

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES
SCIENCES AGRONOMIQUES**



En vue de l'obtention du diplôme de Master II en biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

**Activité antileishmanienne des extraits aqueux
de l'Olivier, de l'Arbousier et du Pistachier**

Réalisé par : Melle : MEZINE Ouerdia

Melle : ZERROUKI Celia

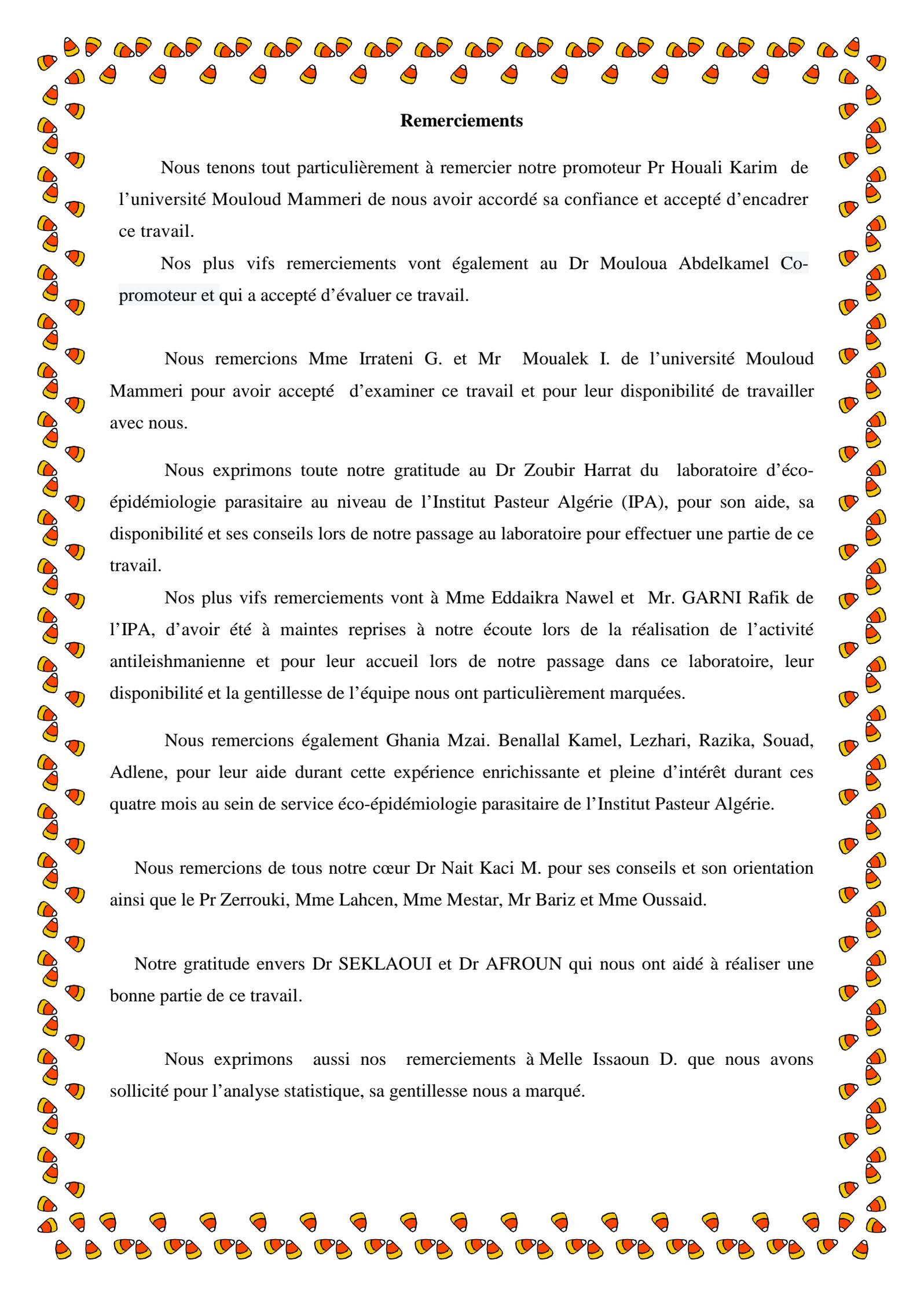
Soutenu le 26 Octobre 2015 devant le juré

Présidente Mme IRATNI Maitre assistante à UMMTO.

Promoteur Mr HOUALI Professeur à UMMTO.

Co-Promoteur Mr MOULOUA Maitre de conférences à UMMTO.

Examineur Mr MOUALEK Maitre assistant à UMMTO.



Remerciements

Nous tenons tout particulièrement à remercier notre promoteur Pr Houali Karim de l'université Mouloud Mammeri de nous avoir accordé sa confiance et accepté d'encadrer ce travail.

Nos plus vifs remerciements vont également au Dr Mouloua Abdelkamel Co-promoteur et qui a accepté d'évaluer ce travail.

Nous remercions Mme Irratani G. et Mr Moualek I. de l'université Mouloud Mammeri pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour leur disponibilité de travailler avec nous.

Nous exprimons toute notre gratitude au Dr Zoubir Harrat du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire au niveau de l'Institut Pasteur Algérie (IPA), pour son aide, sa disponibilité et ses conseils lors de notre passage au laboratoire pour effectuer une partie de ce travail.

Nos plus vifs remerciements vont à Mme Eddaikra Nawel et Mr. GARNI Rafik de l'IPA, d'avoir été à maintes reprises à notre écoute lors de la réalisation de l'activité antileishmanienne et pour leur accueil lors de notre passage dans ce laboratoire, leur disponibilité et la gentillesse de l'équipe nous ont particulièrement marquées.

Nous remercions également Ghania Mzai. Benallal Kamel, Lezhari, Razika, Souad, Adlene, pour leur aide durant cette expérience enrichissante et pleine d'intérêt durant ces quatre mois au sein de service éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur Algérie.

Nous remercions de tous notre cœur Dr Nait Kaci M. pour ses conseils et son orientation ainsi que le Pr Zerrouki, Mme Lahcen, Mme Mestar, Mr Bariz et Mme Oussaid.

Notre gratitude envers Dr SEKLAOUI et Dr AFROUN qui nous ont aidé à réaliser une bonne partie de ce travail.

Nous exprimons aussi nos remerciements à Melle Issaoun D. que nous avons sollicité pour l'analyse statistique, sa gentillesse nous a marqué.



Nous dédions ce modeste travail

*A ceux qui nous ont donné sans rien en retour,
A ceux qui nous ont encouragé et soutenu dans les moments difficiles
et ceux à qui nous devons tant.*

A nos chères familles

A tous nos ami(e)s

A IDRIS sans lequel ce travail n'aurait pas abouti.

*A nos parents, que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux
de nos profondes reconnaissances pour tout ce que vous avez fait.
Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à
la réalisation de ce travail.*

Un grand merci à tous

Table des matières

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction 1

Chapitre I : Etat de l'art

I. Les leishmanioses 3

I.1. Définition 3

I. 2. Historique 3

I.3. Epidémiologie 4

I.3.1. Le Parasite 4

I.3.1.1. Morphologie 4

I.3.1.2. Taxonomie 5

I.3. 2. Le Vecteur 6

I.3.2.1. Morphologie..... 6

I.3.2.2. Taxonomie 6

I.3. 2.3. Bio écologie 7

I.3. 2.4. Importance médicale 7

I. 3. 3. Le réservoir 8

I. 3. 4. Cycle de vie et morphologie 8

I.3.5. Répartition géographique 9

I.4. Physiopathologie 10

I.5. Immunologie 11

I.6. Formes cliniques 12

I.7. Diagnostic 15

I.8. Traitement 16

I.9. Prophylaxie 18

II. Plantes médicinales 20

1. Choix de plantes 20

1.1. Arbutus unedo L..... 20

1.1.1. Les propriétés et les caractéristiques d' <i>Arbutus unedo</i> L.	21
1.2. <i>Pistacia lentiscus</i>	22
1.2.1. Les propriétés et les caractéristiques du <i>Pistacia lentiscus</i>	22
1.3. <i>L'Olea europea</i>	23
1.3.1. Définition de <i>laperrinei</i>	23
1.3.2. Définition de <i>Silvestres</i>	23
1.3.3. Caractéristique biologiques et propriétés d' <i>Olea europea</i>	24

CHAPITRE II

Matériel et méthodes.....	25
1. Matériel.....	25
1.1. Matériel biologique.....	25
1.1.1. Les leishmanies.....	25
1.1.2. Les extraits de plantes.....	25
1.1.2.1. <i>Pistacia lentiscus</i>	25
1.1.2.2. Espèce : <i>Olea europea</i> sous espèce <i>Silvestres</i>	25
1.1.2.3. <i>Arbutus unedo</i> L.....	25
1.1.2.4. Espèce : <i>Olea europea</i> sous espèce <i>Laperrinei</i>	25
1.2. Matériels non biologique.....	26
1.2.1. Appareillage.....	26
1.2.2. Petit matériel et consommable.....	26
1.2.3. Réactifs et solutions.....	26
1.2.4. Les milieux de culture.....	26
2. Méthodes.....	27
2.1. Préparation des extraits de plantes.....	27
2.2. Préparation des milieux de cultures.....	27
2.3. Culture des leishmanies.....	27
2.4. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme promastigote <i>in vitro</i>	28
2.4.1 Détermination des IC50 (Criblage secondaire)... ..	29
2.5. Analyse statistique.....	29

CHAPITRE III

Résultats et discussion.

1. Résultats.....	30
1. L'activité antileishmanienne des cinq extraits végétaux sur <i>L.infantum</i>	30
1.1. Effet extrait de feuille et tige sur la forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i>	30
1.2. Effet extrait de feuille <i>Olea europea</i> (<i>Laperrinei</i> , <i>Silvestres</i>), <i>Pistacia lentiscus</i> et <i>Arbutus unedo</i> L sur la forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i>	31
1.3 Détermination des IC50	32
Discussion.....	33
Conclusion	35
Références bibliographiques	
Annexes.	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

CI₅₀ : concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire.

DAT : Agglutination directe.

DMSO : diméthyle sulfo-oxyde.

E : extrait.

E1 : Extrait de feuille de l'*Olea europea (Laperrinei)*.

E2 : Extrait de tige de L'*Olea europea (Laperrinei)*.

E3 : Extrait de feuille de *Pistacia lentiscus*.

E4 : Extrait de feuille d'*Arbutus unedo L.*

E5 : Extrait de feuille d'*Olea europea (Silvestres)*.

ELISA: Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay.

Gp63 : Glycoprotéine 63 Da.

IFI: Immunofluorescence indirect.

IPA : Institut Pasteur Algérie.

LC: Leishmaniose cutanée.

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse.

LCL : leishmaniose cutanée localisée.

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse.

LPG: Lipophosphoglycan.

LV : Leishmaniose viscérale.

MON : Montpellier.

NNN: Novy-Mac Neal-Nicolle.

OMS: Organisation Mondiale de la santé.

PCR: Polymérase Chain Réaction.

Rpm: Rotation par minute.

RPMI: Roswell Park Mémorial Park Institut.

Sb III: Antimoine trivalent.

SVF: Sérum veau foetal.

SPM : Système des Phagocytes Mononuclées.

T : Témoin.

TNF α : Facteur Nécrosant Des Tumeurs α .

Listes des figures

Figure 1. Formes promastigotes de leishmania	5
Figure 2. Formes amastigotes de leishmania	5
Figure 3. Phlébotome femelle gorgé de sang	6
Figure 4. Schéma représentatif de cycle de vie des leishmanies	9
Figure 5. Distribution mondiale des leishmanioses.	10
Figure 6. La leishmaniose cutanée localisée (LCL).....	13
Figure 7. La leishmaniose cutanée diffuse (LC	13
Figure 8. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).	14
Figure 9. La leishmaniose viscérale (LV).	14
Figure 10. <i>Arbutus unedo</i>	21
Figure 11. <i>Pistacia lentiscus</i> L	22
Figure 12. <i>Olea europea</i> sous espèce : <i>Laperrinei</i>	23
Figure 13. <i>Olea europea</i> sous espèce : <i>Silvestres</i>	24
Figure 14. Forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i> (LIPA 1227)	25
Figure 15. Préparation des extraits végétaux avec la suspension parasitaire.....	28
Figure 16. Préparation de la cellule se Thoma	28
Figure 17. Incubation des extraits végétaux avec la suspension parasitaire	29
Figure 18. Résultat du criblage primaire d' <i>Olea europea</i> (<i>Laperrinei</i>) feuille et tige sur la forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i>	30
Figure 19. Résultats du criblage primaire des extraits de feuille d' <i>Olea europea</i> (<i>Laperrinei</i> , <i>Silvestres</i>), <i>Arbutus unedo</i> L et <i>Pistacia lentiscus</i> sur la forme promastigote <i>Leishmania infantum</i>	31

Liste des tableaux

Tableau I: Résultat du criblage secondaire des (IC50) sur les formes promastigote.....	32
---	-----------

Les Leishmanioses sont des parasitoses aux conséquences socio-économiques lourdes. En effet les traitements disponibles requièrent pour la plupart une administration parentérale et sont coûteuses pour les populations concernées. La recherche de nouvelles molécules actives et moins toxiques est donc une nécessité. Dans l'intérêt de contribuer à la recherche des traitements alternatifs contre les leishmanioses, nous nous sommes intéressées à étudier l'activité antileishmanienne *in-vitro* de quatre plantes (*Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus*, *Olea europea* sous espèce : *Silvestres*, et *Olea europea* sous espèce : *Laperrinei*), sur les formes promastigotes de *Leishmania infantum* MON-1, responsable de la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose cutanée dans le nord. Les résultats obtenus démontrent que l'extrait brut de feuille d'*Olea europea* sous espèce *Silvestres* présente un effet leishmanicide très important avec un pourcentage de mortalité des promastigotes de 71,75%, suivi de l'extrait brut de feuille d'*Arbutus unedo* avec un pourcentage de mortalité de 69,5%. L'extrait brut de feuille d'*Olea europea* sous espèce *Laperrinei* montre aussi une activité antileishmanienne avec un pourcentage de mortalité de 57,56% de promastigotes, pour les extraits de feuille de *Pistacia lentiscus* et l'extrait brut de tige d'*Olea europea* sous-espèce : *Laperrinei* montrent une activité antileishmanienne inférieure aux autres extraits utilisés mais non négligeable avec un pourcentage de mortalité de promastigote respectivement de 43% et 45,67%.

Leishmaniasis are parasitoses with serious socio-economic consequences. Indeed, most available treatments require parenteral administration and are expensive for the concerned populations. Therefore, searching new active and less toxic molecules is a necessity. In the sake of contributing to research alternative treatments against leishmaniasis, we have been interested in studying the *in vitro* antileishmanial activity of four plant (*Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus*, *Olea europea* subspecies: *Silvestres*, *Olea europea* subspecies: *Laperrinei*) on promastigotes forms of *Leishmania infantum* MON-1, responsible for visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis in the north. Obtained results demonstrate that the *Olea europea* of crude leaf extract *Silvestres* subspece has a very important leishmanicide effect with promastigotes mortality rate of 71,75%, followed by *Arbutus unedo* leaf crude extract with 69,5% mortality rate. The *Olea europea* leaf crude extract *Laperrinei* subspece also shows antileishmanial activity with a rate of 57,56% promastigotes mortality. For *Pistacia lentiscus* leaf extracts and *Olea europea* rod crude extract subspecies: *Laperrinei* show antileishmanial activity lower than the other extracts used but with a significant promastigotes mortality rate, 43% and 45.67% respectively.

Introduction

Les leishmanioses représentent un groupe de maladies parasitaires d'expression clinique variée, dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ces affections sont transmises par un insecte vecteur, le phlébotome femelle. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions (Dejeux, 1996). L'Algérie, qui compte parmi les pays les plus touchés, est concernée par cette zoonose qui sévit à l'état endémique sous trois formes cliniques : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN) et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (Harrat et Belkaïd, 2002).

Les leishmanioses représentent un problème majeur en santé publique. Bien que des médicaments existent pour traiter ces maladies, ceux-ci ne sont pas toujours efficaces du fait leur toxicité et de l'apparition de parasites résistants. De plus, l'administration des traitements disponibles contre les leishmanioses s'effectue essentiellement par voie générale, ce qui nécessite une hospitalisation des patients. La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère par conséquent nécessaire (Founet et Muñoz, 2002).

Les extraits des végétaux demeurent la source principale de molécules ayant des activités anti microbienne. L'intérêt de plus en plus grandissant que la communauté scientifique accorde à ce volet de recherche est prometteur (Maria g.miguel et *al.*, 2014). En effet, plusieurs résultats intéressants sont publiés chaque année et vont tous dans le sens que les molécules d'origine végétale constituent un arsenal intéressant et incontournable pour la lutte contre les infections de tout genre (Mammeri, 2008).

Par ailleurs, la richesse et la diversité floristique de la région nord-africaine et particulièrement algérienne offre un vaste chantier d'études des espèces endémiques pour les chercheurs de différents domaines (Kolak et *al.*, 2009 ; Kabouche et *al.*, 2005 et Deineka et *al.*, 2004). C'est dans ce contexte d'idée que nous saisissons cette opportunité afin de lancer les bases d'une étude de l'effet des extraits de quatre plantes d'Algérie à savoir : l'olivier de Laperrine, l'olivier du nord, le pistachier et l'arbousier sur les leishmanies.

L'objectif principal de ce travail est l'étude de l'activité leishmanicide des extraits bruts d'*Olea europea* (Laperrinei, Silvetres), *Arbutus unedo* L et *Pistacia lentiscus*. Plantes fourni par le Laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies de l'Université Mouloud Mammeri. Nous avons étudié l'activité leishmanicide des extraits aqueux de l'olivier de Laperrine, l'olivier du nord, le pistachier et l'arbousier.

Dans un premier chapitre, on a développé une synthèse bibliographique sur les leishmanioses et les plantes choisies pour cette expérimentation. Le deuxième chapitre décrit les résultats et discussion des tests *in vitro* sur les promastigotes *leishmania infantum*, une conclusion et des perspectives viennent clore le travail.

Chapitre I : état de l'art

I. Les leishmanioses.

I.1. Définition.

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

I.2. Historique

Les leishmanioses font partie des premières parasitoses à avoir été décrites, du moins dans leur forme cutanée. Déjà dès la plus haute antiquité, au troisième millénaire avant J.C des statuettes présentaient des lésions caractéristiques de la face. AL Boukhari, médecin Ouzbek, décrivit au X^{ème} siècle, cette affection cutanée et Avicenne l'attribuait à une piqûre de moustique.

La première description clinique moderne est celle de Mc Naught en 1982 puis en 1985 Cunningham découvrit le parasite dans un prélèvement du bouton d'Orient (Jarry, 1999).

Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* par Sir Ronald Ross en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (Roberts et Janovy, 2000, cité par Forget, 2004).

La première culture fut obtenue par Nicolle en 1908, il compare les organismes de la peau décrits par Wright avec ceux de la rate découverts en 1903 par Leishman et Donovan et conclut qu'ils sont presque identiques du point de vue morphologique.

En 1921, les frères Sargent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur les scarifications cutanées.

Mais la transmission par la pique ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber.Knowles, en 1924, l'établit pour le kala-azar, Parrot et Donatien le font pour la leishmaniose canine en 1930 (Mazlet, 2004).

En Algérie, le premier cas de leishmaniose cutanée appelé « clou de Biskra » a été décrit par Hamel en 1860 à Biskra, alors que le premier cas de leishmaniose viscérale a été décrit en 1911 par Lemaire en Kabylie.

En 1990, Rioux et *al*, présentent une nouvelle classification des *Leishmania*, basée sur les caractères biochimiques et le profil iso-enzymatique des souches des différent complexes.

En 2002, Papierok *et al* ainsi que Hugnet *et al*, démontrent que l'administration d'antigènes d'excrétion-sécrétion de promastigote (brevet Institut de recherche pour le développement et laboratoire Bio Vétro Test) induit une réaction immunitaire de type Th1 à l'encontre des Leishmanies amastigotes intramacrophagiques (Mouloua et *al.*, 2014). En 2011, le groupe Vibrac commercialise en France ce même vaccin sous le nom de Canileish (Mouloua et *al.*, 2014).

I.3. Epidémiologie

I.3.1. le parasite

I.3.1.1. Morphologie

Les Leishmanies sont des parasites dimorphiques se présentant sous forme non flagellée intracellulaire, dite amastigote, chez le mammifère, et sous forme flagellée, dite promastigote, libre dans le tube digestif du phlébotome vecteur.

Les promastigotes présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 µm de longueur et de 4 µm de largeur prolongé par un flagelle qui peut atteindre 20 µm de longueur et qui émerge de leur pole antérieur.

Les amastigotes nichent à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein des vacuoles dites parasitophores (VP). A ce stade, les leishmanies présentent un corps beaucoup plus ramassé d'environ 4µm de long et 2 µm de large (Figure 01 et 02).



Figure 01 : formes promastigotes de leishmania (anonyme 1).

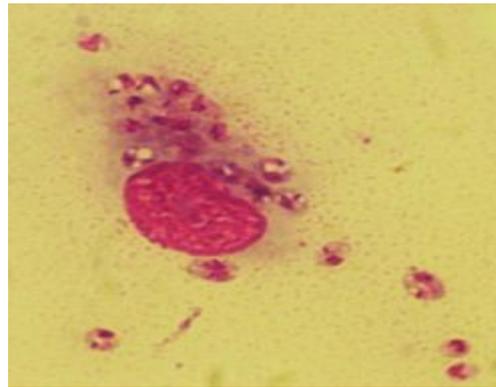


Figure 02 : formes amastigotes de leishmania (anonyme 2).

I.3.1.2. Taxonomie

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* (Ross, 1903) la place de ce genre dans la classification de Levine *et al.* (1980) est la suivante :

Règne : Protista Haeckel, 1866.

Sous-règne: Protozoa Golfuss, 1817 emend Siebold, 1848.

Embranchement: Mastigophora Diesing, 1866.

Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909.

Ordre: Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend Vickerman, 1976.

Sous-ordre: Trypanosomatina Kent, 1880.

Famille: Trypanosomatidae Döflein, 1901 emend. Grobben, 1905.

Genre : *Leishmania*, Ross, 1903.

Les différentes espèces de leishmanies sont difficiles à distinguer morphologiquement aussi bien au stade amastigote qu'au stade promastigote. De ce fait, au niveau infra générique, elles ont toujours posé des problèmes d'identification et par voie de conséquence de classification.

I.3.2. Le vecteur

I.3.2.1. Morphologie

Il représente un maillon important dans la chaîne de transmission. Les phlébotomes sont des diptères nématocères de la famille des Psychodidae, ils sont, à l'état adulte, des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps : 1,5 à 4mm). De couleur claire, en général jaune paille, leur corps est couvert de soies et ils présentent des ailes lancéolées dressées. Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne. Seule la femelle, hémaphage, assure la transmission de la leishmaniose. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier (Dedet, 2001) (Figure 03).



Figure 03 : Phlébotome femelle gorgé de sang (Dedet, 2001).

I.3.2.2. Taxonomie

Position systématique selon Dolmatova et Demina (1971)

Règne :	Animalia
Embranchement :	Arthropoda
Sous-embranchement :	Hexapoda
Classe :	Insecta
Sous-Classe :	Pterygota
Super-Ordre :	Endopterygota
Ordre :	Diptera
Famille :	Psychodidae

Sous-Famille Phlebotomina
Genre : *Phlebotomus* (Loew, 1845)

Selon Bitam (2010) plus de 24 espèces de phlébotomes sont répertoriées en Algérie, quatre d'entre elles sont impliquées dans la transmission de cette parasitose, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlébotomus perfiliewi*, *Phlebotomus longicuspis* et *Phlebotomus papatasi*.

I.3.2.3. Bio-écologie

Ils présentent un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago. Les phlébotomes ont une activité essentiellement nocturne et crépusculaire, mais très sensibles aux courants d'air, ils ne sortent que lorsque la soirée est calme. Durant la journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités. Dans les régions tropicales ils sont actifs toute l'année, alors que dans les régions tempérées, ils disparaissent l'hiver, la pérennité de l'espèce étant assurée par les larves hibernantes de stade IV. Leur densité, leur période et leur disparition varient suivant l'altitude, la saison et l'espèce (Abonnenc, 1972). La majorité des informations connues sur le comportement des phlébotomes provient d'observation en laboratoire (Killick-Kendrick, 1999).

I.3.2.4. Importance médicale

L'importance médicale des phlébotomes tient au rôle vecteur de certaines espèces dans la transmission d'affections humaines et animales. Elles peuvent, à la faveur d'expositions répétées à la piqûre, provoquer des réactions allergiques mais sont plus connus pour transmettre des agents pathogènes au premier rang desquels figurent des parasites (leishmanies), des bactéries (bartonelle) et des arbovirus.

Il existe un genre prédominant dans le nouveau Monde, *Lutzomyia* et un dans l'Ancien monde, *Phlebotomus* qui sont responsables d'à peu près toutes les transmissions connues des *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990). La distribution de ces insectes est très vaste et s'étend sur les cinq continents. Plus de 600 espèces sont répertoriées à travers le monde, dont 70 sont impliquées dans la transmission de la leishmaniose (Guerrini, 1993). La piqure est de type telmophage et douloureuse, mais l'intensité de la réaction de l'hôte varie selon l'espèce de phlébotome en cause (douleur, apparition d'une papule ou d'une tache hémorragique). Bien qu'il puisse y avoir plusieurs espèces de *Leishmania* dans la niche écologique d'une espèce vectrice, celle-ci ne transmettra pas nécessairement toutes les espèces de parasites de façon

aléatoire. En effet, il semble que l'association vecteurs-parasites soit spécifique (Killick-Kendrick, 1985). La susceptibilité ou la résistance d'une espèce de phlébotome donnée au développement d'un parasite en particulier semble dépendre de la capacité de celui-ci à surmonter certains obstacles tels les enzymes digestives de l'intestin médian, la membrane péritrophique entourant le repas sanguin et finalement l'excrétion du contenu de l'intestin médian suite à la digestion (Sacks, 2001).

I.3.3. Les réservoirs

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

Ces mammifères appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés et primates dont l'homme qui est parfois l'unique réservoir du parasite dans certains foyers (Dereure, 1999).

On peut qualifier les leishmanioses d'anthroponoses ou de zoonoses selon que l'humain soit l'hôte direct ou l'hôte accidentel du parasite. En effet, certains vecteurs sont attirés par l'humain alors que la majorité a plutôt tendance à infecter d'autres mammifères. Ceux-ci varient selon l'habitat. Les réservoirs présents dans le Nouveau Monde sont entre autres les paresseux, les lapins, les primates et les chauves-souris (Pinto et *al.*, 2001). Dans l'Ancien Monde, ce sont surtout les petits rongeurs et les canidés (Who, 2002).

Le chien est le principal réservoir de la leishmaniose viscérale dans les pays méditerranéens (Dedet, 1994 ; Euzeby, 1994), il héberge les leishmanies dans le derme même en l'absence de lésions cutanées. Chez l'homme par contre, ces parasites ne sont pratiquement jamais trouvés à ce niveau, excepté chez les immunodéficients (Bussiéras et Chermette, 1992).

I.3.4. Cycle de vie et morphologie

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, l'insecte phlébotome et un mammifère. Il se présente chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux : les promastigotes et les amastigotes. Lorsque la femelle de phlébotome infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, (1) elle salive au site piqure et régurgite le sang qui se contamine au contact des parasites, sous forme promastigotes, qui obstruent la valvule stomodéale. Chez l'hôte mammifère, *Leishmania* infecte ensuite un phagocyte du système phagocytaire mononuclé (2) et se transforme en

Amastigote (3). Les amastigotes, nichent à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores. Ces amastigotes se multiplient par division binaire dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé (4). Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par des cellules avoisinantes où le processus se poursuit. Le cycle est achevé lorsqu'une autre femelle de phlébotome prend un repas sanguin du site d'infection et prélève des phagocytes contenant les *Leishmania* (5). Dans le tube digestif de l'arthropode (6), les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures (7). Ces promastigotes se multiplient et migrent vers les glandes salivaires et la trompe en attendant un nouveau repas sanguin (8) (Antoine *et al.*, 1999) (figure 04).

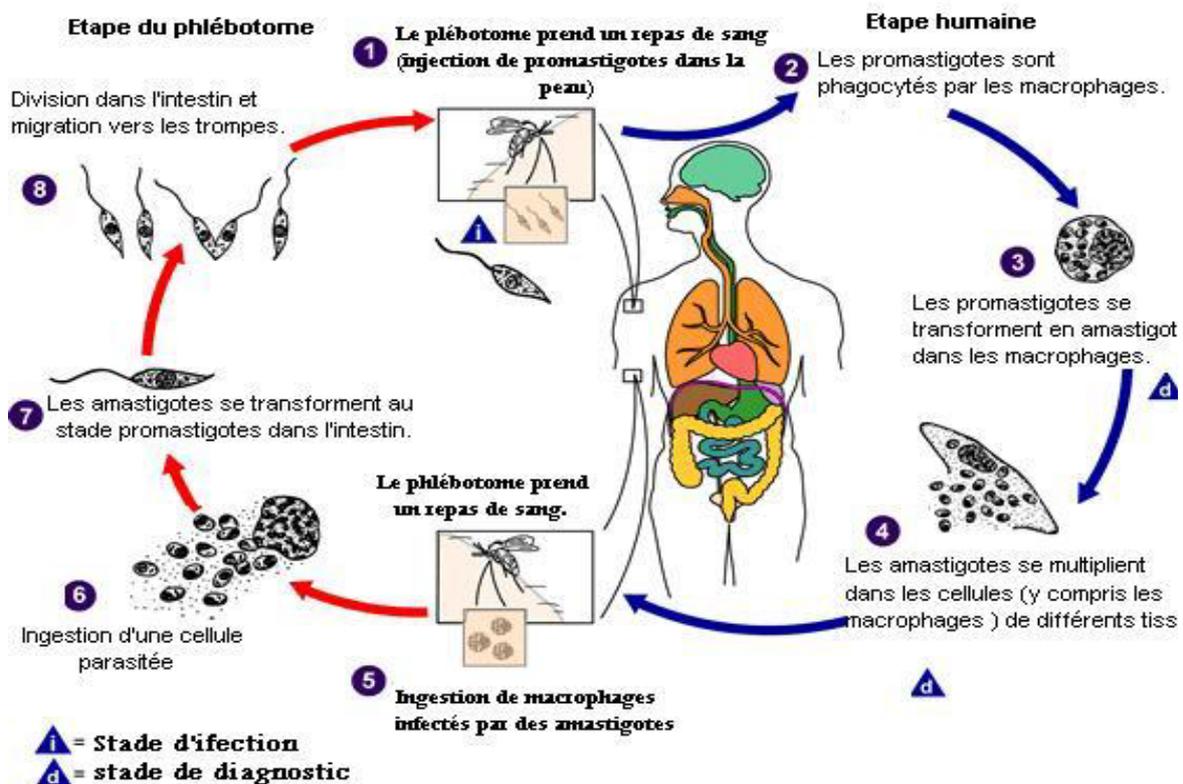


Figure 04 : schéma représentatif de cycle de vie des leishmanies (Chappuis, 2006)

I.3.5. Répartition géographique

Leishmania est un parasite de vaste distribution géographique, il est retrouvé en Asie, en Afrique, en Amérique du Sud et Centrale et en Europe, particulièrement autour du bassin méditerranéen. Les différentes espèces infectent plus de 15 millions de personnes et on dénombre deux millions de nouveaux cas chaque année (Mark Ouellette *et al.*, 2003).

La maladie affecte 88 pays : 22 dans le Nouveau Monde et 66 dans l'Ancien Monde, les pays les plus touchés par la leishmaniose viscérale sont le Bangladesh, le Brésil, L'Inde, Le Népal et le Soudan (Who, 2000).

On distingue deux grandes situations géographiques, l'Ancien Monde (Sud de L'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amérique du Nord, du Sud et Centrale).

Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes, mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania* (Olivier et al., 2005) (Figure 05).

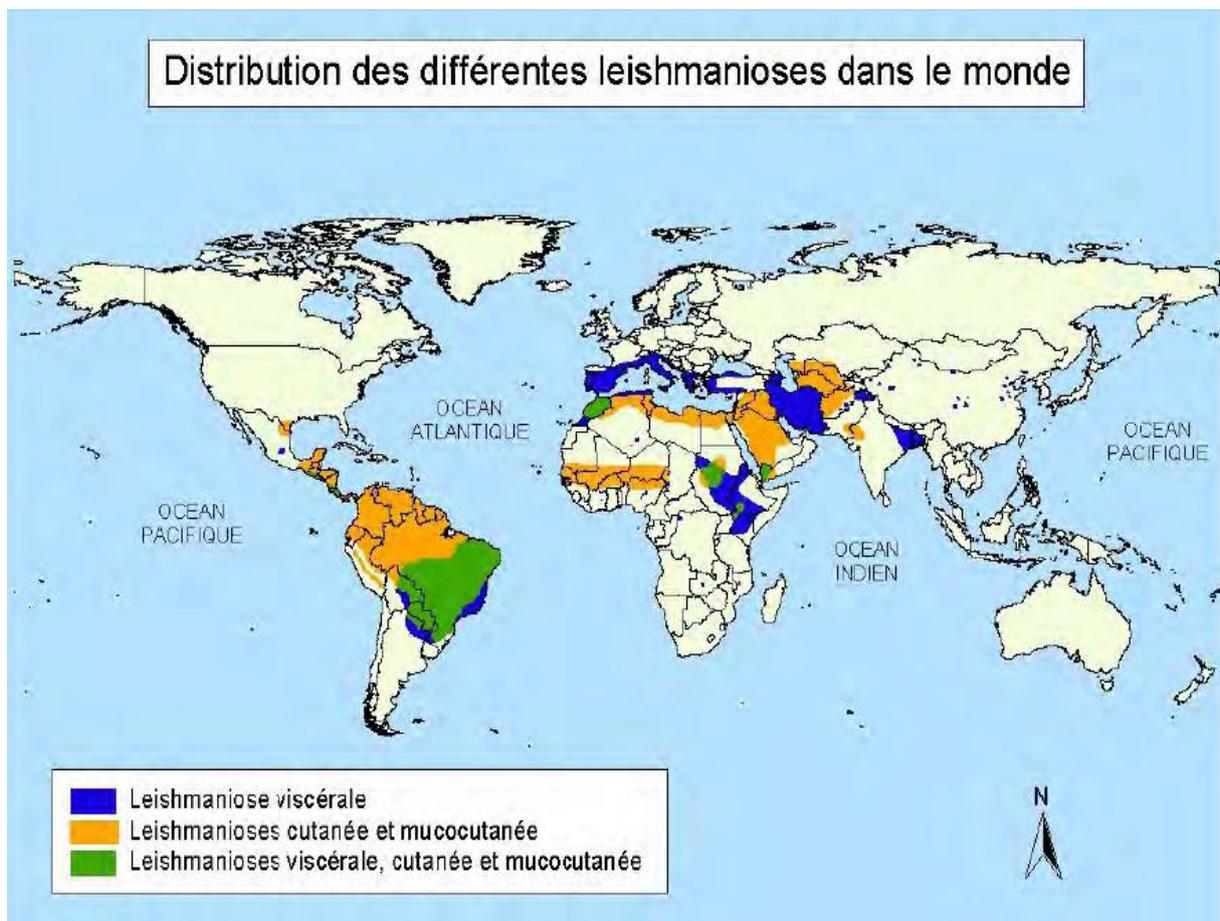


Figure 05 : Distribution mondiale des leishmanioses (Handman, 2001).

I.4. Physiopathologie

Par régurgitation, le phlébotome libère le promastigote au site de piqûre. Une réaction inflammatoire se déclenche et entraîne l'activation des protéines de l'inflammation ainsi que l'opsonisation et la phagocytose des parasites par les macrophages. Les macrophages envahis, induisent la production de facteurs chimiotactiques et de cytokines (TNF α , Interleukines). Le

métabolisme oxydatif produit des dérivés de l'oxygène et du monoxyde d'azote, toxiques pour les protozoaires. Les parasites possèdent des mécanismes d'échappement à tous les niveaux des systèmes immunitaires de défense mis en place par le vertébré infecté (Guillaume, 2009).

I.5. Immunologie

Immunité humorale

La présence des parasites à l'intérieur des macrophages soustrait les amastigotes à l'action des facteurs sériques spécifiques (anticorps) ou non spécifiques (complément). L'activation du complément permet la formation des complexes immuns circulants faisant intervenir les Immunoglobulines : IgA, IgG et IgM (Ben Ghazi, 2010).

Immunité cellulaire

Comme tout autre agent pathogène les leishmanies doivent faire face à trois mécanismes ancestraux de défense de l'hôte :

La lyse par le complément

Le parasite déjoue les mécanismes de lutte de l'organisme humain par le biais de certaines de ces protéines membranaires comme la LPG (qui empêche par son élongation l'insertion du complexe d'attaque membranaire sur la membrane parasitaire) et la glycoprotéine gp63 (dotée d'une activité protéolytique vis-à-vis de C3b) (Najma, 2008).

Les macrophages

Les leishmanies bloquent partiellement la production des dérivés actifs d'oxygène grâce au LPG et la gp63 en agissant sur la protéine kinase C. Elles inhibent également la production du monoxyde d'azote grâce aux glyco-inositol-phospholipides qui se trouvent dans la membrane du parasite (Najma, 2008).

Les lymphocytes T

Cellule T helper qui joue un rôle dans l'hypersensibilité retardée et les cellules T cytotoxiques (Najma, 2008).

I.6. Formes clinique

La plupart des leishmanioses sont zoonotiques et les hommes ne sont infectés que lorsqu'ils s'exposent accidentellement au cycle naturel de la transmission. Toutefois, dans les formes anthroponotique (transmission d'une personne à l'autre par l'intermédiaire du phlébotome). L'Homme est l'unique réservoir (Maloirrie, 2004).

La leishmaniose cutanée

Selon l'origine géographique on distingue dans l'Ancien Monde la leishmaniose cutanée zoonotique due à *Leishmania major* avec des rongeurs sauvages comme réservoirs et la leishmaniose cutanée anthroponotique due à *Leishmania tropica*. Elles sévissent par épidémie, s'opposant ainsi à la leishmaniose cutanée sporadique due à *Leishmania infantum*. En Afrique de l'Est on observe aussi *Leishmania aethiopica*. Dans le Nouveau Monde, les LC sont principalement dues à des espèces à large distribution sud-américaine (*Leishmania amazonensis* et *Leishmania guyanensis*) ou à des espèces limitées à l'Amérique Centrale (*Leishmania mexicana* et *Leishmania panamensis*). L'incidence annuelle mondiale est difficile à estimer (environ 1 million de cas nouveaux par an) (Marty *et al.*, 2002).

La leishmaniose cutanée localisée (LCL)

C'est le classique bouton d'orient ou autres dénominations vernaculaires en Afrique du Nord et Asie méridionale. Les espèces dermatropes sont nombreuses. Toutes les espèces anthropophiles de *Leishmania* peuvent être responsables de leishmaniose cutanée, y compris les espèces habituellement viscérotropes comme *L.infantum*, qui peut provoquer un grand nombre d'ulcérations dermiques jusqu'à 200 dans certains cas sur les parties exposée du corps, comme le visage, les bras, ce qui entraîne un grave handicap et laisse au malade des cicatrices indélébiles (Mallorie, 2004) (figure 06).



Figure 06 : La leishmaniose cutanée localisée (LCL) (ANOFEL, 2014).

La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

Cette forme produit des lésions cutanées étendues nodulaires, non ulcérées, anergiques, Pseudolépromateuses, et particulièrement difficiles à traiter. Cette forme de la maladie est attribuée aux espèces *L. aethiopica* et *L. amazonensis* (Bachi, 2006) (figure 07).



Figure 07 : La leishmaniose cutanée diffuse (LCD) (ANOFEL, 2014).

La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

Limitée géographiquement au continent sud-américain, la LCM, appelée Espundia, est due aux espèces appartenant au complexe *L. braziliensis* (Mihoubi, 2006). C'est une atteinte cutanée initiale classique, puis 1 à 40 ans plus tard, apparaissent des métastases muqueuses de

la sphère ORL (nez, bouche), entraînant une perforation de la cloison nasale (Sacks *et al*, 2001) (figure 08).

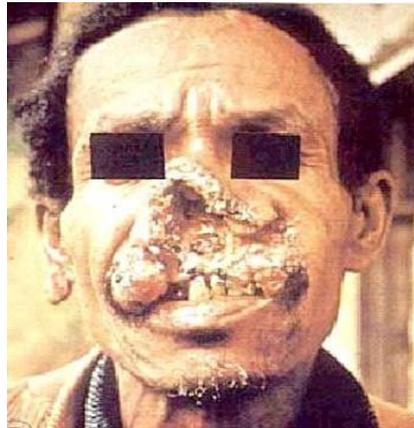


Figure 08 : la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) (ANOFEL, 2014).

La leishmaniose viscérale

Appelée également Kala-azar, pour la forme indienne, c'est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l'absence de traitement. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulière, une perte de poids importante, une hépatosplénomégalie (augmentation du volume de la rate et du foie) et de l'anémie. Il existe deux formes cliniques de leishmaniose viscérale : la LV infantile et la LV de l'adulte, l'agent causal étant *Leishmania infantum* (Ramli, 2013) (figure 09).



Figure 09 : la leishmaniose viscérale (LV) (anonyme 3)

I.7. Diagnostic

Examen direct

La méthode classique pour diagnostiquer les leishmanioses est l'identification de corps de Leishman-Donovan (amastigotes) à l'intérieur de phagocytes des patients.

Pour la leishmaniose cutanée et mucocutanée, on fait normalement un frottis de la plaie. Pour la leishmaniose viscérale, on a plutôt recours à une ponction de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques. Les ponctions de rate sont les plus efficaces mais il faut toutefois être prudent puisqu'elles peuvent être contre indiquées et dangereuses dans certains cas (Guerin *et al.*, 2002). Comme cette intervention nécessite des tests préalables et parfois des transfusions sanguines, elle ne peut s'effectuer dans les petits centres de santé (Boelaert *et al.*, 1999b). Il est également conseillé de faire la culture des échantillons pour augmenter le nombre de parasites présents car l'identification des amastigotes au microscope n'est pas toujours possible (Roberts et Janovy, 2000).

Recherche de l'ADN parasitaire

La recherche de l'ADN du parasite dans un prélèvement par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est testée dans plusieurs centres. Cette méthode a permis de diagnostiquer avec succès la leishmaniose viscérale (Cascia *et al.*, 2002; Pizzuto *et al.*, 2001) et est maintenant sensible à la présence d'un seul parasite (Salotra *et al.*, 2001). Par contre, ce n'est pas une méthode bien adaptée aux petits centres.

Examen indirect

Plusieurs méthodes immunologiques existent, notamment certains tests ELISA et d'agglutination directe (DAT) détectent les anticorps anti- *leishmania* produits par le patient. Les tests ELISA sont très sensibles et spécifiques (98% à 100%) mais il n'existe toujours pas de trousse commerciale (Guerin *et al.*, 2002). Quant au test DAT, il est bien adapté aux situations de terrain et a un bon rapport qualité-prix (Boelaert *et al.*, 1999b); malheureusement, la reproductibilité n'est pas très grande puisque la lecture des résultats n'est pas standardisée d'un endroit à l'autre et parce que l'antigène utilisé est facilement altéré par la chaleur (Boelaert *et al.*, 1999a). Une dernière méthode sérologique utilisée en Inde est

L'immuno-chromatographie avec un antigène recombinant (K39); elle est très sensible et spécifique (Sundar et al., 1998). Toutes les méthodes sérologiques ne sont pas très utiles à la détection de leishmaniose cutanée due au faible taux d'anticorps produits mais conviennent à la leishmaniose viscérale (Herwaldt, 1999).

L'immunofluorescence indirecte est considérée comme la méthode sérologique de référence par L'Office International des Epizooties, utilisée dans des études épidémiologique, ainsi que pour le diagnostique et le suivi des patients (Maia et Campino, 2008).

Elle utilise des formes promastigotes de culture comme antigène et des réactifs spécifique d'espèce (anti-IgG de chien). Le test est manuel et sa lecture subjective. Sa mise en œuvre nécessite de bonnes compétences techniques de la part du laboratoire, et le test est assez laborieux puisqu'il nécessite des dilutions en série. Les échantillons montrant une fluorescence verte sont considérés comme positifs, alors que ceux de couleur rouge mate sont dits négatifs. Le seuil de positivité est fixé par le laboratoire, mais il est habituellement de 1/80 ou 1/100. (Maia et al., 2008).

I.8. Traitement

I.8.1. Traitement de première intention

Chez l'Homme, la réponse immunitaire est une clé importante pour le développement de la maladie. Les différences des cas cliniques sont associées aux différentes espèces de *Leishmania* et à l'état immunologique du patient (Ouellette, M., et al., 2003) le N-méthyl glucamine (Glucantime®) est le médicament de première intention pour le traitement des leishmanioses en Algérie.

Les cliniciens ne disposent que d'un dérivé pentavalent de l'antimoine, le N-méthyl-glucamine (Glucantime®), pour les deux formes cliniques. Cette molécule, malgré sa toxicité, reste efficace, dans le traitement de la leishmaniose viscérale et selon un protocole qui suit les recommandations de l'OMS, soit 20mg de Sb /Kg/j pendant 30 jours en intramusculaire profonde (Bachi, 2006).

I.8.2.1. Traitement de seconde intention

Les traitements de seconde intention sont l'usage de l'amphotéricine B ou de la pentamidine. Ce sont de puissants antifongiques capables de modifier la perméabilité de la membrane

parasitaire en agissant sur l'ergostérol par affinité permettant la formation de pores aqueux mais aussi capables de stimuler la production d'IL en agissant sur les récepteurs Tolllike (Sau *et al.*, 2003). La pentamidine bloque, quant à elle, la thymidine synthétase et par conséquent la synthèse de l'ADN parasite et se fixe sur l'ARN de transfert. Il semblerait que la cible de la pentamidine soit un composant de la mitochondrie (Basselin *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2006). Ces médicaments présentent une toxicité supérieure à celle des sels d'antimoine et nécessitent une prise en charge hospitalière. Le traitement par AmBisome, amphotéricine B liposomale, moins toxique, ne présente quasiment pas d'effet (Who, 2007).

I.8.3. Nouveaux traitements

De nouveaux produits ont montré récemment des résultats très intéressants, notamment la miltéfosine dont le mode d'action n'est pas encore totalement déterminé mais qui laisse supposer une action sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine (Croft et Coombs, 2003). L'avantage de ce médicament est qu'il permet un traitement oral (2,5 mg/kg/jour) avec des effets secondaires négligeables et présente des taux de réussite allant de 71% (Bolivie) jusqu'à plus de 90% (Colombie 94%, Inde 98%) (Berman, 2005; Soto *et al.*, 2008).

La sitamaquine qui est un analogue de la primaquine, est administrée par voie orale. Des essais cliniques en phase II ont démontré différents résultats contre la LV. Au Brésil, il a été démontré que le composé n'avait aucune efficacité et était néphrotoxique pour des doses supérieures à 2,5 mg/kg/jour alors qu'au Kenya ou en Inde le taux d'efficacité était supérieur à 83% (Croft et Coombs, 2003 ; Wasunna *et al.*, 2005; Jha *et al.*, 2005).

L'imiquimod est une quinoline qui induit la production d'oxyde nitrique. Il est normalement utilisé contre les verrues génitales sous forme de crème. Une activité antileishmanienne a été démontrée " *in vivo* " sur des modèles de souris (Buates, et Matlashewski, 2001). Ce médicament a été testé topiquement en combinaison avec des sels d'antimoine et a démontré un gain de temps de cicatrisation pour les patients atteints de LC (Berman, 2005).

La paromomycine, un antibiotique aminoglycosidique, a démontré son efficacité en combinaison avec des antimoine par voie parentérale (Berman, 2003). De plus, des formulations sous forme de crème mélangée avec la gentamicine ont démontré un taux d'efficacité de 64% en Colombie (Croft et Coombs, 2003).

I.8.4. Recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques contre les leishmanioses

La médecine traditionnelle joue un rôle significatif dans le processus de découverte de nouvelles thérapeutiques. Les plantes offrent une source de molécules actives contre plusieurs protozoaires responsables de différentes maladies, comme par exemple le cas de la quinine, alcaloïde antipaludéen issue du genre *Cinchona*. Ensuite, nous pouvons remarquer le cas d'une lactone sesquiterpénique antipaludéenne, l'artémisinine, qui est obtenue du genre *Artemisia* ainsi que l'émétine, un alcaloïde actif contre les amibiases issu du genre *Cephaelis* (Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; de Carvalho et Ferreira, 2001; Fournet et Munoz, 2002).

Plusieurs revues ont déjà été publiées au sujet des métabolites végétaux actifs sur *Leishmania* (Akendengue et al, 1999 ; Fournet et Munoz, 2002 ; Kaiser et al, 2003 a ; Davies et Kedzierski, 2005 ; Rocha et al, 2005 ; Ioset, 2008 ; Mishra et al, 2009).

Les métabolites secondaires des végétaux dotés d'activités leishmanicide peuvent être classés selon leur structure chimique, comme énoncé par (Akendengue et al., 1999).

I.9. Prophylaxie

I.9.1. Prophylaxie individuelle

Plusieurs mesures de prophylaxie individuelle permettent d'éviter la piqûre par le phlébotome tels que :

- a. Limitation des activités à l'extérieur après la tombée de la nuit.
- b. Portage de vêtements protecteurs.
- c. Désinsectisation intra domiciliaire « house spraying ».
- d. Usage de moustiquaires imprégnées pour l'homme et colliers insecticides pour les chiens.

I.9.2. Prophylaxie collective

I.9.2.1. Elimination des réservoirs

Action sur le réservoir humain

Dépistage : le dépistage actif ou passif des cas de leishmaniose viscérale est difficile à réaliser du fait de la similitude du tableau clinique avec les affections fébriles associant une splénomégalie.

Traitement : reste le seul moyen efficace pour éradiquer le réservoir humain.

Enquête épidémiologique : elle doit être réalisée :

- a. Chez les populations à risque.
- b. Dans les zones appartenant à une même strate à risque.
- d. A la suite de déclaration de nouveaux cas dans une région jusque-là indemne.

Education pour la santé : un programme d'éducation pour la santé doit être associé pour accroître la prise de conscience des populations exposées et promouvoir les mesures de lutte au niveau local.

Action sur le réservoir animal

Les chiens constituent le principal réservoir domestique et le dépistage de masse repose sur la sérologie. En cas de positivité, les chiens doivent être abattus. La stratégie actuelle d'élimination n'est pas satisfaisante car elle ne produit qu'un effet passager. En Europe, il est parfois suggéré de traiter les chiens de façon répétée avec les antimonies pentavalents, mais l'on considère que cette méthode n'est pas totalement excellente, car, dans la mesure où les mêmes médicaments sont utilisés pour traiter la leishmaniose humaine, cela pourrait entraîner l'apparition de parasites résistants. En outre, le traitement des chiens même s'il est financièrement possible, n'a aucune efficacité partielle : la plupart des animaux font des rechutes (Benghazi, 2010).

I.9.2.2 .Lutte contre les vecteurs

En raison des difficultés d'identification des lieux de ponte de phlébotomes, il est pratiquement impossible d'envisager une stratégie de lutte anti larvaire.

Cependant, l'élimination des gîtes larvaires effectifs ou potentiels de phlébotomes contribue à l'élimination des populations des vecteurs. ; Par la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent dans les maisons et les gîtes des animaux (Benghazi, 2010).

Partie II : les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes dont un des organes (feuille, écorce) possède des vertus curatives et parfois toxiques selon son dosage. Les plantes médicinales sont les plantes utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs, elles peuvent être vendues en herboristerie, en pharmacie, avec ou sans prescription selon la réglementation du pays (Ramli, 2013).

Les plantes médicinales présente un très grand intérêt qui est :

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

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutique de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires (Carillon, 2000). Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuse pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutique (Fouché et al, 2000)

I. Choix des plantes

I. 1. *Arbutus unedo* L

Arbutus est un arbre décoratif à écorce brunâtre pour l'adulte, celle des jeunes rameaux est rougeâtre; feuilles lancéolées simples, luisantes, à bords finement denticulés, coriaces ; inflorescences en grappes terminales lâches ; périanthe à corolle blanche en forme de grelot et à calice très court ; 10 étamines incluses ; fruits (arbouses) globuleux charnus, densément verruqueux, rouge orangé à maturité, comestibles ; saveur acidulée. L'arbousier est caractérisé par la lenteur de ses fruits à se développer, si bien qu'ils coïncident avec la floraison suivante. Arbuste méditerranéen des maquis et des garrigues, il croît parmi les chênes Kermès, commun sur le littoral tellien (Baba Aissa, 2013) (figure 10).



Figure 10: *Arbutus unedo* L (anonyme 4).

I.1.1. Les caractéristiques et les propriétés d'*Arbutus unedo* L

C'est un arbre très intéressant parce qu'il résiste bien au gel jusqu'à des températures de -15°C , et qu'il s'adapte à une très large gamme de sols et d'expositions. Il pousse en plein soleil, voire en arbre de sous-bois et il supporte le calcaire (Morris, 2007)

Les feuilles de l'arbousier sont persistantes, ovales-lancéolées, sont coriaces, glabres et luisantes. Il produit de belles fleurs blanches en novembre et décembre (anonyme, 2007) en forme de clochettes regroupées en panicules terminales, régulières, bisexuées, calice à lobes triangulaires très courts, corolle en grelot, rétrécie au sommet du tube d'un blanc-rosé ou verdâtre (Quezel et Santa, 1963; Boullard, 1997; Boullard, 2001).

L'arbousier commun a des propriétés astringentes efficaces en cas de diarrhée et de dysenterie, et antiseptiques, pour soigner cystite et urétrite. En gargarisme, il soulage les maux de gorge (Iserin, 2001). Les feuilles persistantes dentées et écorce rougeâtre sont tenues pour antiseptiques, antispasmodiques et astringentes (par leur teneur en tanin), aussi les recommande-t-on en cas de diarrhée ou d'engorgement du foie (Boullard, 2001).

Une forte activité antioxydante a été mise en évidence par Pabuçcuoglu et ces collaborateurs en 2003 sur les extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles de l'*A. unedo* L et il a été conclu que les glycosides flavonols et les tannins sont les principes actifs responsables de cette activité (Pabuçcuoglu, 2003). Les extraits de feuilles d'*Arbutus unedo* L ont montré des activités antimicrobiennes, principalement contre les bactéries Gram-positives (Orak et al., 2011 ; El Ouarti et al., 2012), *Helicobacter pylori* et *Klebsiella pneumoniae* (Ferreira et al., 2012), effet antifongique contre deux moules aflatoxigènes à savoir *Aspergillus parasiticus* de NRRL 2999 et NRRL 465 (Orak et al., 2011) et contre *Candida tropicalis* (Ferreira et al., 2012) ; activité anti-mycobactérienne intracellulaire sans effet toxique sur macrophages, en

particulier l'extrait éthanolique (El Ouarti et *al.*, 2012) ; l'activité anti-leishmaniose vitro, principalement de l'extrait éthanolique (Kivcak et *al.*, 2009) ; activité in vitro contre *Trichomonas vaginalis* trophozoïtes, principalement l'extrait d'acétate d'éthyle (Ertabaklar, et *al.*, 2009)

I. 2. *Pistacia lentiscus* L.

L'Arbre au mastic, ou Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus*) est un arbuste poussant dans les garrigues et les maquis des climats méditerranéens. Plante de la famille des Anacardiaceae, à feuillage persistant, elle donne des fruits, d'abord rouges, puis noirs (figure 11).



Figure 11 : *Pistacia lentiscus* (anonyme 5)

I.2.1. Caractéristiques et propriétés du *Pistacia lentiscus*

Les feuilles et les jeunes pousses sont utilisées en médecine pour leurs propriétés astringentes. Principale utilité vient de l'extraction de sa résine aromatique qui est employée comme vernis, ciment dentaire, ainsi que gomme à mastiquer pour fortifier les gencives et rafraîchir l'haleine.

Très employé en jardinerie sur le pourtour méditerranéen car il ne nécessite pas de soins particuliers, les feuilles sont longues coriaces, brillantes, odorantes, persistantes et vert clair.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P. lentiscus* et sa résine contre différents micro-organismes a été rapportée par plusieurs chercheurs (Tassou et Nychas, 1995; Ben Douissa et *al.*, 2005; Benhammou et *al.*, 2008).

I.3. L'*Olea europea*.

L'olivier appartient à la famille des Oléacées qui comprend 20 - 29 genres, selon le système de classification (Morettini, 1972; Flahault, 1886 in Loussert et Brousse). Le genre *Olea* serait lui-même composé de 30 espèces différentes réparties sur les cinq continents : Afrique, Asie, Amérique, Europe, Océanie (Loussert et Brousse, 1978).

Les deux sous espèces étudiés sont : *Silvestres* et *Laperrinei*.

I.3.1. Définition de *Laperrinei*

Actuellement, on considère que l'olivier de Laperrine est uniquement distribué dans le Sahara central africain (Maire, 1934 ; Quézel, 1958 ; Benichou, 1962 ; Green et Wickens, 1989 ; Ozenda et Santa, 1990 ; Vargas *et al*, 2001 ; Médail *et al.*, 2001 ; Baali-Cherif *et al*, 2006) en Algérie dans les massifs du Hoggar, du Tassili, du Tefedest et du Mouyedir, au Niger dans l'Aïr (principalement dans les massifs du Greboun, du Bagzane et du Tamgak) et au Soudan dans le Djebel Marra et le Gourgeil (Cifferri et Breviglieri, 1942 ; Benichou, 1962) (figure 12).



Figure 12 : *Olea europea* sous espèce : *Laperrinei* (anonyme 6).

I.3.2. Définition de *Silvestres*

Arbuste souvent en buisson grisâtre petites feuilles persistantes, coriaces, ovales plus ou moins étroites, aiguës, à bords légèrement enroulés, opposés ; drupes petites (d'environ 1 cm) vertes puis noires, à saveur acre. Espèce méditerranéenne commune dans tous le nord de l'Algérie, relativement rare dans le sahara septentrional (Baba Aissa, 2013) (figure 13).



Figure 13 : *Olea europaea* sous espèce : *Silvestres* (anonyme 7).

I.3.3. Caractéristiques biologiques et propriété de l'olivier

L'olivier se distingue des autres espèces fruitières par sa très grande longévité pouvant donner des arbres plusieurs fois centenaires. Si le tronc disparaît par vieillissement, les rejets se développant à sa base assureront sa pérennité et redonneront un nouvel arbre (Loussert et Brousse, 1978). A l'état naturel, il présente une frondaison arrondie (Tombesi et Cartechini, 1986 in Gucci et Cantini, 2000), avec son tronc sculpté par l'âge et sa toison de feuilles persistantes et argentées. Malheureusement, il n'est pas possible de connaître l'âge d'un olivier avec certitude. La dendrochronologie est extrêmement difficile à réaliser car l'olivier possède un bois dur, dense, veiné et de croissance irrégulière, ce qui rend aléatoire l'individualisation et le comptage des cercles de croissance (Baali-Cherif et Besnard, 2005). En Algérie, l'olivier le plus vieux est celui planté à Souk Ahras (Anonyme).

L'olivier est également réputé pour sa grande rusticité, lui permettant de se développer et de fructifier sous des conditions de climat subaride et sur des sols parfois très pauvres (Loussert et Brousse, 1978); il s'accommode d'une pluviométrie de 220 mm par an seulement. L'arbre a besoin d'une certaine période de froid pour que la floraison et la fructification se produisent (Verdié, 1990); sa physiologie particulière est adaptée pour le rendre résistant aux hivers les plus froids, aux étés les plus brûlants et aux sécheresses les plus dévastatrices. Le bois de l'olivier, ses racines et sa souche sont d'une résistance extraordinaire aux contraintes mécaniques que lui infligent les vents les plus violents (Baali-Cherif et Besnard, 2005).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Matériels

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire parasitologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et du service d'éco épidémiologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie (IPA).

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Les leishmanies

Une espèce a été choisie pour l'étude de l'activité leishmanicide des extraits des plantes étudiés, cette espèce est responsable de la leishmaniose viscérale : *L.infantum* (MON 1/DZ/01 /LIPA1227/01). La souche appartient à la cryobanque du service d'éco épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), elle a été décongelée et cultivée sur milieu NNN à 26°C (figure 14).



Figure 14 : forme promastigote de *leishmania infantum* (LIPA 1227) G x100.

1.1.2. Les extraits de plantes

Les extraits sont obtenus dans le laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Elles ont été récoltées dans différentes régions d'Algérie, il s'agit de :

a. Pistacia lentiscus récoltée de quatre régions de Tizi-Ouzou : Ouacif, Makouda, Maatkas et Draa-El-Mizane, durant le mois d'Avril 2013.

b. Olea europaea sous espèce *silvestres* récoltée à Tizi-Rached durant le mois de Novembre 2014.

c. Arbutus unedo L récoltée en région de Ben Yanni (Kabylie) durant le mois de Décembre 2014.

d. Olea europaea sous espèce *laperrinei* récoltée dans la région de Tamanrasset durant le mois de Mai 2014.

1.2. Matériels non biologiques

1.2.1. Appareillage

Cette étude a nécessité l'usage d'un ensemble d'appareillage : Agitateur magnétique, microscope optique (MOTIC), centrifugeuse (JOUAN), bec bunsen (PROPANGAS), balance de précision électronique, étuves réglées à 25°C, 26°C et à 37°C (JOUAN), hotte à flux laminaire (FASTER BH-EH 2004), bain-marie (MEMMERT), vortex (FISHERBRAND), compteur manuel (PRIMAT) et pipetus (JUNIOR).

1.2.2. Petit matériel et consommables

On a utilisé lors de ce travail le matériel suivant : plaque de 96 puits, lames, lamelles, cellule de Thoma, pipettes stériles à usage unique de 5 à 20 ml, tubes coniques (15 ml) et tubes Eppendorfs, pipettes Pasteur stériles, parafilm, filtre stérile à 0,22µm

1.2.3. Réactif et solutions

Les réactifs ayant servi à la réalisation de cette étude sont : eau physiologique (0,9%), eau distillée, antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine : GECTAPEN), Formaldéhyde (formol) dilué à 4% (PANREAC), Acide Chlorhydrique (HCL), Hydroxyde de Sodium (NaOH), bleu de Trypan (RAL555), DMSO (Diméthylsulfoxyde), Sérum de veau Foetal (SFV), alcool, sérum de lapin, Agar agar.

1.2.4. Les milieux de culture

Les milieux de culture ayant servis à l'isolement sont : le milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal) et sérum de lapin, le milieu étudier pour l'enrichissement des souches est le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 +10% SVF.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits de plantes

Les extraits de plantes dissous dans du DMSO et l'eau distillé et à une concentration finale de 1 g/ml. La concentration finale de DMSO doit être à un maximum de 0,05% poids/volume.

Pour chaque extrait étuliser, on lui réalise des dilutions à un dixième.

2.2. Préparation des milieux de cultures

Milieu NNN

Le milieu NNN est composé de 6g de NaCl et de 10g de Bacto-agar dissous dans 1000ml d'eau distillée stériles à raison de 7ml par tube. Après stérilisation à l'autoclave à 1.1 bar, 120°C pendant 30 minutes, le sang de lapin préalablement chauffé à 56°C pendant 30 minutes et additionnée d'antibiotique (la pénicilline 1000UL/ml et la streptomycine 100µg/ml) est mélange avec la gélose a raison de 1ml/tube. Les tubes sont laissés en position inclinée pendant 24 heures à température ambiante. Apres formation d'exsudat, les tubes sont conservés à 4°C.

Milieu RPMI

26.8g de milieu de base lyophilisée RPMI 1640 sont dissous dans l'eau distillé stérile (800ml) auquel, on ajoute le sérum de veau fœtal à raison de 10% dans le volume totale est 1 litre et la L-glutamine (200mM) à raison de 1% en suite les antibiotiques (la pénicilline 1000 UL/ml et la streptomycine 100µg/ml). Le volume final est complété à 1 litre. On ajuste le pH de milieu à 7.2 (pH ou la croissance de leishmanie est optimale), la stérilisation de milieu se fait par filtration sur un filtre de porosité 0.22µm.

2.3. Cultures des leishmanies

Pour l'étude de l'activité leishmanicide des 5 extraits sur *L. infantum*, nous avons utilisé trois milieux de croissance : deux milieux semi solide le NNN et sérum lapin et un milieu liquide : le RPMI 1640 supplémenté de 10% de SVF. Les souches ont été maintenues sur NNN et sérum lapin et cultivées sur RPMI pour les tests leishmanicide. Les souches qui sont sur NNN et sérum lapin ont été contrôlées chaque semaine. Les cultures en phase exponentielle ont été concentrées à partir du NNN, puis ont subit 2 à 3 lavages à l'eau physiologique, centrifugées à 2500 rpm pendant 10 min, et transférées sur RPMI. Les cultures sur RPMI 1640 +SVF 10%

ont été contrôlées et repiquées tous les 5 jours jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase exponentielle.

2.4. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme promastigote *in vitro*

L'inoculum primaire de la souche *L. Infantum* est préparé dans des tubes Falcon à partir des souches conservées sur NNN et sérum lapin. On ajuste l'inoculum à une concentration finale de 1.10^6 leishmanie/ml. L'inoculum est répartie dans le puits des plaques de cultures cellulaires (96 puits) à raison de 1ml par puits, ou on a introduit différents concentrations des extraits végétaux 12.5 μ l ; 25 μ l ; 50 μ l ; 100 μ l.

La culture des leishmanies est très sensible surtout dans le cas de contamination, pour cela les préparations du matériel, outils des cultures, milieux de culture, et les dilutions des extraits, s'opèrent dans une chambre fermée spéciale.

Les tests ont été réalisés en quintuplâtes pour chaque concentration et refait trois fois pour évaluer la reproductibilité.

Les numérations des promastigotes ont été effectuées quotidiennement sur cellule de Thoma après coloration par le bleu de Trypan et fixation par le formol. (Figure 15, 16,17).

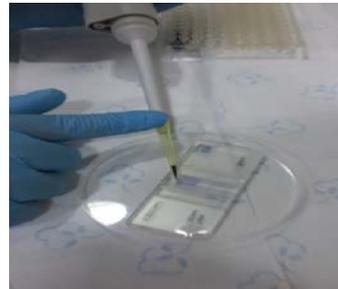
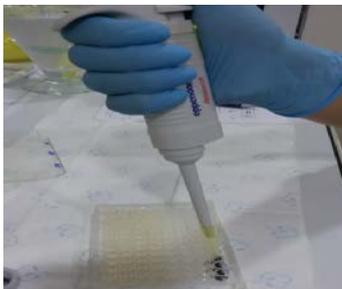


Figure 15 : préparation des extraits végétaux Figure 16 : Préparation de la cellule de thoma.

Avec la suspension parasitaire.



Figure 17 : Incubation des extraits végétaux avec la suspension parasitaire.

2.4.1. Détermination des IC50 (criblage secondaire)

La suspension parasitaire ajustée à 1×10^6 parasites /ml a été cultivée sur milieu RPMI + SVF 10% pendant 72 heures à 25°C, en présence des extraits actifs à 100µg/ml à des concentrations finales de 100, 50, 25 et 12.5µg/ml sur une plaque de culture cellulaire 96 puits, en quintuplâtes. Ces tests ont été répétés 3 fois. L'antimoine trivalent SBIII a été utilisé comme témoin positif.

2.5. Analyse statistique

Les effets des extraits étudiés sur la viabilité des cellules ont été exprimés en IC50, qui est la concentration nécessaire pour tuer 50% de la population parasitaire. Les valeurs des IC50 ont été calculées à partir de l'extrapolation graphique de courbes dose-réponse et aussi confirmé par la courbe de tendance sur Excel.

Chapitre III: Résultats et Discussion

Résultats

1. L'activité antileishmanienne des cinq extraits végétaux sur *L.infantum*

Afin de déterminer l'activité leishmanicide de cinq extraits de plantes, nous avons dans un premier temps fait un criblage primaire pour sélectionner les molécules d'intérêt et pousser nos investigations vers un criblage secondaire permettant de déterminer la concentration inhibitrice de chaque extrait sur les formes promastigotes de *leishmania infantum*.

1.1. Effet d'extraits de feuille et tige d'*Olea europea (Laperrinei)* sur la forme promastigote de *Leishmania infantum*

Les pourcentages de viabilité de *L.infantum* pour l'extrait de feuille et de tige d'*Olea europea (Laperrinei)* par la méthode de criblage primaire sont représentés dans la figure 14.

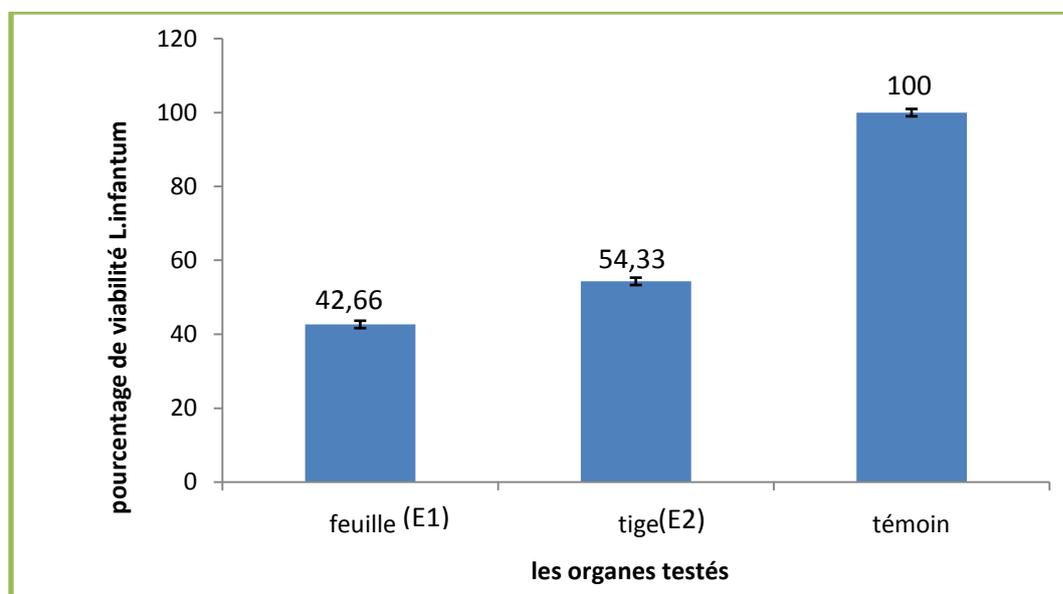


Figure 18 : résultat du criblage primaire d'*Olea europea (Laperrinei)* feuille et tige sur la forme promastigote de *Leishmania infantum*.

Les résultats obtenus pour l'*Olea europea (laperrinei)*, la feuille et la tige, n'offrent pas la même efficacité. La feuille à un rendement supérieur à celui de la tige.

Les résultats obtenus dans nos expériences sont les suivants :

E1 extrait de feuille d'*Olea europea (Laperrinei)* avec un taux de mortalité de 57,34%.

E2 extrait de tige d'*Olea europea (Laperrinei)* avec un taux de mortalité de 45,67%.

I.2. Effet d'extrait de feuille d'*Olea europea (laperrinei, Silvestres)*, *Arbutus unedo L*, *Pistacia lentiscus L* sur la forme promastigote de *Leishmania infantum*.

les pourcentages de viabilité de *L.infantum* pour les quatre extraits de feuille étudiés d'*Olea europea (Laperrinei, Silvetres)*, *Arbutus unedo L* et *Pistacia lentiscus* par la méthode du criblage primaire sont représentés par la figure 15.

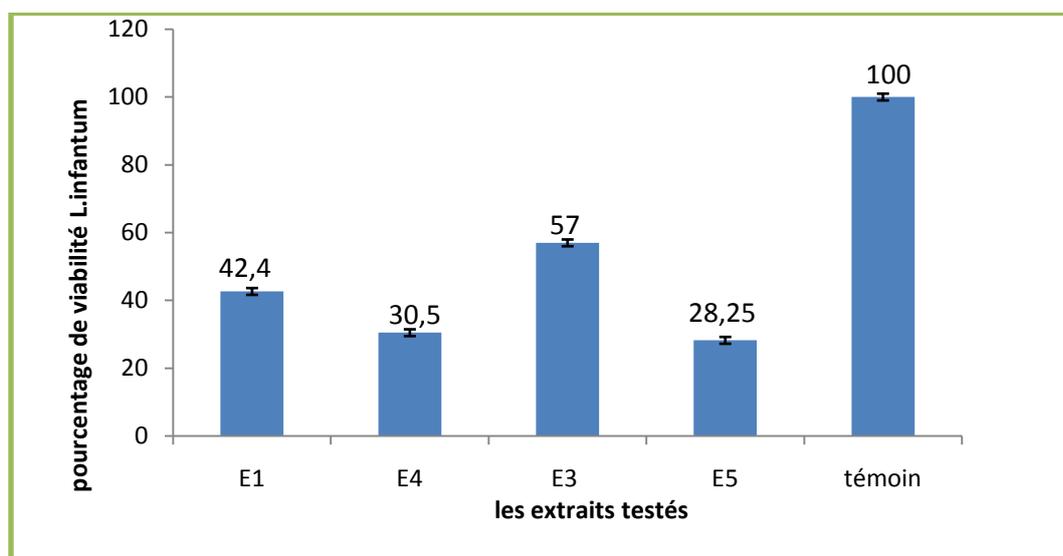


Figure 19 : le taux de viabilité de *Leishmania infantum* sur des extraits de feuille d'*Olea europea (Laperrinei, Silvetres)*, *Arbutus unedo L* et *Pistacia lentiscus*.

La lecture des expériences établies, nous donnent la primauté à E5 extrait de feuille *Olea europea (Silvetres)* sur tous les autres extraits avec un taux de mortalité très élevés de la population parasitaire. Les résultats obtenus dans nos expériences sont classés par ordre d'efficacité :

1. E5 extrait de feuille d'*Olea europea (Silvestres)* avec un taux de mortalité de la population parasitaire 71,75%.
2. E4 extrait de feuille d'*Arbutus unedo L* avec un taux de mortalité de la population parasitaire 69,5%.
3. E1 extrait de feuille d'*Olea europea (Laperrinei)* avec un taux de mortalité de la population parasitaire 57,56%.
4. E3 extrait de feuille *Pistacia lentiscus* avec un taux de mortalité de la population parasitaire de 43%.

1.2. Détermination des IC 50

Les résultats des IC 50 sur les formes promastigote de l'espèce étudié *L.infantum* sur les cinq extraits végétaux épuisés.

Tableau 1: Résultats des IC50 sur les formes promastigote *L.infantum*.

les extraits testés	<i>L. infantum</i>
	(IC ₅₀ en µg/ml)
E(1) <i>Olea europea (Laperrinei)</i>: feuille	12,5
E(2) <i>Olea europea (Laperrinei)</i>: tige	50
E(3) <i>Pistacia lentiscus</i>: feuille	100
E(4) <i>Arbutus unedo L</i>: feuille	12,5
E(5) <i>Olea europea (Silvestres)</i>: feuille	12,5

Les résultats obtenus exprimés en IC50, qui est la concentration inhibant 50% des formes promastigotes de *Leishmania infantum*. Elle est déterminée à partir des courbes linéaires des pourcentages de viabilité parasitaire en fonction des différentes concentrations testées (12, 5 ; 25 ; 50 ; 100) µg/ml (annexes).

Les résultats démontrent que les travaux que nous avons menés ont aboutis à des résultats intéressants. Les IC 50 obtenus pour *Olea europea (Laperrinei)* feuille et pour *Olea europea (Silvestres)* aussi pour *Arbutus unedo* est de 12,5µg/ml.

Les IC50 obtenus pour l'extrait de tige d'*Olea europea (Laperrinei)* est de 50µg/ml.

Les IC50 de *Pistacia lentiscus* est de 100µg/ml.

Discussion

L'utilisation de plantes comme médicaments dans les pays en voie de développement

Reste prédominante. Plus de 40% des médicaments proviennent ou sont dérivés de la nature (Newman *et al.*, 2007).

Comme cela avait été fait dans la communauté Aguaruna, Il a été démontré par un travail d'investigation sur le terrain, dans des communautés amazoniennes péruviennes où la leishmaniose est endémique, permettait de trouver de nouvelles espèces de plantes à effet leishmanicide. (Lewis WH *et al.*, 1999).

Les résultats obtenus dans notre étude *in vitro*, nous montrent que les extraits végétaux expérimentés ont présenté des effets très intéressants que l'on peut classer par ordre d'efficacité, comme suit :

L'extrait de feuilles d'*Olea europea (Silvestres)* avec un taux de mortalité de la population parasitaire de 71,75% à une concentration inhibitrice IC50 (12,5µg/ml) a montré une efficacité antileishmanienne intéressante. D'autres auteurs ont montré que ce même extrait présente aussi des effets antimicrobiens intéressants (Chebaibi *et al*, 2007) et (Djenane *et al*, 2012).

L'extrait de feuilles d'*Arbutus unedo L* avec un taux de mortalité de la population parasitaire de 69,5% a une concentration inhibitrice de (12,5 µg/ml) nous semble prometteur pour des investigations ultérieures, Des travaux ont été effectués sur l'activité anti leishmanienne de la même plante confirment nos résultats leishmanicide (Kivçak *et al*, 2009) et même une activité antioxydante a été prouvé par les travaux de Didi (2009).

L'extrait de feuille d'*Olea europea (laperrinei)* avec un taux de mortalité de la population parasitaire 57,56%. une étude effectuée par Caturla *et al* en 2005 atteste que la feuille d'olivier à une activité antibactérienne (Caturla *et al.*, 2005) .

Extrait de tige d'*Olea europea (Laperrinei)* avec un taux de mortalité de la population parasitaire 45,67% à une concentration inhibitrice de 50% représente un effet leishmanicide moins important que les trois autres extraits.

A notre connaissance il s'agit de la première mention de l'activité anti leishmanienne *in vitro* des extraits *Olea europea (laperrinei)*, nos résultats sont encourageant pour sélectionner ces extraits pour des études plus approfondies.

Extrait de feuille de *Pistacia lentiscus* avec un taux de mortalité de la population parasitaire 43%, et aussi une activité anti microbienne (Tassou et Nychas, 1995; Ben Douissa *et al*, 2005

et Benhammou *et al*, 2008) Une activité anti leishmanienne de *Pistacia atlantica* fut démontrée par Maameri dans une étude réalisée en 2008 (Maameri, 2008).

Conclusion

Les Leishmanioses représentent un problème de santé publique aux conséquences socio-économiques graves. Cette maladie est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le Monde.

Ce travail multidisciplinaire, nous a permis de mettre l'accent sur une alternative thérapeutique pour le traitement de la leishmaniose en Algérie, par l'utilisation de la phytothérapie.

L'activité antileishmanienne *in vitro* a montré que les extraits étudiés, *Arbutus unedo L* avec 69,5% de mortalité, *Olea europea (Silvestres)* avec 71,75% de mortalité et la feuille *Olea europea (Laperrinei)* avec 57,56% de mortalité, ont un effet leishmanicide important en les comparant à *Pistacia lentiscus* avec 43% de mortalité et tige d'*Olea europea (laperrinei)* avec 45,67% de mortalité parasitaire.

Cette contribution pour la recherche des produits d'origine naturelle efficaces contre les leishmanioses cutanées et viscérales servira en priorité les populations affectées par cette pathologie. Cette étude pourrait contribuer à porter un intérêt plus grand pour les possibilités d'utiliser ce genre d'extrait en thérapeutique.

Ces résultats nous démontrent que les travaux que nous avons menés ont aboutis à des résultats très intéressants dans la mesure où cette nouvelle voie mérite une considération particulière de la part des spécialistes en la matière.

Des études plus poussées de cytotoxicité *in vivo* méritent d'être poursuivies pour *Arbutus unedo L*, et *Olea europea*. Une investigation approfondie utilisant des techniques performantes permettrait d'obtenir les molécules bioactives de ces extraits.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

ABONNENC E. (1972). Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae). Mémoire de l'ORSTOM, 55, 1–289.

AKENDENGU B., NGOU-MILAMA E., LAURENS A. et HOCQUEMILLER R. (1999). Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. Parasite, 6, 3-8.

ANTOINE J.C., LANG T., PRINA E., COURRET N. et HELLIO R. (1999). H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of Leishmania-infected macrophages and internalize by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. J Cell Sci, 112, 2559-70.

BAALI-CHERIF D. et BESNARD G. (2005). High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. Ann. Bot. (Lond.), 96: 823-830.

BAALI-CHERIF D., BOUGUEDOURA N., BESNARD G. et BOUHIRED L. (2006). L'olivier de Laperrine [*Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae)], sous espèce à avenir incertain. Séminaire, INA El-Harrach, 28 et 29 Mai 2006 “ Les espèces animales et végétales menacées d'extinction”.

BABA AISSA F. (2013). Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed : EDAS, 50-250-259.

BACHI F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. La lettre de l'infectiologie .tome XXL, 1 (12): 9-15.

BASSELIN M. (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 46(12): 3731-8.

Références Bibliographiques

BEN DOUISSA F., HAYDER N., CHEKIR-GHEDIRA L., HAMMAMI M., GHEDIRA K, MARIOTTE A.M. et DIJOUX-FRANCA M.G. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (*Anacardiaceae*) from Tunisia. *Flavour Fragrance J.* 20: 410-414.

BEN GHAZI ABDELKADER. (2010). La leishmaniose viscérale de l'adulte (étude de 18 observations en médecine interne) .Doctorat en médecine universitaire Sidi Ben Abdellah.

BENHAMMOU N, BEKKARA AF, PANOVSKA KT (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* et du *Dapline gaidium* ex drug and New methods of investigation for the therapy of canine leishmaniasis. 18 Th, ESVD-ECVD, Nice. extracts .*African J. Pharm. Pharmacol*, 2:22–28

BENHAMMOU N., BEKKARA A.F.et PANOVSKA K.T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts .*African J. Pharm. Pharmacol*, 2:22–28.

BENICHOU A. (1962). Recherche critique sur l'olivier de Laperrine (histoanatomie). Bulletin n°6 de l'IRS, Université d'Alger.

BERMAN J. (2003). Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 16(5): p. 397-401.

BERMAN J. (2005). Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. *Expert Opin Investing Drugs*, 14(11): p. 1337-46.

BITAM I. (2010). Inventaire et écobiologie des phlébotomes en Algérie. SABC. 2^{ème} congrès.

BOELAERT M., EL SAFI S., JACQUETD., DE MUYNCK A., VAN DER STUYFT P. et LE RAY D. (1999). Operational Validation of the Direct Agglutination Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60 (1), 129-134.

Références Bibliographiques

BOULLARD B. (1997). Dictionnaire: Plantes et Champignons, Edition ESTEM, p 55.

BOULLARD B. (2001). Plantes Médicinales du Monde; Réalités et Croyances, Edition ESTEM, p50, 80.

BUATES S. et G. MATLASHEWSKI. (2001). Identification of genes induced by a macrophage activator, S-28463, using gene expression array analysis. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4): p. 1137-42.

BUSSIERAS J. et CHERMETTE R. (1992). Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie. Eco Nat Vét Alfort. Service de Parasitologie, 186p.

CATURLA N., PEREZ-FONS L., ESTEPA A., MICOLV. (2005). Differential effects of oleuropein, abiophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes, *Chem Phys Lipids*, 137, 2-17.

CARILLON E. (2000). La phytotherapy face à l'évolution médicale, Ed : phyto, 10-15.

CARVALHO P. B. et FERREIRA E.I. (2001). Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-Review. *Fitoterapia*, 72, 599-618.

CHAN-BACAB M. J. et PEÑA-RODRIGUEZ L. M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep*, 18, 674-688.

CHAPPUIS F., RIJAL A., SOTO J., MENTEN et M.B. BOELAERT. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rH39 dipstick for visceral leishmaniasis, *Méd Vet*. 315-324.

CHEBAIBI A., RHAZI FILALI F., LAHLOU AMINE A., CHAHLAOUI H.L et KASSMI.(2009). Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier (*Olea europaea L.*). Faculté des Sciences, Kenitra.

CIFERRI R. et BREVIGLIERI N. (1942). Introduzione ad una classificazione morfologica dell'ollivo coltivato in Italia. *Revista l'Olivocoltore*, Anno XIX, n° 1.

Références Bibliographiques

CROFT S.L. et G.H. COOMBS. (2003). Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, 19(11): p. 502-8.

DEDET J.P. (1994). Leishmaniasis in the world (French). *Médecine et Armées N° spécial leishmaniose*, 22 : 7-10.

DEDET J.P. (2001). Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encyclopédie Médico-Chirurgical*, 8:506-510.

DEINEKA V. I., ERMKOV A. M. A.M et TRET'YAKOV, M.YU. (2004). HPLC Investigation of triglycerides from plants and the lamiaceae family. *Chemistry of Natural Compounds*, 5(40), 413

DEL GIUDICE P., MARTY P. et LACOUR J.PH. (2001). Leishmaniose cutanée autochtone en France Métropolitaine. *Annales De Dermatologie Et De Vénérologie*, 128:1057-1062.

DEREURE J. (1999). Réservoirs de leishmanies. Ellipses in: Dedet J.P. (1999). *Les leishmanioses*. Edition Ellipses, 109-130. Paris.

DESJEUX P., WASUNNA M. K. et BRYCESON A. D.M. (2002). Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2 (8): 494-501.

DESJEUX P. (1996). Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin. Dermatol*, 14 :

DIDI A. (2009). Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de *l'Arbutus unedo L.*, de la région de Tlemcen, mémoire de magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen faculte Des Sciences, Algérie.

DJENANE1 Djamel., YANGÜELA Javier., DERRICHE1 Fariza., BOUARABI Lydia et RONCALES Pedro (2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde.

Références Bibliographiques

DJZZAR MIHOUBI ILHEM. (2006). Etude des leishmanioses diagnostic au centre hospitalo-universitaire Ben Baddis de Constantine.

DOLMATOVA A.V. et DEMINA N.A. (1971). Les phlébotomes (phlebotorninae) et les maladies qu'ils transmettent. Office de la recherche scientifique et technique outre-mer. Initiation-Documentations Techniques, N°18.168 p.

EL OUARTI A., HAOUAT A.C., SQALLI H., HAGGOUD A., ENNABILI A., IBNSOUDA S., IACHAGAR M. et IRAQUI. (2012). M. Extra- and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L. Afr. J. Microbiol. Res, 6, 1283–1290.

ERTABAKLAR H., KIVÇAK B., MERT T. et TÖZ S.Ö. (2009). In vitro activity of *Arbutus unedo* in leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. Turk. Soc. Parasitol, 33, 263–265.

ESTEVEZ Y. (2009). Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure-activité. Thèse de doctorat.

EUZEBY J. (1994). Histoire naturelle des leishmanioses, Rev Méd Vét. 145 (2) : 97-105.

FERREIRA S., SANTOS J., DUARTE A., DUARTE A.P. et QUEIROZ J.A. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. Nat. Prod. Res, 26, 1558–1560.

FORGET G. (2004). Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée. Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine.

FOUCHE J.G., A. MARQUET. et HAMBUECKERS A. (2000). les plantes médicinales de la plante aux médicaments, Exposition temporaire du 19.09 au 30.06.2000.

FOURNET et MUÑOZ A.V. (2002). Natural Products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2: 1213-1235.

Références Bibliographiques

GREEN P.S. et WICKENS G.E. (1989). The *Olea europaea* complex. The Davis & Hedge Festschrift, Ed. K., Edimburg University press, pp 287-299.

GUERIN P. J., OLLIARO P., SUNDAR S., BOELAERT M., CROFT S. L., GUERRINI F. (1993). Génétique des populations et phylogénie des *Leishmania* du Nouveau Monde. Thèse Doctorat Science Biologiques. Université Montpellier. France.

GUILLAUME V. (2009). Parasitologie sanguine. De Boeck Supérieur, 216 p.

HANDMAN E. (2001). Leishmaniasis: Current status of Vaccine Development. Clinical Microbiology Reviews 14: 229.

HARRAT Z. et BELKAID M. (2002). Les leishmanioses dans l'Algérois. Données Épidémiologiques. Bull Soc Pathol Exot, 96 : 212-214.

ISERIN P. (2001). Encyclopédie des Plantes Médicinales; Identification, Préparation, Soins, Edition Larousse, p 170.

JARRY D.M. (1999). Historique des leishmanioses et leur complexes pathogènes. In DEDET J.P. Les leishmanioses. Edition Ellipses, 253p.

JHA T.K. et al. (2005). A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. Am J Trop Med Hyg, 73(6): p. 1005-11.

KABOUCHE A., KABOUCHE Z., SEGUIN E., TILLEQUIN F et BRUNEAU C. (2005). A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) Lamiaceae. Biochemical Systematic & Ecology 33:813-816.

KANSOLE M. (2009). Etude Ethnobotanique, photochimique et activités biologiques de quelques lamiacée du Burkina-Faso : cas de *leucas Martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia Opposita* Vahl et *ORTHOSIPHON PALLIDUS* Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies.

Références Bibliographiques

KAYSER O., KIDERLEN A. F. et CROFT S. L. (2003). Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, 90, 55-62.

KILLICK-KENDRICK R. (1985). Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their Phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 78, 747-55.

KILLICK-KENDRICK R. (1990). Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol*, 4, 1-24.

KILLICK-KENDRICK R. et KILLICK-KENDRICK M. (1999). Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of a canine Leishmaniasis Forum, Barcelona*, 28-31.

KIVCAK B., MERT T., ERTABAKLAR H., BALCIOĞLU I.C. et TÖZ S.O. (2009). In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Turk. Soc. Parasitol*, 33, 114-115.

KIVCAK B.; MERT T.; ERTABAKLAR H.; BALCIOĞLU I.C et TÖZ S.O.(2009). In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Turk. Soc. Parasitol*, 33:114-115.

KOLAK U., HACIBEKİROĞLU I., ÖZTÜRK M., ÖZGÖKÇE F., TOPÇU G et ULUBELEN A. (2009). Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turkish Journal of Chemistry*, 33: 813 – 823.

LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.F.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R., LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J. et WALLACE F. G. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool*, 27. 37-58.

LEWIS, W.H., et al. (1999). Peruvian Medicinal Plant Sources Of New Pharmaceuticals (International Cooperative Biodiversity Group-Peru). *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, 37: p. 69-83.

Références Bibliographiques

LOUSSERT P. et BROUSSE H. (1978). Techniques agricoles et production méditerranéennes (Olivier). Ed. Maison Larousse, 500 p.

MAAMRI S. (2008). Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens, mémoire de magister, Université M'HAMED BOUGARA Boumerdes Faculté Des Sciences Département de Biologie, Algérie

MAIA C. et CAMPINO L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.

MAIA-ELKHOURY A. N. S., ALVES W. A., DE SOUSA-GOMES M. L., DE SENA J. M. et LUNA E. A. (2008). Viscéral leishmaniasis in Brazil: Trends and challenges. *Cadernos de Saude Publica*, 24(12): 2941-2947.

MALLORIE HIDE. (2004). Variabilité pathologique du complexe *Leishmania (leishmania) donovani*, agent de la leishmaniose viscérale .Etude comparative des caractères biologiques, génétique. Thèse de docteur de l'Université de Montpellier II, juin 2004.

MARIA G. MIGUEL., MARIA L., FALEIRO., ADRIANA C., GUERREIRO et MARIGNAC G., LEBASTARD M., FALL G., NICOLAS L. et MILON G. (2003). Exploration de la dissémination de *Leishmania*, un parasite délivrer et prélevé par le phlébotome au niveau du derme de l'hôte vertébré. *Bulletin Académique de Vétérinaire de France*, 157 2:41-45.

MARIA D. ANTUNES. (2014). *Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties,

MARIOTTE AM, DIJOUX-FRANCA MG (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour Fragrance J*, 20: 410-414.

MARTY P. et ROSENTHAL E. (2002). Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. *Expert Opin. Pharmacother.*

MARTY P. et ROSENTHAL E. (2002). Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. *Expert Opinion Pharmacothérapie*, 3(8):1101-1108.

Références Bibliographiques

MAZELET L. (2004). La leishmaniose canine dans le Bassin Méditerranéen français Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 32p.

MÉDAIL F., QUÉZEL P BESNARD G. et KHADARI B. (2001). Systematics, ecology and phylogeographic significance of *Olea europaea* L. subsp. *maroccana* (Greuter & Burdet) P. Vargas *et al.*, a relictual olive tree in south-west Morocco. Bot. J. Linn. Soc,137: 249-266.

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

MORRIS R. (2007). Plante for a future, Edible, Medicinal and Useful plants for Healthier World valable online sur: <http://www.pfaf.org/database/plants>, Mise à Jours: 2007.

MOULOUA A. (2014). Etude Eco-Epidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie. Thèse de doctorat d'Etat en vétérinaire université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

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

NAJMA S. (2008) .La leishmaniose viscérale (Epidémiologie et actualité thérapeutique) Thèse de pharmacie n°32 Rabat.

NEWMAN, D.J. et G.M. CRAGG. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod, 70(3): p. 461-77.

NICOLLE C. et COMTE C. (1908). Origine canine du Kala-azar. Bull. Soc. Path. Exot, 1,299-301.

OLIVIER M., GREGOREY D. et FORGETS G. (2005). Clinical microbiology reviews. (Preint) a, Vol.18, 244-293-203.

Références Bibliographiques

ORAK H.H., YAGAR H., BILIR S.S., DEMIRCI A.Ş., GÜMÜŞ T. et EKINCI. (2011). N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) leaf. Food Sci. Biotechnol 20, 1249–1256.

OSMAN O.F., KAGER P.A. et OSKAM L. (2000). Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. Tropical Medicine and International Health, 5(8): 553-562.

OUELLETTE M., OLIVIER M., SATO S. et PAPADOPOULOU B. (2003).Le parasite Leishmania à l'ère de la post-génomique. Médecine/ science, 19, n°10, p, 900-909.

OZENDA P. et SANTA S. (1990). Flore du Sahara. Ed. CNRS, Paris, 622 p. + 1 carte h.-t.

PABUÇCUOĞLU A., KIVÇAK B., BAS M. et MERT T. (2003). Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves, Fitoterapia, 74: 597-599.

PAPIEROK G., HOLTZMULLER P., HUGNET C. et LEMMESRE JL. (2002). N
PINTO M.C., CAMPBELL-LENDRUM D.H., LOZOVIE A.L., TEODORO U. et DAVIES C.R. (2001). Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. Med Vet Entomol, 15: 123-139.

PIZZUTO F., VOCI P., MARIANO., et al. (2001).Assessment of flow velocity reserve by transthoracic Doppler echocardiography and venous adenosine infusion before and after left anterior descending coronary artery stenting. Am Coll Cardiol, 38: 155-162.

QUEZEL P. (1958). Mission botanique au Tibesti. Inst. Rech. Sah. Mém. N°4. 357 p. + 26 photos.

QUEZEL P. et SANTA S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, TOME II, Centre National de la recherche scientifique, France, Paris.

RAMLI I. (2013). Etude, in vitro, de l'activité antileishmanienne de certaines plantes médicinales locales : cas de la famille des lamiacées ; Thèse de Magister en Biologie Appliquée. Université Constantine 1.Constantine ; Algérie.

Références Bibliographiques

RIOUX J-A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. et PERIERES J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum*, 65: 11-125.

ROBERT L.S. et JANOVY J.J. (2000). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology.

SACKS D. et KAMHAWI S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, 55:453-483.

SACKS D.L. (2001). *Leishmania*-sand flies interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microb*, 3, 1-9.

SALOTRA P., SREENIVAS G., POGUE GP., LEE N., NAKHASI HL. et V RAMESH. (2001). Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (3), 849-854.

SAU K., MAMNBULA S.S., LATZ E. et HENNEKS P. (2003). The antifungal drug amphotéricine B promotes inflammatory cytokine release by a Toll like receptor- and CD14-dependent mechanism. *Journal of Biology and Chemistry*, 278 (39): 37561-37568.

SOTO J. et al. (2008). Efficacy of miltéfosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 78(2): p. 210-1.

SUNDAR S., REED SG., SINGH VP., PCK KUMAR. et MURRAY HW. (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis, *The Lancet*, 351 (9102), 563-565.

Références Bibliographiques

TASSOU C.C. et NYCHAS G.JE. (1995). Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var.chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. Int. Biodeterior. Biodegrad, 411- 420.

VARGAS P., MUNOZ GARMENDIA F., HESS J. et KADEREIT J.W. (2001). *Olea europaea* ssp *guanchica* and ssp *maroccana* (*oleaceae*), two new names for olive tree relatives. Ann. Jard. Bot. Madrid, 58: 360-361.

W.H.O. (2007). Lutte contre la leishmaniose. In Soixantième Assemblée Mondiale De La Santé.

WASUNNA M.K. et al. (2005).A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. Am J Trop Med Hyg, 73(5): p. 871-6.

www.tous-les-fruits.com, mise à jour 2007, visité en Février 2008.

Annexes

Courbes de criblage primaire secondaire des formes promastigotes de *L. infantum*

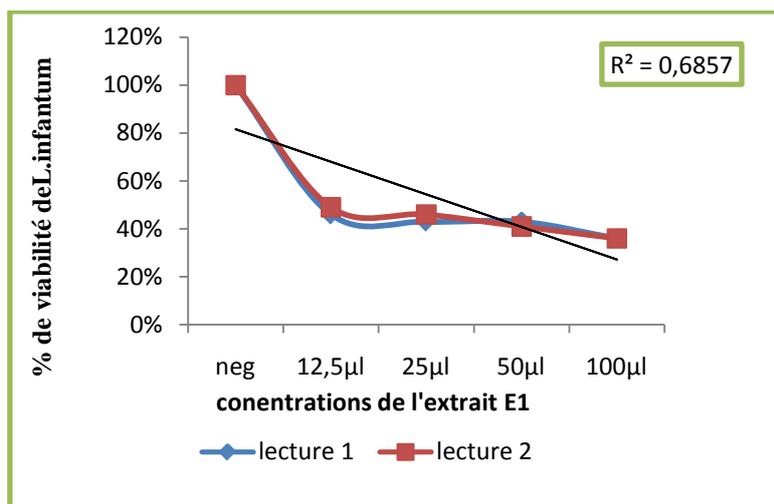


Figure 16 : courbe représentant le pourcentage de viabilité de *Leishmania infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuille d'*Olea europea* (*Laperrinei*), (E1).

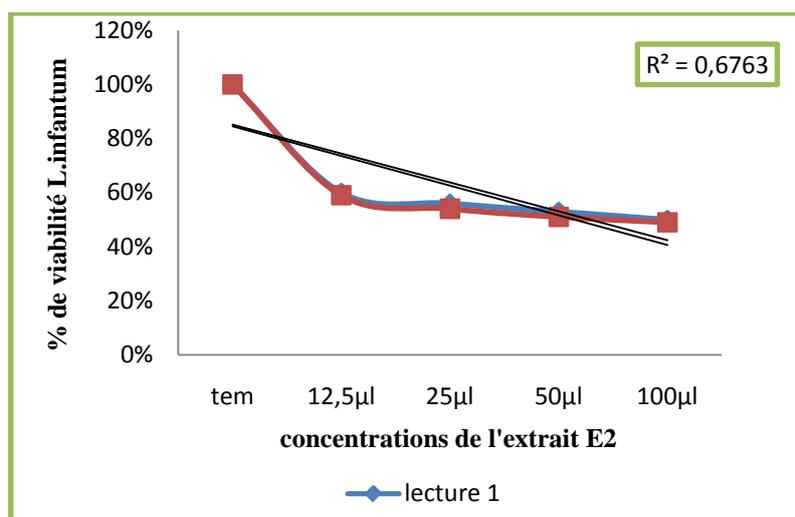


Figure 17 : courbe représentant le pourcentage de viabilité de *Leishmania infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait de tige d'*Olea europea* (*Laperrinei*), (E2).

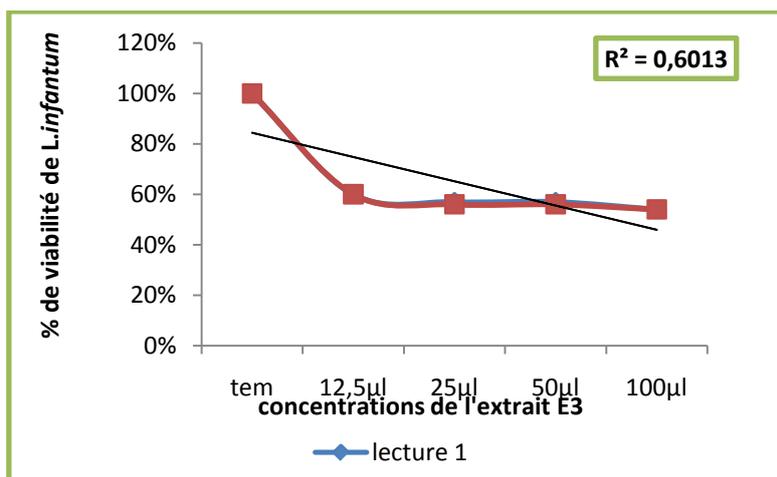


Figure 18 : courbe représentant le pourcentage de viabilité de *Leishmania infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuille de *Pistacia lentiscus*, (E3).

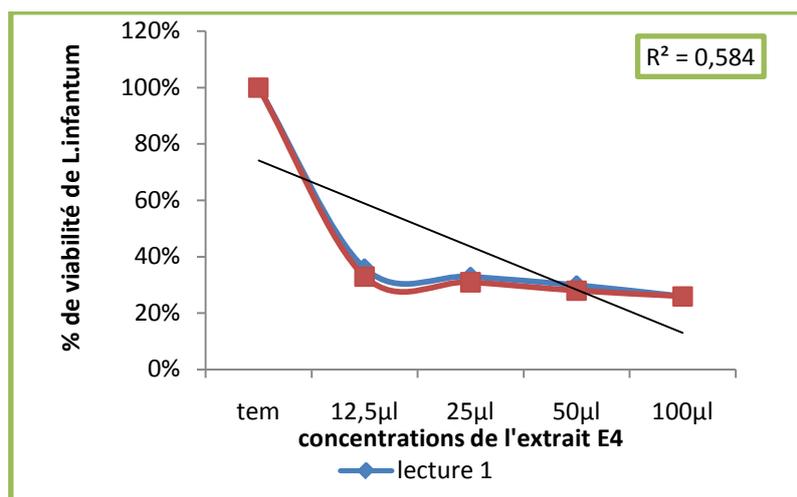


Figure 19 : courbe représentant le pourcentage de viabilité de *Leishmania infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuille d'*Arbutus unedo*, (E4).

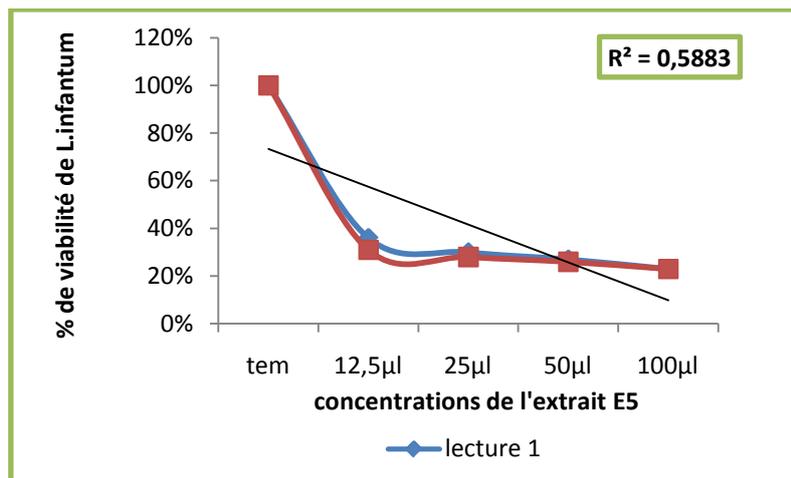


Figure 20 : courbe représentant le pourcentage de viabilité de *Leishmania infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuille d'*Olea europea* (*Silvestres*), (E5).

1. Préparation des milieux de culture

1.1. Préparation du milieu NNN

a. Composition

- Gélose : Bacto Agar Difco.....10gr
- NaCL06gr
- Eau distillée100ml
- Sang de lapin.....10 à 20%

b. Préparation

- ✓ **La gélose Bacto Agar** : elle est ajoutée à la solution de NaCL chauffée à 80 °C. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissociation. Après distribution dans des tubes à essai de 5 ml et stérilisation (à l'autoclave 120 °C pendant 20 minutes), la conservation se fait à +4 °C
- ✓ **Le sang de lapin** : obtenu par ponction cardiaque, il est recueilli sur citrate de sodium à 10% après ajout de 250000 Unités (U) de Pénicilline, la conservation se fait à +4°C
- ✓ **Le mélange gélose** : la gélose est fondue en mettant les tubes dans un bain marie à 45°C, le sang est ensuite incorporé à la gélose (1 ml de sang pour 5 ml de gélose).

Après homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation de ce milieu est d'un mois à +4 °C

1.2. Préparation du milieu du milieu RPMI 1640 à 10%

a. Composition

- RPMI 164016,4 gr
- Eau distillée stérile1000ml.

b. Préparation

- ✓ Mesurer environ 900ml d'eau distillée.
- ✓ Tout en soumettant l'eau distillée à une agitation magnétique, ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissociation sans chauffer.
- ✓ Ajouter 2 ml de L-Glutamine, 50 U/ml de streptomycine.
- ✓ Compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml.

- ✓ Filtrer milieu avec un filtre de 0.22 μm .
- ✓ Additionner aseptiquement du sérum de veau Fœtal (SVF) à 10%
- ✓ Conserver le milieu à +4 °C au réfrigérateur.

2. Principes de la numération cellulaire des parasites sur cellules de Thoma

La numération cellulaire est la détermination du nombre de parasite contenus dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat en concentration cellulaire, c'est-à-dire le nombre de parasite par carreaux de la cellule.

2.1. Techniques de numération cellulaire

a. Dilution préalable

Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est préalable de réaliser une dilution. En effet, la présence d'un grand nombre de parasites par unité de volume rend le comptage difficile.

b. Utilisation de la cellule de numération

Présentation de la cellule de Thoma

La cellule de numération de Thoma est une lame porte-objets dans laquelle est creusée une chambre de comptage d'un volume connu. C'est une lame épaisse, en verre comportant des rigoles et un quadrillage. Le volume de comptage est déterminé par la surface du quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

Remplissage de la cellule de numération

a. Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22x22 mm

b. Faire adhérer la lamelle aux plateaux en exerçant une légère pression ainsi qu'un mouvement de va et vient jusqu'à percevoir une résistance et créer un effet de ventouse.

c. Placer la cellule de comptage sur une surface plane puis homogénéiser la suspension parasitaire.

- d. A l'aide d'une micropipette, remplir la chambre de comptage en une seule fois, en gardant la pointe de l'embout inclinée près de la lamelle, sans former de bulles d'air et sans faire déborder le liquide dans les rigoles pour ne pas fausser le comptage des parasites.
- e. Laisser la goutte se diffuser sur toute la surface de la plate-forme centrale du quadrillage.
- f. Laisser le liquide se sédimenter quelques secondes avant de procéder à la numération.
- g. Laver puis sécher la cellule de Thoma après utilisation.

Numération

Observation à l'objectif x 10 pour repérer la position du quadrillage, vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer) et observer par la suite à l'objectif x 40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ). Compter les cellules contenues dans 6 des 100 rectangles du quadrillage.

Calcul de la concentration cellulaire

La concentration cellulaire de la suspension de cellule de Thoma est calculée par la loi suivante

$$\text{(Nombre de cellules (parasites) / 6) } \times 16 \times (1/\text{dilution}) \times 10^4 \text{ cellules/ml.}$$