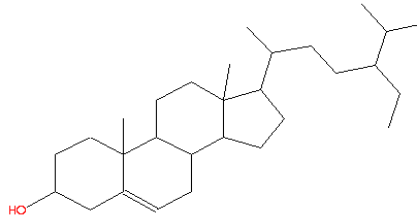
- **Phytol** (C₂₀H₄₀O)



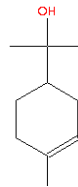
- **α- pinène** (C₁₀H₁₆ ; Numéro de CAS : 80-56-8)



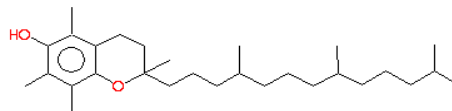
- **β- sitosterol** (C₂₉H₅₀O ; Numéro de CAS : 83-46-5)



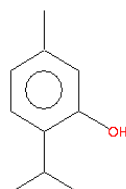
- **Terpinéol** (C₁₀H₁₈O ; Numéro de CAS : 83-46-5)



- **α- tocophérol** (C₂₉H₅₀O₂ ; Numéro de CAS : 59-02-9)



- **Thymol** (C₁₀H₁₄O ; Numéro de CAS : 89-83-8)



ANNEXE H

Tableau III : Résultats du criblage préliminaire des extraits vis-à-vis de leur activité leishmanicide.

Drogues	Molécules et complexes de molécules testés	Codes	Pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire (%)				
			<i>L. major</i> (LIPA 100)	<i>L. major</i> (LIPA 32/06)	<i>L. killicki</i> (LIPA 281)	<i>L. infantum</i> (LEM 5285)	<i>L. donovani</i> (LDD 8)
			m [IC95]	m [IC95]	m [IC95]	m [IC95]	m [IC95]
Feuilles	Huile essentielle	HE.1	26,0 [15,6 – 36,5]	55 [43,6 – 66,4]	2,6 [-5,7 – 10,9]	5,6 [-10,3 – 21,5]	11,6 [3,6 – 19,8]
	Extrait aqueux	EA.1	23,6 [14,4 – 32,7]	2,1 [-14,2 – 18,5]	-2,5 [-19,9 – 14,8]	22,6 [10,8 – 34,5]	41,9 [32,8 – 51,0]
	Extrait méthanolique	EM.1	29,6 [20,8 – 38,4]	1,4 [-15,0 – 21,7]	15,3 [-2,9 – 33,5]	39,6 [27,5 – 51,7]	56,6 [48,8 – 64,4]
	Extrait étherique	EE.1	100 [95,8 – 100]	100 [95,5 – 100]	100 [95,9 – 100]	100 [94,0 – 100]	100 [96,8 – 100]
Fleurs	Huile essentielle	HE.2	80,5 [75,1 – 85,8]	21,2 [6,2 – 36,3]	3,7 [-4,6 – 12,0]	-8,0 [-22,8 – 6,7]	-3,3 [-13,4 – 6,8]
	Extrait aqueux	EA.2	9,2 [-0,8 – 19,2]	0,9 [-18,1 – 20,0]	13,3 [-5,2 – 31,7]	57,9 [47,8 – 67,9]	31,9 [20,5 – 43,2]
	Extrait méthanolique	EM.2	35,2 [25,5 – 45,0]	2,9 [-15,0 – 17,9]	32,6 [18,6 – 46,7]	60,4 [51,9 – 68,8]	56,6 [48,8 – 64,4]
	Extrait étherique	EE.2	100 [95,8 – 100]	100 [95,5 – 100]	100 [95,9 – 100]	100 [94,0 – 100]	100 [96,8 – 100]
/	Amphotericine B	AmB	100 [95,8 – 100]	100 [95,5 – 100]	100 [95,9 – 100]	100 [94,0 – 100]	100 [96,8 – 100]
	Diméthyl sulfoxyde	DMSO	1,3 [-8,7 – 11,2]	0,8 [-15,7 – 14,2]	2,1 [-9,3 – 11,4]	-1,8 [-19,1 – 15,5]	-3,2 [-11,5 – 5,1]

Diméthyl sulfoxyde (0,3%)

ANNEXE I

Résultats de l'analyse statistique des données

- **Comparaison des rendements d'extraction**
 - **Test effectué** : analyse de la variance à un facteur (ANOVA).
 - **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
 - **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Extraits comparés	Moyenne de la différence	Signification statistique
HE2 ; HE1	-0,0080	NS
HE2 ; EE1	-2,705	**
HE2 ; EE2	-1,325	NS
HE2 ; EA2	-37,47	***
HE2 ; EA1	-48,33	***
HE2 ; EM1	-52,00	***
HE2 ; EM2	-45,13	***
HE1 ; EE1	-2,697	***
HE1 ; EE2	-1,317	NS
HE1 ; EA2	-37,46	***
HE1 ; EA1	-48,32	***
HE1 ; EM1	-51,99	***
HE1 ; EM2	-45,12	***
EE1 ; EE2	1,380	NS
EE1 ; EA2	-34,77	***
EE1 ; EA1	-45,62	***
EE1 ; EM1	-49,30	***
EE1 ; EM2	-42,43	***
EE2 ; EA2	-36,15	***
EE2 ; EA1	-47,00	***
EE2 ; EM1	-50,68	***
EE2 ; EM2	-43,81	***
EA2 ; EA1	-10,86	***
EA2 ; EM1	-14,53	***
EA2 ; EM2	-7,660	***
EA1 ; EM1	-3,675	***
EA1 ; EM2	3,195	**
EM1 ; EM2	6,870	***

NS : différence non significative, * : différence significative, ** : différence très significative, *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Données de la corrélation relatives à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

R de Pearson :

0,9999

Intervalle de confiance à 95% :	0.9988 à 1.000
R ² :	0,9997
Valeur- <i>P</i> (test t ; significativité de la pente) :	<i>P</i> <0.0001
Signification statistique de la valeur- <i>P</i> :	Différence hautement significative ($\alpha=0.05$)

- **Comparaison de l'ensemble des teneurs en polyphénols totaux des extraits**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-*P*** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
- **Comparaison des teneurs en polyphénols totaux par nature d'extrait**
 - **Test effectué** : Test t de Student ; comparaison opérée deux à deux.

Extraits comparés	ddl	t	<i>P</i>	Signification statistique
EA1 ; EA2	4	33,09	$p < 0,0001$	***
EM1 ; EM2	4	42,17	$p < 0,0001$	***
EE1 ; EE2	4	13,93	$p = 0,0002$	***

ddl : degrés de liberté , *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Signification statistique des résultats portée sur les colonnes de l'histogramme relatif aux teneurs en polyphénols totaux**
 - **Test effectué** : Test t de Student (comparaison unicaudal avec une moyenne théorique égale à 0.00)

Extrait objet du dosage	ddl	t	<i>P</i>	Signification statistique
EA1	2	520,9	$p < 0,0001$	***
EA2	2	541,8	$p < 0,0001$	***
EM1	2	221,7	$p < 0,0001$	***
EM2	2	3624	$p < 0,0001$	***
EE1	2	69,11	$p = 0,0002$	***
EE2	2	113,8	$p < 0,0001$	***

ddl : degrés de liberté , *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Données de la corrélation relatives à la courbe de calibration du DPPH**

R de Pearson :	0,9999
Intervalle de confiance à 95% :	0.9996 à 1.000

R²: 0,9999
 Valeur-*P* (test t ; significativité de la pente) : *P*<0.0001
 Signification statistique de la valeur-*P* : Différence hautement significative
 ($\alpha=0.05$)

- **Comparaison des résultats de l'activité anti-oxydante des produits d'extraction**

- **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
- **Valeur-*P*** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
- **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Extraits comparés	Moyenne de la différence	Signification statistique
EA1 vs EA2	8,150	NS
EA1 vs EM1	9,190	NS
EA1 vs EM2	28,25	***
EA1 vs vit C	54,08	***
EA2 vs EM1	1,040	NS
EA2 vs EM2	20,10	***
EA2 vs vit C	45,93	***
EM1 vs EM2	19,06	***
EM1 vs vit C	44,89	***
EM2 vs vit C	25,83	***

NS : différence non significative, * : différence significative, ** : différence très significative, *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Comparaison du résultat de l'activité anti-oxydante de l'extrait EM.1 avec celui obtenu par Amessis-Ouchemoukh *et al.***
 - **Test effectué** : Test t de Student.
 - **Valeur-*P*** : 0,5035 (différence non significative, $\alpha=0.05$).
- **Comparaison du résultat de l'activité anti-oxydante de l'extrait EM.2 avec celui obtenu par Amessis-Ouchemoukh *et al.***
 - **Test effectué** : Test t de Student.
 - **Valeur-*P*** : 0,0014 (différence très significative, $\alpha=0.05$).
- **Comparaison du résultat de l'activité anti-oxydante de l'extrait EE.1 avec celui obtenu par Khlifi *et al.***
 - **Test effectué** : Test t de Student.
 - **Valeur-*P*** : 0,1211 (différence non significative, $\alpha=0.05$).

- **Comparaison du résultat de l'activité anti-oxydante de l'extrait EA.2 avec celui obtenu par Rached *et al.***
 - **Test effectué** : Test t de Student.
 - **Valeur-P** : 0,1205 (différence non significative, $\alpha=0.05$).
- **Comparaison des paramètres de la croissance des souches leishmaniennes en milieu RPMI**
 - **Taux de croissance spécifique maximaux**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
 - **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
L. major (lipa 100) ; L. major (lipa 32/06)	-0,0130	NS
L. major (lipa 100) ; L. killicki	-0,0480	***
L. major (lipa 100) ; L. infantum	-0,0910	***
L. major (lipa 100) ; L. donovani	-0,0810	***
L. major (lipa 32/06) ; L. killicki	-0,0350	**
L. major (lipa 32/06) ; L. infantum	-0,0780	***
L. major (lipa 32/06) ; L. donovani	-0,0680	***
L. killicki ; L. infantum	-0,0430	***
L. killicki ; L. donovani	-0,0330	**
L. infantum ; L. donovani	0,01000	NS

NS : différence non significative, ** : différence très significative, *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Concentrations à confluence maximale des cultures**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
 - **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
L. major (lipa 100) ; L. major (lipa 32/06)	1,300	**
L. major (lipa 100) ; L. killicki	-2,000	***
L. major (lipa 100) ; L. infantum	-15,10	***
L. major (lipa 100) ; L. donovanoi	-10,50	***
L. major (lipa 32/06) ; L. killicki	-3,300	***
L. major (lipa 32/06) ; L. infantum	-16,40	***
L. major (lipa 32/06) ; L. donovanoi	-11,80	***
L. killicki ; L. infantum	-13,10	***
L. killicki ; L. donovanoi	-8,500	***

L. infantum ; L. donovani 4,600 ***

** : différence très significative, *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Comparaison des résultats d'inhibition parasitaire obtenus lors du criblage préliminaire antileishmanien**

- **Test effectué** : ANOVA à deux facteurs.
- **Table d'ANOVA**

Source de la variance	ddl	SCE	Variance	F	Valeur-P
Interaction	28	48920	1747	35,14	< 0,0001
Produits d'extraction testés	7	178100	25450	511,8	< 0,0001
Souches parasitaires	4	8650	2163	43,49	< 0,0001
Résiduelle	120	5967	49,72		

ddl : degrés de liberté, SCE : sommes des carrées des écarts.

- **Interprétation de la signification statistique**

- Interprétation de l'interaction : les produits d'extraction ont un effet inhibiteur différent (différence hautement significative) selon les souches ;
- Différence des résultats hautement significative selon les produits d'extraction testés ;
- Différence des résultats hautement significative selon les souches parasitaires.

- **Signification statistique des résultats portée sur les colonnes de l'histogramme relatif au criblage préliminaire antileishmanien**

- **Test effectué** : Test t de Student (comparaison unicaudal avec une moyenne théorique égale à 0.00)

Echantillons	<i>L. major-</i> lipa 100	<i>L. major-</i> lipa 32.06	<i>L. killicki</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>
HE1	$p=0,0037$	$p=0,0060$	$p=0,3934$	$p=0,3451$	$p=0,0193$
EA1	$p=0,0039$	$p=0,7116$	$p=0,6792$	$p=0,0089$	$p=0,0007$
EM1	$p=0,0018$	$p=0,8408$	$p=0,0758$	$p=0,0019$	$p=0,0002$
EE1	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
HE2	$p<0,0001$	$p=0,0207$	$p=0,2513$	$p=0,1845$	$p=0,3757$
EA2	$p=0,0615$	$p=0,8906$	$p=0,1055$	$p=0,0004$	$p=0,0029$
EM2	$p=0,0014$	$p=0,5828$	$p=0,0051$	$p=0,0002$	$p=0,0002$
EE2	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
AmB	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
DMSO	$p=0,7049$	$p=0,8617$	$p=0,5253$	$p=0,7629$	$p=0,3084$

- **Comparaison entre les CI50 relatives à l'extrait EE.1**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-P** : $p = 0,0759$ (différence non significative, $\alpha = 0.05$).
- **Comparaison entre les CI50 relatives à l'extrait EE.2**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha = 0.05$).
 - **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
<i>L. major</i> lipa 100 ; <i>L. major</i> lipa 32.06	-18,00	***
<i>L. major</i> lipa 100 ; <i>L. killicki</i>	-27,80	***
<i>L. major</i> lipa 100 ; <i>L. infantum</i>	-17,80	***
<i>L. major</i> lipa 100 ; <i>L. donovani</i>	3,300	NS
<i>L. major</i> lipa 32.06 ; <i>L. killicki</i>	-9,800	***
<i>L. major</i> lipa 32.06 ; <i>L. infantum</i>	0,2000	NS
<i>L. major</i> lipa 32.06 ; <i>L. donovani</i>	21,30	***
<i>L. killicki</i> ; <i>L. infantum</i>	10,00	***
<i>L. killicki</i> ; <i>L. donovani</i>	31,10	***
<i>L. infantum</i> ; <i>L. donovani</i>	21,10	***

NS : différence non significative, *** : différence hautement significative ($\alpha = 0.05$).

- **Comparaison des CI50 relatifs aux extraits et au témoin positif par souche parasitaire testée**
 - **Souche *L. major*-LIPA100**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha = 0.05$).
 - **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
EE1 ; EE2	67,30	***
EE1 ; AMB	95,11	***
EE2 ; AMB	27,81	***

*** : différence hautement significative ($\alpha = 0.05$).

- **Souche *L. major*-LIPA32.06**
 - **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
 - **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha = 0.05$).
 - **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
EE1 ; EE2	53,50	***
EE1 ; AMB	98,70	***
EE2 ; AMB	45,20	***

*** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

○ **Souche *L. killicki***

- **Test effectué** : ANOVA à un facteur. .
- **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
- **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
EE1 ; EE2	45,90	***
EE1 ; AMB	101,3	***
EE2 ; AMB	55,44	***

*** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

○ **Souche *L. infantum***

- **Test effectué** : ANOVA à un facteur. .
- **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
- **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
EE1 ; EE2	67,10	***
EE1 ; AMB	112,4	***
EE2 ; AMB	45,34	**

** : différence très significative, *** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

○ **Souche *L. donovani***

- **Test effectué** : ANOVA à un facteur.
- **Valeur-P** : $p < 0,0001$ (différence hautement significative, $\alpha=0.05$).
- **Test post-hoc** : Test de Tukey pour la comparaison multiple.

Souches comparées	Moyenne de la différence	Signification statistique
EE1 ; EE2	64,90	***
EE1 ; AMB	89,47	***
EE2 ; AMB	24,57	***

*** : différence hautement significative ($\alpha=0.05$).

- **Signification statistique des résultats relatif à l'activité cytotoxique des extraits EE.1 et EE.2**

- **Test effectué** : Test t de Student (comparaison unicaudal avec une moyenne théorique égale à 100.00%).

- **Extrait EE1**

Concentration de l'extrait	t	P	Signification statistique
25 µg/ml	0,7249	$p = 0,5438$	NS
50 µg/ml	0,06207	$p = 0,9562$	NS
100 µg/ml	1,891	$p = 0,1991$	NS
150 µg/ml	1,050	$p = 0,4039$	NS
200 µg/ml	0,1974	$p = 0,8618$	NS
250 µg/ml	1,936	$p = 0,1925$	NS

NS : différence non significative, ($\alpha=0.05$).

- **Extrait EE2**

Concentration de l'extrait	t	P	Signification statistique
25 µg/ml	0,8198	$p = 0,4985$	NS
50 µg/ml	1,461	$p = 0,2815$	NS
100 µg/ml	0,2684	$p = 0,8135$	NS
150 µg/ml	1,154	$p = 0,3678$	NS
200 µg/ml	0,0113	$p = 0,9920$	NS
250 µg/ml	0,6494	$p = 0,5827$	NS

NS : différence non significative, ($\alpha=0.05$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Liu, L., Bestel, S., Shi, J., Song, Y., Chen, X., "Paleolithic human exploitation of plant foods during the last glacial maximum in North China", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 110, n° 14, (2013), 5380 - 5385.
2. Lietava, J., "Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV?", *Journal of ethnopharmacology*, V. 35, n° 3, (1992), 263 - 266.
3. Yesilada, E., "Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 100, n° 1, (2005), 135 - 137.
4. Thatoi, H., Patra, J.K., "Biotechnology and pharmacological evaluation of medicinal plants: an overview". *Journal of herbs, spices and medicinal plants*, V.17, n° 3, (2011), 214 - 248.
5. Organisation Mondiale de la Santé, "Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle 2014–2023", Organisation Mondiale de la Santé, (2013), 75 p.
6. Schmidt, T.J., Khalid, S.A., Romanha, A.J., Alves, T., Biavatti, M.W., Brun, R., Lago, J.H.G., Leon, L.L., Lopes, N.P., Amorim, R.C.N., Niehues, M., Ogungbe, I.V., Pohlit, A.M., Scotti, M.T., Setzer, W.N., Soeiro, M.N.C., Steindel, M., Tempone, A.G., "The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases–Part I", *Current Medicinal Chemistry*, V. 19, n° 14, (2012), 2128 - 2175.
7. Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirscha, V.M., Stuppner, H., Rollinger, J.M., "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review", *Biotechnology advances*, V. 33, n° 8, (2015), 1582 - 1614.
8. Morel, S., "Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae)", Thèse de doctorat, Université d'Angers, (2011).

9. Katiyar, C., Gupta, A., Kanjilal, S., Katiyar, S., "Drug discovery from plant sources: An integrated approach", *International quarterly journal of research in Ayurveda*, V. 33, n° 1, (2012), 10 - 19.
10. González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Paraskeva-Hadijchambi, D., "Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 116, n° 2, (2008), 341 - 357.
11. Touaibia, M., Chaouch, F.Z., "Global chemical composition and antioxidative effect of the ethanol extracts prepared from *Globularia alypum* leaves", *Nature and Technology*, V. 14, n°2, (2016), 2 - 6.
12. Cronquist, A., "The Evolution and Classification of Flowering Plants- Edition 2", New York Botanical Garden, (1988), 555 p.
13. Quézel, P., Santa, S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", V. 2, Editions du Centre National de la Recherche scientifique, (1963), 1170 p.
14. The angiosperm phylogeny group, "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG II", *Botanical Journal of the Linnean Society*, V. 141, n°4, (2003), 399 - 436.
15. The angiosperm phylogeny group, "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.
16. Bremer, B., Bremer, K., Heidari, N., Erixon, P., Olmstead, R.G., Anderberg, A.A., Kallersjo, M., Barkhordarian, E., "Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, V. 24, n° 2, (2002), 274 - 301.
17. Kadereit, J.W., "Flowering Plants- Dicotyledons : Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)", Springer Science and Business Media, (2012), 478 p.
18. Datta, S.C., "Systematic Botany", New Age International, (1988), 653 p.
19. Jauzein, P., Nawrot, O., "Flore d'Île-de-France : Clés de détermination, taxonomie, statuts", Editions Quae, (2013), 608 p.

20. Albach, D.C., Meudt, H.M., Oxelman, B., "Piecing together the "New" Plantaginaceae", *American Journal of Botany*, V. 92, n°2, (2005), 297 - 315.
21. Tank, D.C., Beardsley, P.M., Kelchner, S.A., "Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition", *Australian Systematic Botany*, V. 19, n° 4, (2006), 289 - 307.
22. Botineau, M., "Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs", Lavoisier, (2010), 1403 p.
23. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P., "Botanique systématique : Une perspective phylogénétique", De Boeck Supérieur, (2002), 467 p.
24. Oxelman, B., Kornhall, P., Olmstead R.G., Bremer, B., "Further disintegration of Scrophulariaceae", *Taxon*, V. 54, n° 2, (2005), 411 - 425.
25. Duran, A., Çetin, Ö., Öztürk, M., "*Globularia anatolica* sp. nov. (Globulariaceae) from the Honaz Mountain National Park, southwest Turkey", *Nordic Journal of Botany*, V. 27, n° 3, (2009), 232 - 237.
26. Bramwell, D., Kunkel, G., "A new species of *Globularia* (*Globulariaceae*) from the Canary Islands", *Cuadernos de Botanica Canaria*, V. 22, (1974), 15 - 17.
27. Strid, A., Tan, K., "Mountain Flora of Greece", Edinburgh University Press, (1986), 1008 p.
28. Planchon, G., "Des globulaires au point de vue botanique et médicale", Nabu Press, (2012), 74 p.
29. Guittonneau, G.G., Huon, A., "Connaitre et reconnaitre la flore et la végétation méditerranéennes", Ouest-France, (1992), 331 p.
30. Oran, S.A., Kochkar, N., Raies, A., "Biosystematics of the genus *Globularia* L. in Jordan and Tunisia", *Dirasat*, V. 26, n° 2, (1999), 203 - 210.
31. Beniston, N.T., Beniston, W.S., "Fleurs d'Algérie", Entreprise Nationale du Livre, (1984), 359 p.
32. Rameau, J.C., Mansion, D., Dumé, G., "Flore forestière française : Région méditerranéenne", Forêt privée française, (2008), 2426 p.
33. Trabut, L., "Précis de Botanique Médicale, Ed.1898", Hachette Livre, (2012), 750 p.
34. Martin, P., "Familles des plantes à fleurs d'Europe : Botanique systématique et utilitaire", Presses universitaires de Namur, (2014), 292 p.

35. Llorens, L., Penuelas, J., Estiarte, M., "Ecophysiological responses of two Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*, to experimentally drier and warmer conditions", *Physiologia Plantarum*, V. 119, n° 2, (2003), 231- 243.
36. Llorens, L., Penuelas, J., "Experimental evidence of future drier and warmer conditions affecting flowering of two co-occurring mediterranean shrubs", *International Journal of Plant Sciences*, V. 166, n° 2, (2005), 235 - 245.
37. Prieto, P., Penuelas, J., Ogaya, R., Estiarte, M., "Precipitation-dependent flowering of *Globularia alypum* and *Erica multiflora* in mediterranean shrubland under experimental drought and warming, and its inter-annual variability", *Annals of botany*, V. 102, n° 2, (2008), 275 - 285.
38. UNESCO, "Medicinal plants of the arid zones", UNESCO, (1960), 96 p.
39. Ait Youssef, M., "Plantes médicinales de Kabylie", Ibis Press, (2006), 349 p.
40. Goodall, D.W., Perry, R.A., "Arid Land Ecosystems : Volume 2, Structure, Functioning and Management", Cambridge University Press, (2009), 624 p.
41. Mejstrik, V.K., Cudlin, P., "Mycorrhiza in some plant desert species in Algeria", *Plant and Soil*, V. 71, n° 1, (1983), 363 - 366.
42. Ladier, J., Boisseau, B., "Typologie des stations forestières du massif Sainte-Victoire", QUAE, (1994), 279 p.
43. Boukef, M.K., "Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne", Agence de coopération culturelle et technique, (1986), 350 p.
44. <http://www.iucnredlist.org/> (page consultée le 25 décembre 2016).
45. Premier Ministère, "Décret exécutif n° 12-03 du 10 Safar 1433 correspondant au 4 janvier 2012 fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées", *Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire*, n°03 du 18 janvier 2012, 12 – 39.
46. Hegnauer, R., "Chemotaxonomie der Pflanzen ; eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Dicotyledoneae : Daphniphyllaceae - Lythraceae", V. 4, Birkhäuser Verlag, (1966), 551 p.
47. Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S., "Polyphenols in Human Health and Disease", Academic Press, (2013), 1488 p.
48. Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., "Plantes toxiques a usage médicinal du pourtour méditerranéen", Springer, (2013), 393 p.

49. Ramdani, M., Lograda, T., Ounoughi, A., Chalard, P., Figueredo, G., Laidoudi, H., Elkolli, M., "Chemical composition, Antimicrobial activity and chromosome number of *Globularia alypum* from Algeria", International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, V. 3, n° 7, (2014), 306 - 318.
50. Chaudhuri, R.K., Sticher, O., "New Iridoid Glucosides and a Lignan Diglucoside from *Globularia alypum* L.", Helvetica Chimica Acta, V. 64, n° 1, (1981), 3 - 15.
51. Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R., "Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae", Phytochemistry, V. 67, n° 3, (2006), 286 - 301.
52. Fournier, P.V., "Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France", Omnibus, (2010), 1047 p.
53. Barhouchi, B., Aouadi, S., Abdi, A., "Determination of eugenol and its derivative isoeugenol in *Globularia alypum* using solvent system extraction and comparative study of their antioxidant activities with various oxidation conditions", Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, V. 6, n°12, (2014), 776 - 784.
54. Leclerc, L., "Rachef Er-roumouz (révélation des énigmes) d'Abd Er-Rezzaq Ed-Djezaïry", Baillière, (1874), 396 p.
55. Couplan, F., "Les plantes et leurs noms: histoires insolites", QUAE, (2012), 223 p.
56. Valiakos, E., Marselos, M., Sakellaridis, N., Constantinidis, T., Skaltsa, H., "Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the "Antidotes" in Nikolaos Myrepsos' Dynameron", Journal of ethnopharmacology, V. 163, (2015), 68 - 82.
57. Mahmoudi, Y., "La thérapeutique les plantes les plus communes en Algérie", Editions Anes, (1982), 130 p.
58. Miara, M.D., Ait Hammou, M., Hadjadj Aoul, S., "Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tيارت (Algérie)", Phytothérapie, V. 11, n° 4, (2013), 206 - 218.
59. Leporatti, M.L., Ghedira, K., "Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia", Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, V. 5, n° 1, (2009), 1.

60. Boudjelal, A., HENCHIRI, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., "Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria) : An ethnopharmacology survey", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 148, n° 2, (2013), 395 - 402.
61. Sari, M., Hendel, N., Boudjelal, A., Sarri, D., "Inventory of medicinal plants used for traditional treatment of eczema in region of Hodna (M'Sila-Algeria)", *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine*, V. 1, n° 4, (2012), 97 - 100.
62. Telli, A., Esnault, M.A., Khelil, A.O.E.H., "An ethnopharmacological survey of plants used in traditional diabetes treatment in south-eastern Algeria (Ouargla province) ", *Journal of Arid Environments*, V. 127, (2016), 82-92.
63. El Rhaffari, L., Zaid, A., "Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet) : Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée", *Des Sources du Savoir aux Médicaments Futurs*, V. 1, (2002), 293 - 318.
64. Skim, F., Lazrek, B.H., El Amri, H., Kaaya, A., Jana, M., "Toxicological studies on *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum* in rats", *Phytotherapy Research*, V. 12, n° 8, (1998), 592 - 594.
65. Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M., "Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 81, n° 3, (2002), 351 - 356.
66. Hodge, H.C., Sterner, J.H., "Tabulation of toxicity classes", *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, V. 10, n° 4, (1949), 93 - 96.
67. Elbetieha, A., Oran, S.A., Alkofahi, A., "Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 72, n° 1, (2000), 215 - 219.
68. Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., Marouf, A., "Screening of Algerian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity", *Journal of Biological Sciences*, V. 10, (2010), 1 - 9.
69. Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Araújo, M.E.M., "Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities", *Industrial Crops and Products*, V. 53, (2014), 6 - 15.

70. Khlifia, D., Sghaierc, R.M., Laounic, D., Hayounid, A.A., Hamdib, M., Bouajilaa, J., "Anti-Inflammatory and Acetylcholinesterase inhibition activities of *Globularia Alypum*", Journal of Medical and Bioengineering, V. 2, n° 4, (2013), 232 - 237.
71. Beghalia, M., Ghalem, S., Allali, H., Belouatek, A., Marouf, A., "Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal growth using Algerian medicinal plants", Journal of Medicinal Plants Research, V. 2, n° 3, (2008), 66 - 70.
72. Khlifi, S., El Hachimi, Y., Khalil, A., Es-Safi, N., El Abbouyi, A., "In vitro antioxidant effect of *Globularia alypum* L. hydromethanolic extract", Indian journal of pharmacology, V. 37, n° 4, (2005), 227 - 231.
73. Es-Safi, N.E., Kollmann, A., Khlifi, S., Ducrot, P.H., "Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure–activity relationship", LWT-Food science and technology, V. 40, n° 7, (2007), 1246 - 1252.
74. Es-Safi, N.E., Khlifi, S., Kerhoas, L., Kollmann, A., El Abbouyi, A., Ducrot, P.H., "Antioxidant Constituents of the Aerial Parts of *Globularia alypum* Growing in Morocco", Journal of natural products, V. 68, n° 8, (2005), 1293 - 1296.
75. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., "Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds", Food Chemistry, V. 97, n° 4, (2006), 654 - 660.
76. Ghilissi, Z., Kallel, R., Sila, A., Harrabi, B., Atheymen, R., Zeghal, K., Bougateg, A., Sahnoun, Z., "*Globularia alypum* methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities", Biomedicine and Pharmacotherapy, V. 84, n° 8, (2016), 1488 - 1495.
77. Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., Marouf, A., "Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants", Journal of Biological Sciences, V. 10, n° 4, (2010), 316 - 324.
78. Chograni, H., Riahi, L., Zaouali, Y., Boussaid, M., "Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae)", African Journal of Ecology, V. 51, n° 2, (2013), 343 - 347.
79. Harzallah, H.J., Neffati, A., Skandrani, I., Chekir-Ghedira, L., Mahjoub, T., "Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves

- extracts", *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 4, n° 19, (2010), 2048 - 2053.
80. Chevolleau, S., Mallet, J.F., Ucciani, E., Gamisans, J., Gruber, M., "Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants", *Journal of the American Oil Chemists Society*, V. 69, n° 12, (1992), 1269 - 1271.
81. Khelifi, D., Hamdi, M., Hayouni, A. E., Cazaux, S., Souchard, J.P., Couderc, F., Bouajila, J., "Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves", *Molecules*, V. 16, n° 12, (2011), 10592 - 10603.
82. Ben Mansour, R., Gargouri, B., Gargouri, B., Elloumi, N., haj Jilani, I.B., Ghrabi-Gammar, Z., Lassoued, S., "Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globularia alypum* L", *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 6, n° 25, (2012), 4193 - 4199.
83. Taleb-Dida, N., Krouf, D., Bouchenak, M., "*Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet", *Nutrition Research*, V. 31, n° 6, (2011), 488 - 495.
84. Zennaki, S., Krouf, D., Taleb-Senouci, D., Bouchenak, M., "*Globularia alypum* L. lyophilized methanolic extract decreases hyperglycaemia and improves antioxidant status in various tissues of streptozotocin – induced diabetic rats". *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, V. 6, n° 1, (2009), 344 - 349.
85. Boussousalim, N., "Activités biologiques de plantes médicinales: *Anchusa azurea* Mill. et *Globularia alypum* L.", Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas de Sétif, (2014).
86. Bouabdelli, F., Djelloul, A., Kaid-Omar, Z., Semmoud, A., Addou, A., "Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in western Algeria", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, V. 2, (2012), S530-S535.
87. Oran, S.A, Raies, A., "Antimicrobial activity of *Globularia arabica*. Jaub. and Spach and *G. alypum*. L. (Globulariaceae) ", *Disar Pure Sci*, V. 27, (2000), 71 - 73.
88. Krimat, S., Dob, T., Lamari, L., Boumeridja, S., Chelghoum, C., Metidji, H., "Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria", *Journal of Coastal Life Medicine*, V. 2, n° 6, (2014), 478 - 83.

89. Boutemak, K., Safta, B., Ayachi, N., "Study of the Anti-Inflammatory Activity of Flavonic Extract of *Globularia alypum* L.", *Acta Physica Polonica A*, V. 128, n° 2B, (2015), 239 - 240.
90. Merghache, S., Zerriouh, M., Merghache, D., Tabti, B., Djaziri, R., Ghalem, S. "Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of Globularin isolated from *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, V. 3, n° 4, (2013), 01 - 07.
91. Omar, G.O., El Fituri, O., Abouseif, A.S., Kader, A., El Debani, S.S., Elshaari, F., Abdellatif, A.G., "Antihyperlipidemic activities of the Endogenous Plant *Globularia alypum* Extract (GAE) in Experimental Animals", *Journal of Basic Medical and Allied Sciences*, (2013), 26566.
92. Chokri, A., Doukali, R., El Abida, K., Cheikh, R.B., "Myorelaxant and spasmolytic effects of *Globularia alypum* L. extract on rabbit jejunum", *Int. J. Pharmacol*, V. 6, n° 5, (2010), 608 - 615.
93. Bello, R., Moreno, L., Primo-Yúfera, E., Esplugues, J., "*Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction in vitro", *Phytotherapy Research*, V. 16, n° 4, (2002), 389 - 392.
94. Chokri, A., El Abida, K., Zegzouti, Y.F., Ben Cheikh, R., "Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Globularia alypum* extract is mediated by EDHF in perfused rat mesenteric arterial bed", *Canadian journal of physiology and pharmacology*, V. 90, n° 5, (2012), 607 - 616.
95. Caldes, G., Prescott, B., King, J.R., "A potential antileukemic substance present in *Globularia alypum*", *Planta medica*, V. 27, n° 01, (1975), 72 - 76.
96. Fehri, B., Aiache, J.M., "Effects of *Globularia alypum* L. on the gastrointestinal tract", *Journal of Natural Products*, V. 3, (2010), 141 - 146.
97. Fehri, B., Aiache, J. M., Ahmed, K.M., "Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum* L. aqueous leaf extract", *Pharmacognosy research*, V. 4, n° 3, (2012), 138 - 147.
98. Fehri, B., Tebbett, I.R., Freiburger, B., Karlix, J., "The immunosuppressive effects of *Globularia alypum* extracts", *Phytotherapy Research*, V. 10, n° 6, (1996), 539 - 540.
99. Gomberg, M., "An instance of trivalent carbon : triphenylmethyl", *J. Am. Chem. Soc.*, V. 22, n° 11, (1900), 757 - 771.

100. Lafont, O., "Vie et mort des radicaux", *Revue d'histoire de la pharmacie*, V. 94, n° 352, (2006), 475 - 478.
101. Halliwell, B., Grootveld, M., Gutteridge, J., "Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems : deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation", *Methods of Biochemical Analysis*, V. 33, (2006), 59 - 90.
102. Favier, A., "Le stress oxydant", *L'actualité chimique*, V. 108, (2003), 108 - 115.
103. Beckman, K.B., Ames, B.N., "The free radical theory of aging mature", *Physiological reviews*, V. 78, n° 2, (1998), 547 - 581.
104. Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., "Free radicals, antioxidants in disease and health", *Int. J. Biomed. Sc.*, V. 4, n° 2, (2008), 89 - 96.
105. Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuca, K., Musilek, K., "Redox and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease", *Archives of toxicology*, V. 90, n° 1, (2016), 1 - 37.
106. Segal, A.W., "How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes", *Innate Immunity to Pulmonary Infection*, V. 155, (2007), 92 p.
107. Rabaud, C.H., Tronel, H., Fremont, S., May, T., Canton, P., Nicolas, J.P., "Radicaux libres et infection par le VIH", In *Annales de Biologie Clinique*, V. 55, n° 6, (1997), 565 - 571.
108. Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., "Espèce réactives de l'oxygène", *L'Actualité Chimique*, (2003), 91 - 96.
109. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P., "Le stress oxydant", *Revue Medicale de Liege*, V. 62, n° 10, (2007), 628 - 638.
110. Barouki, R., "Stress oxydant et vieillissement", *M/S revues*, V. 22, n° 3, (2006), 266 - 272.
111. Tapiero, H., "Stress oxydatif et alicaments", Editions EDK, (2006), 86 p.
112. Favier, A., Charreyre, M.T., "Experimental requirements for an efficient control of free-radical polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfert (RAFT) Process". *Macromolecular Rapid Communication*, V. 27, n° 9, (2006), 653 - 692.
113. Olivier, I.R., "Nutriceutical Modulation of Glutathione with a Humanized Native Milk Serum Protein Isolate, Immunocal™ Application in AIDS and

- Cancer", *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases*, (1997), 447 - 461.
114. Siti, H.N., Kamisah, Y., Kamsiah, J., "The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review)", *Vascular pharmacology*, V. 71, (2015), 40 - 56.
115. Walter, M.F., Jacob, R.F., Bjork, R.E., Jeffers, B., Buch, J., Mizuno, Y., Mason, R.P., "Circulating lipid hydroperoxides predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease : the prevent study", *Journal of the American College of Cardiology*, V. 51, n° 12, (2008), 1196 - 1202.
116. Swomley, A.M., Förster, S., Keeney, J.T., Triplett, J., Zhang, Z., Sultana, R., Butterfield, D.A., "Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease : evidence based on proteomics studies", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, V. 1842, n° 8, (2014), 1248 - 1257.
117. Pradat, P.F., Camdessanché, J.P., Carlier, L., Cintas, P., Corcia, P., Danel-Brunaud, V., Echaniz-Laguna, A., Gonzalez, J., Nicolas, G., Vandenberghe, N., Verschueren, A., "Actualités dans la recherche fondamentale et clinique sur la sclérose latérale amyotrophique", *Revue neurologique*, V. 165, n° 6, (2009), 532 - 541.
118. Cillard, J., Cillard, P., "Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations", *Oleagineux, corps gras, lipides*, V. 13, n° 1, (2006), 24 - 29.
119. Brewer, M.S., "Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, V. 10, n° 4, (2011), 221 - 247.
120. Gordon, M.H., "The mechanism of antioxidant action in vitro : In *Food antioxidants - Chapitre 1*", Springer Netherlands, (1990), 1 - 18.
121. Gentilini, M., "Médecine tropicale – 6^{ème} édition", Lavoisier, (2012), 1332 p.
122. Ripert, C., "Epidémiologie des maladies parasitaires : Tome 3, Opportunistes", Editions Médicales Internationales, (2003), 419 p.
123. Georgiadou, S.P., Makaritsis, K.P., Dalekos, G.N., "Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment", *Journal of Translational Internal Medicine*, V. 3, n° 2, (2015), 43 - 50.
124. Bessis, D., Francès, C., Guillot, B., Guilhou, J.J., "Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques :

- Dermatologie et médecine", Springer Science and Business Media, V. 2, (2009), 400 p.
125. Goto, H., Lindoso, J.A.L., "Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis", Infectious disease clinics of North America, V. 26, n° 2, (2012), 293 - 307.
 126. McGwire, B.S., Satoskar, A.R., "Leishmaniasis : Clinical syndromes and treatment", QJMed, V. 107, (2013), 7 - 14.
 127. Zait, H., Hamrioui, B., "Leishmanioses cutanées en Algérie bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007", Revue Francophone des Laboratoires, V. 2009, n° 412, (2009), 33 - 39.
 128. Masmoudi, A., Hariz, W., Marrekchi, S., Amouri, M., Turki, H., "Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment", Journal of dermatological case reports, V. 7, n° 2, (2013), 31 - 41.
 129. Schaller, K.F., "Colour Atlas of Tropical Dermatology and Venerology", Springer Science and Business Media, (2012), 305 p.
 130. Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M.R., Postorino, M.C., Cosentino, S., Serra, A., Cacopardo, B., Nunnari, G., "Mucosal Leishmaniasis : An Underestimated Presentation of a Neglected Disease", BioMed Research International, V. 2013, (2013), 1 - 7.
 131. Faucher, B., Piarroux, R., "Actualités sur les leishmanioses viscérales", La Revue de Médecine Interne, V. 32, n° 9, (2011), 544 - 551.
 132. Gentilini, M., "Médecine tropicale – 6^{ème} édition", Lavoisier, (2012), 1332 p.
 133. Zait, H., Ferhani, Y., Achir, I., Hamrioui, B., "Étude de 71 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009", Médecine et maladies infectieuses, V. 42, n° 3, (2012), 119 - 125.
 134. Aoun, K., Ben Abda, I., Habboul, Z., Lemrani, M., Harrat, Z., Bouratbine, A., "Visceral Leishmaniasis in North African Countries", PUJ, V. 6, n° 1, (2013), 35 - 38.
 135. Harrat, Z., Hamrioui, B., Belkaid, M., "Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie", Bulletin de la Société de pathologie exotique, V. 88, n° 4, (1995), 180 - 184.
 136. Lightburn, E., Morand, J.J., Meynard, J.B., Kraemer, P., Chaudier, B., Garnotel, E., Morillon, M., "Management of American cutaneous leishmaniasis. Outcome apropos of 326 cases treated with high-dose

- pentamidine isethionate", *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial*, V. 63, n° 1, (2002), 35 - 44.
137. Buffet, P., "Leishmaniose cutanée", *Encycl Med Chir-Elsevier Masson SAS Dermatologie*, 98-395-A-15, (2008), 1 - 11.
138. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., "Advances in leishmaniasis", *Lancet*, V. 366, n° 9496, (2005), 1561 - 1577.
139. Claborn, D.M., "Leishmaniasis : Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment", *InTech*, (2014), 523 p.
140. Organisation Mondiale de la Santé, "Control of the leishmaniasis-World Health Organization technical report series : 949", *Organisation Mondiale de la Santé*, (2010), 186 p.
141. Desjeux, P., "Leishmaniasis: current situation and new perspectives", *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, V. 27, n° 5, (2004), 305 - 318.
142. Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team, "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence", *PLoS One*, V. 7, n° 5, (2012), e35671.
143. Organisation Mondiale de la Santé, "Investir pour réduire l'impact mondial des maladies tropicales négligées : Troisième rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées", *Organisation Mondiale de la Santé*, (2015), 191 p.
144. Kevric, I., Cappel, M.A., Keeling, J.H., "New world and old world *Leishmania* infections: a practical review", *Dermatologic clinics*, V. 33, n° 3, (2015), 579 - 593.
145. Ready, P.D., "Leishmaniasis emergence and climate change", *Revue scientifique et technique*, V. 27, n° 2, (2008), 399 - 412.
146. Dave, S., Dave, P., Pal, M., "The impact of climate change on emergence and re-emergence of vectorborne human diseases", *International Journal of Livestock Research*, V. 5, n° 7, (2015), 1 - 10.
147. Ozer, N., "Emerging vector-borne diseases in a changing environment", *Turkish Journal of Biology*, V. 29, n° 3, (2005), 125 - 135.
148. Handman, E., "Leishmaniasis: current status of vaccine development", *Clinical microbiology reviews*, V. 14, n° 2, (2001), 229 - 243.

149. Fendri, A.H., Beldjoudi, W., Ahraou, S., Djaballah, M., "Leishmaniasis in Constantine (Algeria): review of five years (2006-2010) at the University Hospital", *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, V. 105, n° 1, (2012), 46 - 48.
150. Izri, A., Belazzoug, S., "Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie", n° 396, (2007), 3 - 10.
151. Barchiche, N.A., Madiou, M., "Recrudescence des leishmanioses cutanées: à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou", *Pathologie Biologie*, V. 57, n° 1, (2009), 65 - 70.
152. Cherif, K., Boudrissa, A., Cherif, M.H., Harrat, Z., "Un programme social pour la lutte physique contre la leishmaniose cutanée zoonotique dans la wilaya de M'Sila en Algérie", *Santé Publique*, V. 24, n° 6, (2012), 511 - 522.
153. Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Dedet, J.P., "*Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 90, n° 6, (1996), 625 - 629.
154. Benallal, K., Gassen, B., Bouiba, L., Depaquit, J., Harrat, Z., "Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria", *Acta tropica*, V. 128, n° 3, (2013), 518 - 521.
155. Izri, M.A., Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pratlong, S., Delalbre-Belmonte, A., Rioux, J.A., "*Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie)", *Annales de parasitologie humaine et comparée*, V. 65, n° 3, (1990), 150 - 150.
156. Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G., Harrat, Z., "*Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie)", *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, V. 105, n° 1, (2012), 5 - 7.
157. Eddaikra, N., Aït-Oudhia, K., Oury, B., Harrat, Z., Sereno, D., "Retrospective and ongoing researches on *Leishmania* antimony resistance in Algeria", *MPSCT*, (2013), 678 - 689.
158. Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., Soukehal, A., Boelaert, M., "Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update", *PloS one*, V. 9, n° 6, (2014), e99207.

159. Institut National de Santé Publique, "Relevés épidémiologiques mensuels : situation épidémiologique de l'année 2012 sur la base des cas déclarés à l'INSP", Institut National de Santé Publique, V. 23, (2012), 22 p.
160. Aoun, K., Bouratbine, A., "Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review", Parasite, V. 21, n° 14, (2014), 1 - 9.
161. Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., Boubidi, S. C., 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.
162. Benikhlef, R., Harrat, Z., Toudjine, M., Djerbouh, A., Bendali-Braham, S., Belkaid, M., "Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien", Méd Trop, V. 64, n°4, (2004), 381 - 383.
163. Boubidi, S., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., Garni, R., Volf, P., "*Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaia, south Algeria", Microbes and Infection, V. 13, n° 7, (2011), 691 - 696.
164. Mansouri, R., Pratlong, F., Bachi, F., Hamrioui, B., Dedet, J.P., "The first isoenzymatic characterizations of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous leishmaniasis in the Area of Annaba (Eastern Algeria)", The Open Conf. Proc. J, V. 3, n°2, (2012), 6 - 11.
165. Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Merinfeld, E.G., "A newly revised classification of the protozoa", The Journal of protozoology, V. 27, n° 1, (1980), 37 - 58.
166. Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., "Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification", Ann Parasitol Hum Comp, V. 65, n° 3, (1990), 111 - 125.
167. Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.J.R., "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists", Journal of Eukaryotic Microbiology, V. 52, n° 5, (2005), 399 - 451.
168. Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., LeGall, L., Lynn, D.H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E.,

- Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., "The revised classification of eukaryotes", *Journal of Eukaryotic Microbiology*, V. 59, n° 5, (2012), 429 - 514.
169. Fraga, J., Montalvo, A.M., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Van der Auwera, G., "Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene, *Infection*", *Genetics and Evolution*, V. 10, n° 2, (2010), 238 - 245.
170. Harkins, K.M., Schwartz, R.S., Cartwright, R.A., Stone, A.C., "Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*", *Infection, Genetics and Evolution*, V. 38, (2016), 101 - 109.
171. Schonian, G., Cupolillo, E., Mauricio, I., "Drug resistance in *Leishmania* Parasites : Molecular evolution and phylogeny of *Leishmania*", Springer Vienna, (2013), 15 - 44.
172. Lainson, R., Shaw, J.J., "Leishmaniasis of the New World : taxonomic problems", *British Medical Bulletin*, V. 28, n° 1, (1972), 44 - 48.
173. Schonian, G., Mauricio, I., Cupolillo, E., "Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania* ?", *Trends in parasitology*, V. 26, n° 10, (2010), 466 - 469.
174. Pothirat, T., Tantiworawit, A., Chaiwarith, R., Jariyapan, N., Wannasan, A., Siriyasatien, P., Bates, P.A., "First isolation of *Leishmania* from Northern Thailand : case report, identification as *Leishmania martiniquensis* and phylogenetic position within the *Leishmania enriettii* complex", *PLoS Negl Trop Dis*, V. 8, n° 12, (2014), e3339.
175. Desbois, N., Pratlong, F., Quist, D., Dedet, J.P., "*Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies)", *Parasite*, V. 21, n°12, (2014), 1 - 3.
176. Kwakye-Nuako, G., Mosore, M.T., Duplessis, C., Bates, M.D., Puplampu, N., Mensah-Attipoe, I., 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, n° 11, (2015), 679 - 684.
177. Bualert, L., Charungkiattikul, W., Thongsuksai, P., Mungthin, M., Siripattanapipong, S., Khositnithikul, R., Leelayoova, S., "Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern

- Thailand, caused by *Leishmania siamensis*", The American journal of tropical medicine and hygiene, V. 86, n° 5, (2012), 821 - 824.
178. Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Handman, E., "Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos : isolation and characterisation of the causative organisms", International journal for parasitology, V. 34, n° 6, (2004), 655 - 664.
179. Myler, P.J., Fasel, N., "*Leishmania*: after the genome", Horizon Scientific Press, (2008), 306 p.
180. Euzéby, J., "Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire", Lavoisier, (2008), 832 p.
181. Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D., "Advances in Parasitology", Academic Press, (2002), 260 p.
182. Bates, P.A., "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies", International journal for parasitology, V. 37, n° 10, (2007), 1097 - 1106.
183. Ueno, N., Wilson, M.E., "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania* : implications for intracellular survival", Trends in parasitology, V. 28, n° 8, (2012), 335 - 344.
184. Chowdhary, S.J., Chowdhary, A., Kashaw, S., "Macrophage targeting: a strategy for leishmaniasis specific delivery", International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, V. 8, n° 2, (2016), 16 - 26.
185. Wanderley, J.L.M., da Silva, L.H.P., Deolindo, P., Soong, L., Borges, V.M., Prates, D.B., Saraiva, E.M., "Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis", PloS one, V. 4, n° 5, (2009), e5733.
186. Weingärtner, A., Kemmer, G., Müller, F.D., Zampieri, R.A., dos Santos, M.G., Schiller, J., Pomorski, T.G., "*Leishmania* promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment", PloS one, V. 7, n° 8, (2012), e42070.
187. Satoskar, A., Durvasula, R., "Pathogenesis of Leishmaniasis : New Developments in Research", Springer Science and Business, (2014), 93 p.

188. Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Sacks, D.L., "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*", *Experimental parasitology*, V. 72, n° 2, (1991), 191 - 204.
189. Harhay, M.O., Olliaro, P.L., Costa, D.L., Costa, C.H.N., "Urban parasitology : visceral leishmaniasis in Brazil", *Trends in parasitology*. V. 27, n° 9, (2011), 403 - 409.
190. Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view", *Clinical microbiology reviews*, V. 18, n° 2, (2005), 293 - 305.
191. Forestier, C.L., Gao, Q., Boons, G.J., "Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate ?", *Front. Cell. Infection Microbiol*, V. 4, n° 193, (2015), 1 - 7.
192. Rojas-Bernabe, A., Garcia-Hernandez, O., Maldonado-Bernal, C., Delegado-Dominguez, J., Ortega, E., Gutierrez-Kobeh, L., Aguirre-Garcia, M., "*Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4", *Parasitology*, V. 141, n° 06, (2014), 788 - 800.
193. Naderer, T., McConville, M.J., "The *Leishmania*–macrophage interaction : a metabolic perspective", *Cellular microbiology*, V. 10, n° 2, (2008), 301 - 308.
194. Gomez, M.A., Olivier, M., "Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction : paving the road for pathogenesis", *Virulence*, V. 1, n° 4, (2010), 314 - 318.
195. Contreras, I., Gómez, M.A., Nguyen, O., Shio, M.T., McMaster, R.W., Olivier, M., "*Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63", *PLoS Pathog*, V. 6, n° 10, (2010), e1001148.
196. Gluenz, E., Ginger, M.L., McKean, P.G., "Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Current opinion in microbiology*", V. 13, n° 4, (2010), 473 - 479.
197. Wery, M., "Protozoologie médicale", De Boeck Supérieur, (1995), 276 p.

198. Waller, R.F., McConville, M.J., "Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites", International journal for parasitology, V. 32, n° 12, (2002), 1435 - 1445.
199. Ilg, T., "Proteophosphoglycans of *Leishmania*", Parasitology Today, V. 16, n° 11, (2000), 489 - 497.
200. Kar, S., Ukil, A., Sharma, G., Das, P.K., "MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro-and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase C isoforms", Journal of leukocyte biology, V. 88, n° 1, (2010), 9 - 20.
201. Besteiro, S., Williams, R.A., Coombs, G.H., Mottram, J.C., "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*", International journal for parasitology, V. 37, n° 10, (2007), 1063 - 1075.
202. Chávez-Fumagalli, M.A., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, S.O.A., Cardoso, V.N., Coelho, C.S.P., Coelho, E.A.F., "New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment", Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, V. 48, n° 3, (2015), 235 - 242.
203. Pandey, K., Singh, D., Bimal, S., Rabidas, V., Murti, K., Lal, C., Das, P., "Newer drugs for visceral leishmaniasis: a review", American Journal of Infectious Diseases, V. 10, n° 2, (2014), 68 - 70.
204. Sundar, S., Chakravarty, J., "An update on pharmacotherapy for leishmaniasis", Expert opinion on pharmacotherapy, V. 16, n° 2, (2015), 237 - 252.
205. Buffet, P.A., Rosenthal, E., Gangneux, J.P., Lightburne, E., Couppié, P., Morizot, G., Dedet, J.P., "Traitement des leishmanioses en France: proposition d'un référentiel consensuel", La Presse Médicale, V. 40, n° 2, (2011), 173 - 184.
206. Ponte-Sucre, A., Diaz, E., Padron-Nieves, M., "Drug Resistance in *Leishmania* Parasites : Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments", Springer Science and Business Media, (2012), 462 p.
207. Sundar, S., Chakravarty, J., "Liposomal amphotericin B and leishmaniasis : dose and response", Journal of global infectious diseases, V. 2, n° 2, (2010), 159 - 166.

208. Berman, J., "Amphotericin B formulations and other drugs for visceral leishmaniasis", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 92, n° 3, (2015), 471 – 473.
209. Singh, N., Kumar, M., Singh, R.K., "Leishmaniasis : current status of available drugs and new potential drug targets", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, V. 5, n° 6, (2012), 485 - 497.
210. Freitas, E.O., Nico, D., Alves-Silva, M.V., Morrot, A., Clinch, K., Evans, G. B., Palatnik-de-Sousa, C.B., "Immucillins ImmA and ImmH are effective and non-toxic in the treatment of experimental visceral leishmaniasis", *PLoS Negl Trop Dis*, V. 9, n° 12, (2015), e0004297.
211. Brito, A.M.G., Dos Santos, D., Rodrigues, S.A., Brito, R.G., Xavier-Filho, L., "Plants with anti-*Leishmania* activity: integrative review from 2000 to 2011", *Pharmacognosy reviews*, V. 7, n° 13, (2013), 34 - 41.
212. Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., "Current scenario of drug development for leishmaniasis", *Indian Journal of Medical Research*, V. 123, n° 3, (2006), 399 - 410.
213. Yardley, V., Croft, S.L., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Koirala, S., Rijal, S., 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.
214. Minodier, P., Noël, G., Blanc, P., Uters, M., Retornaz, K., Garnier, J.M., "Traitement des leishmanioses cutanées de l'adulte et de l'enfant", *Médecine tropicale*, V. 65, n° 5, (2005), 487 - 495.
215. Chouhan, G., Ozbak, H.A., Hemeg, H.A., Afrin, F., "Leishmanicidal compounds of natural origin: their prospective mantle in antileishmanial therapy", *BAMP*, (2015), 174 - 184.
216. Jain, K., Jain, N.K., "Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis", *Drug Discovery Today*, V. 18, n° 23, (2013), 1272 - 1281.
217. Singh, O.P., Sundar, S., "Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis : current status and future prospects", *Frontiers in Immunology*, V. 5, n° 296, (2014), 1 - 9.
218. <https://www.google.com/earth/> (page consultée le 03 Mars 2013) ;
219. Bouchareb-Haouchine, F.Z., Boudoukha, A., Haouchine, A., "Hydrogéochimie et géothermométrie : apports à l'identification du réservoir

- thermal des sources de Hammam Righa, Algérie", *Hydrological Sciences Journal*, V. 57, n° 6, (2012), 1184 - 1195.
220. Kurian, A., Sankar A.M., "Medicinal Plants", New India Publishing, (2007), 356 p.
221. Conseil de l'Europe, "Pharmacopée européenne - 3^{ème} édition", Conseil de l'Europe, (1997), 1918 p.
222. Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F., "La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie", Springer Science and Business Media, (2013), 226 p.
223. Bicchi, C., Maffei, M., "The plant volatilome : methods of analysis. High-Throughput Phenotyping in Plants - Methods and Protocols", Springer, (2012), 289 - 310.
224. Azwanida, N.N., "A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation", *Med Aromat Plants*, V. 4, n°196, (2015), 2167 - 0412.
225. Seidel, V., "Initial and bulk extraction of natural products isolation - Natural Products isolation", *Methods in Molecular Biology*, (2012), V. 864, 27 - 41.
226. Sukhdev, S.H., Suman, P.S.K., Gennaro, L., Dev, D.R., "Extraction technologies for medicinal and aromatic plants", United Nation Industrial Development Organization and the International Center for Science and High Technology, (2008), 116 p.
227. Sebai, H., Jabri, M.A., Souli, A., "Antidiarrheal and antioxidant activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract in rats", *Journal of ethnopharmacology*, V. 152, n° 2, (2014), 327 - 332.
228. Gillard, S., "Les dihydrochalcones de la pomme (extraction, séparation et intérêt médical)", Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, (2009).
229. Livesey, J., Awang, D.V.C., Arnason, J.T., Letchamo, W., Barrett, M., Pennyroyal, G., "Effect of temperature on stability of marker constituents in *Echinacea purpurea* root formulations", *Phytomedicine*, V. 6, n° 5, (1999), 347 - 349.
230. Koyu, H., Haznedaroglu, M.Z., "Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract", *journal of food and drug analysis*, V. 23, n° 3, (2015), 545 - 551.

231. De Castro, M.L., Priego-Capote, F., "Soxhlet extraction: Past and present panacea", *Journal of Chromatography A*, V. 1217, n° 16, (2010), 2383 - 2389.
232. Marouf, A., Tremblin, G., "Mémento technique à l'usage des biologistes et biochimistes", EDP Sciences, (2013), 864 p.
233. Pedersen, J.R., Olsson, J.O., "Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips", *Analyst*, V. 128, n° 4, (2003), 332 - 334.
234. Lagunez Rivera, L., "Étude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe", Thèse de doctorat, Institut Polytechnique de Toulouse, (2006).
235. Paris, R. R., Moyse, H., "Précis de Matière Médicale", Masson, (1976), 420 p.
236. Raaman, N., "Phytochemical Techniques", New India Publishing, (2006), 320 p.
237. Sofowora, A., "Recent trends in research into African medicinal plants", *Journal of ethnopharmacology*, V. 38, n°2-3, (1993), 197 - 208.
238. Sofowora, A., "Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique", Karthala, (2010), 378 p.
239. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)", Lavoisier, (2009), 1292 p.
240. Khemani L.D., Srivastava, M.M., Srivastava, S., "Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives", Springer Science and Business Media, (2011), 382 p.
241. Shanmugan, S., Kumar, T.S., Selvam, K.P., "Laboratory handbook on biochemistry", PHI Learning Pvt. Ltd, (2010), 141 p.
242. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent", *Methods in enzymology*, V. 299, (1999), 152 - 178.
243. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., "Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires", PUR presses polytechniques, (2005), 192 p.
244. Adams, R.P., "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy", Allured publishing corporation, (1995), 469 p.

245. Adams, R.P., "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed.", Allured publishing corporation, (2007), 804 p.
246. Babushok, V.I., Zenkevich, I.G., "Retention indices for most frequently reported essential oil compounds in GC", *Chromatographia*, V. 69, n° 3/4, (2009), 257 - 269.
247. Flanagan, R.J., Taylor, A.A., Watson, I.D., Whelpton, R., "Fundamentals of analytical toxicology", John Wiley and Sons, (2008), 505 p.
248. Hubschmann, H.J., "Handbook of GC-MS : Fundamentals and Applications", Illustrée, (2015), 880 p.
249. Orata, F., "Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis", INTECH, (2012), 460 p.
250. Multon, J.L., "Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Analyse des constituants alimentaires", Lavoisier, (1991), 450 p.
251. Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F., 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.
252. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT-Food science and Technology*, V. 28, n° 1, (1995), 25 - 30.
253. Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., Wang, Z., "Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.)", *Food Chemistry*, V. 113, n° 1, (2009), 160 - 165.
254. Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity", *Songklanakarin J. Sci. Technol*, V. 26, n° 2, (2004), 211 - 219.
255. Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH", *Revue de Génie Industriel*, V. 4, (2009), 25 - 39.
256. Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hartl, M., Hadacek, F., Hofer, O., Greger, H., "Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species", *Phytochemistry*, V. 65, n° 19, (2004), 2719 - 2729.

257. Mamadalieva, N.Z., Sharopov, F., Girault, J.P., Wink, M., 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.
258. Scherer, R., Godoy, H.T., "Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method", *Food chemistry*, V. 112, n° 3, (2009), 654 - 658.
259. Tempone, A.G., De Oliveira, C.M., Berlinck, R.G., "Current approaches to discover marine antileishmanial natural products", *Planta medica*, V. 77, n° 6, (2011), 572 - 585.
260. Weniger, B., Robledo, S., Arango, G.J., Deharo, E., Aragón, R., Muñoz, V., Anton, R., "Antiprotozoal activities of Colombian plants", *Journal of ethnopharmacology*, V. 78, n° 2, (2001), 193 - 200.
261. Tiunan, T.S., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., "Studies on the effectiveness of *Tanacetum parthenium* against *Leishmania amazonensis*", *Acta protozoologica*, V. 44, n° 3, (2005) 245 - 251.
262. Bernard, P.M., Lapointe, C., "Mesures statistiques en épidémiologie", PUQ, (1987), 314 p.
263. Motulsky, H.J., "Biostatistique : une approche intuitive", De Boeck Supérieur, (2013), 492 p.
264. Paris, R., "Sur le noircissement des feuilles de Globulaire Turbith (*Globularia alypum* L.)", *Bulletin de la Société Botanique de France*, V. 93, n°5-6, (1946), 159 - 162.
265. Boulos, L., "Flora of Egypt : Verbenaceae-Compositae", Al Hadara Publishing, V. 3, (2002), 373 p.
266. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H., "Physiological Plant Ecology III : Responses to the Chemical and Biological Environment. Springer Science and Business Media", V. 12, (2013), 799 p.
267. Belfakih, M., Ibriz, M., Zouahri, A., "Effet de la salinité sur les paramètres morphophysologiques de deux variétés de bananier (*Musa acuminata* L.)", *Journal of Applied Biosciences*, V. 70, n° 1, (2013), 5652 - 5662.
268. Coopman, R.E., Jara, J.C., Bravo, L.A., Sáez, K.L., Mella, G.R., Escobar, R., "Changes in morpho-physiological attributes of *Eucalyptus globulus* plants

- in response to different drought hardening treatments", *Electronic Journal of Biotechnology*, V. 11, n° 2, (2008), 30 - 39.
269. Fan, X.X., Xu, Z.G., Liu, X.Y., Tang, C.M., Wang, L.W., Han, X.L., "Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light", *Scientia Horticulturae*, V. 153, (2013), 50 - 55.
270. Elle, E., Hare, J.D., "Environmentally induced variation in floral traits affects the mating system in *Datura wrightii*", *Functional Ecology*, V. 16, n° 1, (2002), 79 - 88.
271. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : a review", *Journal of Food Engineering*, V. 117, n° 4, (2013), 426 - 436.
272. Djellouli, F., Krouf, D., Bouchenak, M., Lacaille-Dubois, M.A., "Favorable Effects of *Globularia alypum* L. Lyophilized Methanolic Extract on the Reverse Cholesterol Transport and Lipoprotein Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats", *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, V. 6, n° 4, (2014), 758 – 765.
273. Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M., "Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts", *Molecules*, V. 14, (2009), 2167 - 2180.
274. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J., "Factors affecting secondary metabolite production in plants : volatile components and essential oils", *Flavour and Fragrance Journal*, V. 23, n° 4, (2008), 213 - 226.
275. t'Kindt, R., Morreel, K., Deforce, D., Boerjan, W., Van Bocxlaer, J., "Joint GC–MS and LC–MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment", *Journal of Chromatography B*, V. 877, n° 29, (2009), 3572 - 3580.
276. Jones, W.P., Kinghorn, A.D., "Extraction of plant secondary metabolites", *Natural products isolation*, V. 20, (2005), 323 - 351.
277. Farnsworth, N.R., "Biological and phytochemical screening of plants", *Journal of pharmaceutical sciences*, V. 55, n° 3, (1966), 225 - 276.

278. Marini-Bettolo, G.B., Nicoletti, M., Patamia, M., Galeffi, C., Messina, I., "Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions". *Journal of Chromatography A*, V. 213, n° 1, (1981), 113 - 127.
279. Viladomat, F., Codina, C., Llabres, J.M., Bastida, J., "Alkaloid Screening of Plants of Catalonia (Spain) III", *International Journal of Crude Drug Research*, V. 24, n° 3, (1986), 123 - 130.
280. Meriah, S., "Contribution à l'étude chimique et biologique de *Globularia alypum* L. et *Ruta chalepensis* L., deux plantes de la flore de la région de Tlemcen utilisées en médecine traditionnelle", Thèse de doctorat, Université Abou Beker Belkaid, (2007).
281. Zerriouh, M., "Contribution à l'étude de l'activité antidiabétique de la globularine, un iridoïde isolé des feuilles de *Globularia alypum* L. chez le rat Wistar", Mémoire de Magister, Université Abou Beker Belkaid, (2008).
282. Chen, L.Y., Cheng, C.W., Liang, J.Y., "Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols", *Food chemistry*, V. 170, n° 8, (2015), 10 - 15.
283. Naczki, M., Shahidi, F., "Extraction and analysis of phenolics in food", *Journal of Chromatography A*, V. 1054, n° 1, (2004), 95 - 111.
284. Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y. A., Wangila, G.W., Walker, R.B., "Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 58, n° 14, (2010), 8139 - 8144.
285. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *Journal of agricultural and food chemistry*, V. 53, n° 10, (2005), 4290 - 4302.
286. Lester, G.E., Lewers, K.S., Medina, M.B., Saftner, R.A., "Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu : Assay interference by ascorbic acid". *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 27, n° 1, (2012), 102 - 107.
287. Slinkard, K., Singleton, V.L., "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods", *American Journal of Enology and Viticulture*, V. 28, n° 1, (1977), 49 - 55.

288. Maisuthisakul, P., Suttajit, M., 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.
289. Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Núñez, M.J., "Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power", *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, V. 7, n° 8, (2008), 3210 - 6.
290. Naczka, M., Shahidi, F., "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis", *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, V. 41, n° 5, (2006), 1523 - 1542.
291. Pellegrini, N., Colombi, B., Salvatore, S., Brenna, O.V., Galaverna, G., Del Rio, D., Brighenti, F., "Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 87, n° 1, (2007), 103 - 111.
292. Zhi-lin, Y., Chuan-chao, D., Lian-qing, C., "Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system", *African Journal of Biotechnology*, V. 6, n° 11, (2007), 1266 - 1271.
293. Diabate, S., Konan, K.E., Allou, D., Coulibaly, O.A., De Franquville, H., "Performance de deux techniques d'extraction des phénols racinaires pour l'évaluation du marquage de la tolérance à la fusariose des clones de palmier a huile (*Elaeis guineensis* jacq.)", *Sciences et Nature*, V. 6, n° 2, (2009), 117 - 123.
294. Jaakola, L., Hohtola, A., "Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants", *Plant, cell and environment*, V. 33, n° 8, (2010), 1239 - 1247.
295. Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D., "Histochemical responses of leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*", *Phytopathology*, V. 85, n° 2, (1995), 149 - 154.
296. Fahmi, F., Tahrouch, S., Hatimi, A., "Geoclimatic influences on flavonoids contents of the leaves of the argan tree Influences géoclimatiques sur la composition en flavonoides des feuilles de l'arganier *Argania spinosa*", *Journal of Materials and Environmental Science*, V. 4, n° 6, (2013), 881 - 886.

297. Boira, H., Blanquer, A., "Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L.", *Biochemical systematics and Ecology*, V. 26, n° 8, (1998), 811 - 822.
298. Daget, P., "Le bioclimat méditerranéen: analyse des formes climatiques par le système d'Emberger", *Vegetatio*, V. 34, n° 2, (1977), 87 - 103.
299. Aggoun, H., "Contribution à l'étude des Hyménoptères parasitoïdes des pucerons associés au milieu naturel dans la région de Khenchela" Mémoire de Magister, Université El-Hadj Lakhdar, (2016).
300. Karim, F.A., "Changement climatique ou variabilité climatique dans l'Est algérien" Mémoire de Magister, Université Constantine 1, (2014).
301. Abreu, P.M., Noronha, R.G., "Volatile constituents of the rhizomes of *Aframomum alboviolaceum* (Ridley) K. Schum. from Guinea-Bissau", *Flavour and fragrance journal*, V. 12, n° 2, (1997), 79 - 83.
302. Karioti, A., Skaltsa, H., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., Economakis, C.D., Salem, A.B., "Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill. in solution culture", *Journal of agricultural and food chemistry*, V. 51, n° 22, (2003), 6505 - 6508.
303. Crkvenčić, M., Dudaš, S., Jerković, I., Marijanović, Z., Poljuha, D., Pilepić, K.H., "Essential Oil Composition of Three *Globularia* Species", *Chemistry and biodiversity*, V. 13, n° 2, (2016), 219 - 223.
304. Radjabian, T., Salimic, A., Rahmani, N., "Essential-Oil Composition of the Fruits of Six *Heracleum* L. Species from Iran : Chemotaxonomic Significance", *Chemistry and Biodiversity*, V. 11, n°12, (2014), 1945 - 1953.
305. Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusà, J., Niinemets, Ü., Peñuelas, J., "Optimum temperature for floral terpene emissions tracks the mean temperature of the flowering season", *Functional Plant Biology*, V. 42, n° 9, (2015), 851 - 857.
306. Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusà, J., Peñuelas, J., "Pollination mode determines floral scent", *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 61, (2015), 44 - 53.
307. Eltz, T., Hedenström, E., Bång, J., Wallin, E.A., Andersson, J., "(6R, 10R)-6, 10, 14-Trimethylpentadecan-2-one, a Dominant and Behaviorally Active Component in Male Orchid Bee Fragrances", *Journal of chemical ecology*, V. 36, n° 12, (2010), 1322 - 1326.

308. Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Ukeda, H., "Applicability of the DPPH Assay for Evaluating the Antioxidant Capacity of Food Additives—Inter-laboratory Evaluation Study—", *Analytical Sciences*, V. 30, n° 7, (2014), 717 - 721.
309. Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P., Groot, A.D., Evstatieva, L.N., "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods", *Phytochemical analysis*, V. 13, n° 1, (2002), 8 - 17.
310. Horszwald, A., Andlauer, W., "Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods", *Journal of Berry Research*, V. 1, n° 4, (2011), 189 - 199.
311. Herald, T.J., Gadgil, P., Tilley, M., "High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 92, n° 11, (2012), 2326 - 2331.
312. Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M.R., Navarro, M., "Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 95, n° 1, (2015), 204 - 209.
313. Mpofo, A., Sapirstein, H.D., Beta, T., "Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 54, n° 4, (2006), 1265 - 1270.
314. Anttonen, M.J., Karjalainen, R.O., "Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry", *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 18, n° 8, (2005), 759 - 769.
315. Wang, S.Y., Bunce, J.A., Maas, J.L., "Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field-grown strawberries", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 51, n° 15, (2003), 4315 - 4320.
316. Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C., "Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes", *Comptes Rendus Biologies*, V. 331, n° 11, (2008), 865 - 873.

317. Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M., "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants", *Food Chemistry*, V. 102, n° 3, (2007), 938 - 953.
318. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer", *Life sciences*, V. 74, n° 17, (2004), 2157 - 2184.
319. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., "Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols", *Food chemistry*, V. 94, n° 4, (2006), 550 - 557.
320. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., "A review of the antioxidant potential of medicinal plant species", *Food and bioproducts processing*, V. 89, n° 3, (2011), 217 - 233.
321. Crkvenčić, M., Pilepić, K.H., Maleš, Ž., "Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of different plant parts in three *Globularia* sp", In 4th Croatian Botanical Symposium with international participation, (janvier, 2013).
322. Jacob, S.W., Herschler, R., "Pharmacology of DMSO", *Cryobiology*, V. 23, n° 1, (1986), 14 - 27.
323. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C., "Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide : pharmacological, cellular, and molecular aspects", *Biochemical pharmacology*, V. 65, n° 7, (2003), 1035 - 1041.
324. International Organization for Standardization, "ISO.E10993-5, Biological evaluation of medical devices-Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity", International Organization for Standardization, (2009), 34 p.
325. Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U., "A historical overview of natural products in drug discovery. Metabolites", V. 2, n° 2, (2012), 303 - 336.
326. Abreu, A.C., McBain, A.J., Simoes, M., "Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents", *Natural product reports*, V. 29, n° 9, (2012), 1007 - 1021.
327. Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., "The value of plants used in traditional medicine for drug discovery", *Environmental health perspectives*, V. 109, n° 1, (2001), 69 - 75.
328. Acebey, L., Jullian, V., Sauvain, M., "Ethnopharmacologie et leishmanioses en Amérique latine", *Ethnopharmacologia*, V. 41, (2008), 14 - 32.

329. Gupta, S., "Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery", *The Indian journal of medical research*, V. 133, n° 1, (2011), 27 - 39.
330. Sereno, D., Da Silva, A.C., Mathieu-Daude, F., Ouaisi, A., "Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures", *Parasitology international*, V. 56, n° 1, (2007), 3 - 7.
331. Callahan, H.L., Portal, A.C., Devereaux, R., Grogl, M.A.X., "An axenic amastigote system for drug screening", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, V. 41, n° 4, (1997), 818 - 822.
332. De Muylder, G., Ang, K.K., Chen, S., Arkin, M.R., Engel, J.C., McKerrow, J.H., "A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 5, n° 7, (2011), e1253.
333. Fumarola, L., Spinelli, R., Brandonisio, O., "In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp", *Research in microbiology*, V. 155, n° 4, (2004), 224 - 230.
334. Siqueira-Neto, J.L., Song, O.R., Oh, H., Sohn, J.H., Yang, G., Nam, J., Genovesio, A., Chatelain, E., Christophe, T., Freitas-Junior, L.H., "Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 4, n° 5, (2010), e675.
335. Sharlow, E.R., Close, D., Shun, T., Leimgruber, S., Reed, R., Mustata, G., Magill, A.J., "Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania major* using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen". *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 3, n° 11, (2009), e540.
336. Gonzalez-Fajardo, L., Fernández, O.L., McMahon-Pratt, D., Saravia, N.G., "Ex Vivo Host and Parasite Response to Antileishmanial Drugs and Immunomodulators", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 9, n° 5, (2015), e0003820.
337. Ambit, A., Woods, K.L., Cull, B., Coombs, G.H., Mottram, J.C., "Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*", *Eukaryotic cell*, V. 10, n° 11, (2011), 1429 - 1438.
338. Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Elcicek, S., Koc, R.C., Oztel, O.N., "Effect of human urine on cell cycle and infectivity of *Leishmania* species

- promastigotes *in vitro*", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, V. 85, n° 4, (2011), 639 - 643.
339. Pinto-da-Silva, L.H., Camurate, M., Costa, K.A., Oliveira, S.M., da Cunha-e-Silva, N.L., Saraiva, E.M., "*Leishmania* (Viannia) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using Bauhinia purpurea lectin are complement resistant and highly infective for macrophages *in vitro* and hamsters *in vivo*", International Journal for Parasitology, V. 32, n° 11, (2002), 1371 - 1377.
340. Sacks, D., Kamhawi, S., "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis", Annual reviews in microbiology, V. 55, n° 1, (2001), 453 - 483.
341. Hide, M., "Variabilité pathogénique du complexe *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*, agent de la leishmaniose viscérale : Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique", Thèse de doctorat, Université Montpellier 2, (2004).
342. Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., 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.
343. Oryan, A., "Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis", Iranian journal of veterinary research, V. 16, n° 1, (2015), 1 - 19.
344. Monzote, L., Piñón, A., Setzer, W.N., "Antileishmanial potential of tropical rainforest plant extracts", Medicines, V. 1, n° 1, (2014), 32 - 55.
345. Lenta, B.N., Vonthron-Sénécheau, C., Soh, R.F., Tantangmo, F., Ngouela, S., Kaiser, M., Tsamod, E., Anton, R., Weniger, B., "*In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants", Journal of ethnopharmacology, V. 111, n° 1, (2007), 8 - 12.
346. Llanes, A., Restrepo, C.M., Del Vecchio, G., Anguizola, F.J., Lleonart, R., "The genome of *Leishmania panamensis* : insights into genomics of the L.(Viannia) subgenus", Scientific reports, V. 5, (2015), 8550.
347. Natera, S., Machuca, C., Padrón-Nieves, M., Romero, A., Díaz, E., Ponte-Sucre, A., "*Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites", International journal of antimicrobial agents, V. 29, n°6, (2007), 637 - 642.
348. Baghaei, M., "Intraspecific variation in *Leishmania major* isolated from different forms of zoonotic cutaneous Leishmaniasis", Iranian Journal of Medical Sciences, V. 30, n°2, (2015), 51 - 53.

349. Vermelho, A.B., Supuran, C.T., Cardoso, V., Menezes, D., de Andrade Silva, J.R., Ferreira, J.L.P., Amaral, A.C.F., Rodrigues, I.A., "Leishmaniasis: possible new strategies for treatment", In *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, chapter 15, InTech, (2015), 523 p.
350. Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macedo, R.O., Barbosa-Filho, J.M., "A review of natural products with antileishmanial activity", *Phytomedicine*, V. 12, n° 6, (2005), 514 - 535.
351. Santhosh, R.S., Suriyanarayanan, B., "Plants : a source for new antimycobacterial drugs", *Planta medica*, V. 80, n° 01, (2014), 9 - 21.
352. Nazarizadeh, A., Mikaili, P., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S., Javaherypour, S., "Therapeutic uses and pharmacological properties of *Plantago major* L. and its active constituents", *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, V. 3, n° 9, (2013), 212 - 221.
353. Gomez-Flores, R., Calderon, C.L., Scheibel, L. W., Tamez-Guerra, P., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Weber, R.J., "Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract", *Phytotherapy Research*, V. 14, n° 8, (2000), 617 - 622.
354. Gachet, M. S., Lecaro, J.S., Kaiser, M., Brun, R., Navarrete, H., Muñoz, R.A., Bauer, R., Schühly, W., "Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis", *Journal of ethnopharmacology*, V. 128, n° 1, (2010), 184 - 197.
355. Houël, E., Gonzalez, G., Bessière, J.M., Odonne, G., Eparvier, V., Deharo, E., Stien, D., "Therapeutic switching: from antidermatophytic essential oils to new leishmanicidal products", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 110, n° 1, (2015), 106 - 113.
356. Sinha, J., Raay, B., Das, N., Medda, S., Garai, S., Mahato, S.B., Basu, M.K., "Bacopasaponin C : critical evaluation of anti-leishmanial properties in various delivery modes", *Drug delivery*, V. 9, n° 1, (2002), 55 - 62.
357. Garai, S., Mahato, S.B., Ohtani, K., Yamasaki, K., "Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*", *Phytochemistry*, V. 42, n° 3, (1996), 815 - 820.
358. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., "Production of plant secondary metabolites : a historical perspective", *Plant science*, V. 161, n° 5, (2001), 839 - 851.

359. Cragg, G.M., Newman, D.J., "Natural products : a continuing source of novel drug leads", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, V. 1830, n° 6, (2013), 3670 - 3695.
360. Hussain, H., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Green, I.R., Gibbons, S., "Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011", *Chemical reviews*, V. 114, n° 20, (2014), 10369 - 10428.
361. Tullius Scotti, M., Scotti, L., Ishiki, H., Fávoro Ribeiro, F., Marques Duarte da Cruz, R., Pedrosa de Oliveira, M., Jaime Bezerra Mendonça, F., "Natural Products as a Source for Antileishmanial and Antitrypanosomal Agents", *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, V. 19, n° 7, (2016), 537 - 553.
362. Iqbal, H., Ishfaq, M., Wahab, A., Abbas, M.N., Ahmad, I., Rehman, A., Zakir, M., "Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, V. 6, n° 1, (2016), 1 - 5.
363. Rohrer, L.U.C.I.A., Winterhalter, K.H., Eckert, J., Köhler, P., "Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, V. 30, n° 2, (1986), 254 - 257.
364. Carballeira, N.M., "Recent developments in the antiprotozoal and anticancer activities of the 2-alkynoic fatty acids", *Chemistry and physics of lipids*, V. 172, (2013), 58 - 66.
365. Melariri, P., Campbell, W., Etusim, P., Smith, P., "In vitro and in vivo antimalarial activity of linolenic and linoleic acids and their methyl esters", *Advanced Studies in Biology*, V. 4, n° 7, (2012), 333 - 349.
366. Krugliak, M., Deharo, E., Shalmiev, G., Sauvain, M., Moretti, C., Ginsburg, H., "Antimalarial effects of C18 fatty acids on *Plasmodium falciparum* in culture and on *Plasmodium vinckei petteri* and *Plasmodium yoelii nigeriensis* *in vivo*", *Experimental parasitology*, V. 81, n° 1, (1995), 97 - 105.
367. Kumaratilake, L.M., Robinson, B.S., Ferrante, A., Poulos, A., "Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on *Plasmodium falciparum* and *in vivo* effects on *P. berghei*", *Journal of Clinical Investigation*, V. 89, n° 3, (1992), 961 - 967.
368. Tasdemir, D., Topaloglu, B., Perozzo, R., Brun, R., O'Neill, R., Carballeira, N.M., Zhang, X., Tonge, P.J., Lindeng, A., Rüedi, P., "Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from

- Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*", Bioorganic and medicinal chemistry, V. 15, n° 21, (2007), 6834 - 6845.
369. Carballeira, N.M., Cartagena, M., Sanabria, D., Tasdemir, D., Prada, C.F., Reguera, R.M., Balaña-Fouce, R., "2-Alkynoic fatty acids inhibit topoisomerase IB from *Leishmania donovani*", Bioorganic and medicinal chemistry letters, V. 22, n° 19, (2012), 6185 - 6189.
370. Kirmizibekmez, H., Atay, I., Kaiser, M., Brun, R., Cartagena, M.M., Carballeira, N.M., Yesilada, E., Tasdemir, D., "Antiprotozoal activity of *Melampyrum arvense* and its metabolites", Phytotherapy Research, V. 25, n° 1, (2011), 142 - 146.
371. Nweze, N.E., Anene, B.M., Asuzu, I.U., "In vitro anti-trypanosomal activities of crude extracts, β -sitosterol and α -sulphur from *Buchholzia coriacea* seed", African Journal of Biotechnology, V. 10, n° 69, (2011), 15626 -15632.
372. Da Franca Rodrigues, K.A., Amorim, L.V., Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Carneiro, S. M.P., De Amorim Carvalho, F.A., "*Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*", Journal of ethnopharmacology, V. 160, 2015, 32 - 40.
373. Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M., Uliana, S.R., "Antileishmanial activity of the terpene nerolidol", Antimicrobial agents and chemotherapy, V. 49, n° 5, (2005), 1679 - 1687.
374. Arruda, D.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Katzin, A.M., Uliana, S.R., "Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*", Biomedicine and Pharmacotherapy, V. 63, n° 9, (2009), 643 - 649.
375. Camargos, H.S., Moreira, R.A., Mendanha, S.A., Fernandes, K.S., Dorta, M.L., Alonso, A., "Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC 50 values", PloS one, V. 9, n° 8, (2014), e104429.
376. De Morais, S.M., Vila-Nova, N.S., Bevilaqua, C.M.L., Rondon, F.C., Lobo, C.H., Moura, A.D.A.A.N., Sales, A.D., Rodrigues, A.P.R., De Figueiredo, J.R., Campello, C.C., Wilson, M.E., Wilson, M.E., "Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents", Bioorganic and medicinal chemistry, V. 22, n° 21, (2014), 6250 - 6255.

377. Rosypal, A.C., Hall, J.E., Bakunova, S., Patrick, D.A., Bakunov, S., Stephens, C.E., Kumar, A., Boykin, D.W., Tidwell, R.R., "In vitro activity of dicationic compounds against a North American foxhound isolate of *Leishmania infantum*", Veterinary parasitology, V. 145, n° 3, (2007), 207 - 216.
378. Tasdemir, D., Sanabria, D., Lauinger, I.L., Tarun, A., Herman, R., Perozzo, R., Zloh, M., Kappe, S.H., Brun, R., Carballeira, N.M., "2-Hexadecynoic acid inhibits plasmodial FAS-II enzymes and arrests erythrocytic and liver stage *Plasmodium* infections", Bioorganic & medicinal chemistry, V. 18, n° 21, (2010), 7475 - 7485.
379. Pisoschi, A.M., Pop, A., "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review", European journal of medicinal chemistry, V. 97, (2015), 55 - 74.
380. Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., Endo, T., "Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, V. 48, n° 10, (2000), 1467 - 1469.
381. Ruberto, G., Baratta, M.T., "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems", Food chemistry, V. 69, n° 2, (2000), 167 - 174.
382. Lee, K.G., Shibamoto, T., "Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans", Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 48, n° 9, (2000), 4290 - 4293.
383. Çelik, S., Ozkaya, A., "Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂ O₂", BMB Reports, V. 35, n° 6, (2002), 547 - 552.
384. Santos, C.C.D.M.P., Salvadori, M.S., Mota, V.G., Costa, L.M., De Almeida, A.A.C., De Oliveira, G.A.L., Costa, J.P., De Sousa, D.P., De Freitas, R.M., De Almeida, R.N., "Antinociceptive and antioxidant activities of phytol *in vivo* and *in vitro* models", Neuroscience journal, V. 2013, (2013), 1 - 9.
385. Asokkumar, S., Naveenkumar, C., Raghunandhakumar, S., Kamaraj, S., Anandakumar, P., Jagan, S., Devaki, T., "Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo (a) pyrene-induced lung

- carcinogenesis in Swiss albino mice", *Molecular and cellular biochemistry*, V. 363, n°1-2, (2012), 335 - 345.
386. Dorman, H.D., Surai, P., Deans, S.G., "In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents", *Journal of essential oil Research*, V. 12, n° 2, (2000), 241 - 248.
387. Chaudhuri, R.K., Sticher, O., Winkler, T., "Structures of two highly oxygenated iridoid glucosides from *Globularia alypum*", *Tetrahedron Letters*, V. 20, n° 34, (1979), 3149 - 3152.
388. Boutiti, A., Benguerba, A., Kitouni, R., Bouhroum, M., Benayache, S., Benayache, F., "Secondary metabolites from *Globularia alypum*", *Chemistry of natural compounds*, V. 44, n° 4, (2008), 543 - 544.
389. Es-Safi, N.E., Khelifi, S., Kollmann, A., Kerhoas, L., El Abbouyi, A., Ducrot, P.H., "Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae)", *Chemical and pharmaceutical bulletin*, V. 54, n° 1, (2006), 85 - 88.
390. Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I.M., Quirantes-Piné, R., Rodríguez-Pérez, C., Madani, K., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., "Tentative Characterisation of Iridoids, Phenylethanoid Glycosides and Flavonoid Derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves by LC-ESI-QTOF-MS", *Phytochemical Analysis*, V. 25, n° 5, (2014), 389 - 398.
391. Harborne, J.B., Williams, C.A., "6-hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants", *Phytochemistry*, V. 10, n°2, (1971), 367 - 378.
392. Ben Hassine, B., Bui, A.M., Mighri, M., "Contribution à l'étude des plantes médicinales tunisiennes. Identification des acides Phénols de *Globularia alypum* L. par CCM bidimensionnelle et HPLC", *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, V. 7, (1982), 3 - 10.
393. Sertić, M., Crkvenčić, M., Mornar, A., Pilepić, K.H., Nigović, B., Maleš, Ž., "Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species", *Journal of Applied Botany and Food Quality*, V. 88, n° 1, (2015), 209 – 214.
394. Kirmızıbekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., "Phenylethyl glycosides from *Globularia alypum* growing in Turkey", *Helvetica Chimica Acta*, V. 91, n° 8, (2008), 1525 - 1532.

395. Merzouki, A., Ed-Derfoufi, F., Mesa, J.M., "Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco)", *Fitoterapia*, V. 71, n° 3, (2000), 278 - 307.
396. Hammiche, V., Maiza, K., "Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer", *Journal of ethnopharmacology*, V. 105, n° 3, (2006), 358 - 367.
397. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C., "Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea", *Journal of ethnopharmacology*, V. 35, n° 2, (1991), 123 - 143.
398. Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., "Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco", *Journal of ethnopharmacology*, V. 58, n° 1, (1997), 45 - 54.
399. Ouhaddou, H., Boubaker, H., Msanda, F., El Mousadik, A., "An ethnobotanical study of medicinal plants of the Agadir Ida Ou Tanane province (southwest Morocco)", *Journal of Applied Biosciences*, V. 84, n° 1, (2015), 7707 - 7722.
400. Bonet, M.A., Parada, M., Selga, A., Valles, J., "Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda and Les Guillerries (Catalonia, Iberian Peninsula)", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 68, n° 1, (1999), 145 - 168.
401. Chermat, S., Gharzouli, R., "Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria-An Empirical Knowledge in Djebel Zdim (Setif)", *Journal of Materials Science and Engineering*, V. 5, n° 1-2, (2015), 50 - 59.
402. Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyat, A., "Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco", *International Journal of Diabetes and Metabolism*, V. 10, (2002), 33 - 50.
403. Bouzabata, A., "Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District", *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, V. 5, n° 1, (2013), 12 - 20.
404. Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jouad, H., "Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region

- of Morocco (Tafilalet)", *Journal of ethnopharmacology*, V. 82, n° 2, (2002), 97 - 103.
405. Montanari, B., "Aromatic, Medicinal Plants and Vulnerability of Traditional Herbal Knowledge in a Berber Community of the High Atlas Mountains of Morocco", *Plant Diversity and Resources*, V. 3, (2014), 017.
406. Bousta, D., Boukhira, S., Aafi, A., Ghanmi, M., El Mansouri, L., "Ethnopharmacological Study of anti-diabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region)", *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, V. 2, n° 1, (2014), 75 - 79.
407. Orch, H., Douira, A., Zidane, L., "Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète, et des maladies cardiaques dans la région d'Izarène (Nord du Maroc)", *Journal of Applied Biosciences*, V. 86, n° 1, (2015), 7940 - 7956.
408. Carrió, E., Vallès, J., "Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea)", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 141, n° 3, (2012), 1021 - 1040.
409. Goetz, P., "Traitement des troubles de la libido masculine", *Phytothérapie*, V. 4, n° 1, (2006), 9 - 14.
410. Madani, S., Amel, B., Noui, H., Djamel, S., Abderrahim, B., "Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria)", *Flora*, V. 1, n° 1, (2015), 24 - 30.
411. Jaradat, N., "Ethnopharmacological survey of natural products in palestine", *An-Nadjah Univ. J. Res.*, V. 19, (2005), 13 - 67.
412. Fresquet, J.L., Aguirre, C., Baguena, M.J., Lopez, M.L., Tronchoni, J.A., "Plantes médicinales d'usage populaire dans la region de la Ribera Alta (Valencia, Espagne)", 2^e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, (mars 1996).
413. Graham, J. G., Quinn, M. L., Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R., "Plants used against cancer—an extension of the work of Jonathan Hartwell", *Journal of ethnopharmacology*, V. 73, n° 3, (2000), 347 - 377.