

**République algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère d'enseignement supérieure et de la recherche scientifique**  
**Université Dr Moulay-Tahar Saida**  
Faculté des Sciences : Département de Biologie



**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de :**

**MASTER**

**Option : Biochimie et physiologie cellulaire**

Par

**Melle BENTELKHOUKH Asma**

**Intitulé**

**Evaluation In vitro, de l'activité Anti-Leishmanienne**

**De**

***'Peganum harmala'***

*Soutenu publiquement le 05/09/2019 devant le Jury composé de :*

<b>PRESIDENT</b>	<b>Mr AMMAM Abdelkader</b>	<b>Maitre de conférence A</b>	<b>Université de Saida</b>
<b>EXAMINATEUR</b>	<b>Mm HACHEM Yasmine</b>	<b>Maitre de Conférence B</b>	<b>Université de Saida</b>
<b>PROMOTEUR</b>	<b>Mm HASSANI Maya Meriem</b>	<b>Maitre de Conférence B</b>	<b>Université de Saida</b>

**Année universitaire**

**2018/2019**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

”قالوا سبحانك لا علم لنا إلا ما  
علمتنا إنك أنت العظيم الحكيم“

صدق الله العظيم ( البقرة -32)

## UNIVESITE DR TAHAR MOULAY SAIDA

### Description

**Discipline :** Sciences de la nature et de la Vie.

**Spécialité :** Biochimie et physiologie cellulaire.

**Faculté :** Des sciences.

**Département :** Biologie.

**Titre :**

*«Evaluation In vitro, de l'activité Anti-Leishmanienne de Piganum harmala »*

**Présentée par :** BENTELKHOUKH Asma.

**L'encadrant :** Mm Hassani Maya Meriem.

**Laboratoires de recherche :** - Les Laboratoires de l'université-Saida.

- Laboratoire d'hygiène-Hôpital-Saida.

**Localisation :** Faculté des Sciences, Saida-Algérie.

**Année universitaire :** 2018-2019.

## REMERCIEMENTS

« Ah ! Le jour où je vais écrire les remerciements ! C'étaient censé être le dernier truc, comme la cerise sur le gâteau ! ... même là, je reste perplexe, dois-je être sérieuse et consensuelle...ou puis-je vraiment dire ce que je pense...»

Bon je vais essayer de m'appliquer (de n'oublier personne...) car je sais que 90% d'entre vous ne vont lire que ces 2 pages (**essayez de lire aussi le résumé au moins** ☺ ...).

Je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Sans oublier **mes parents**, et toute **ma famille** qui ont veillé sur moi durant toute ma vie.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la **Faculté des Sciences biologiques**, de l'université de **Dr MOULAY TAHAR-SAIDA** Juridiques et sociales, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

En second lieu, je tiens à remercier l'encadreur **Mm: HASSANI M**, pour son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.

Sans oublié de remercier l'équipe de le service de parasitologie de **laboratoire d'hygiène-Saida** plus précisément **Dr ELLAHMAR** pour leurs conseils, et efforts durant notre travail.

Mes remerciements vont également à tous mes **enseignants**, Mm Hachem Y, Mr Ammam A, et le dermatologue Drisse qui m'ont soutenu moralement le long de ce travail et **mes collègues** qui ont su créer une ambiance chaleureuse de camaraderie et de travail qui restera un souvenir que je conserve de cette période.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du **jury** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Merci a mes amis GHELLAL Ch, GHELLAL N KANDOUCCI H et CHAIB H, d'être **mes amis** !

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## DEDICACES

A **mes chers parents**,  
pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long  
de mes études,

A mes chères sœurs **Amina**, et **Mayar** ,  
pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, **Abdallah** et **Abderrahim** ,  
pour leur appui et leur encouragement,

A ma grande famille ,  
mes **tantes**, mes **oncles**  
ainsi que mes **cousins** et **cousines**.

A toute mes **amis** et mes **amies**,  
pour leurs soutien tout au long de mon parcours ,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien  
infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi... ☺

## **SOMMAIRE**

∴ **REMERCIEMENT**

∴ **DEDICACE**

∴ **ILLUSTRATIONS**

∴ ملخص

∴ **SAMMARY**

∴ **RESUME**

∴ **INTRODUCTION**

∴ **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

**[Pages]**

### **Chapitre I : Etat des connaissances sur Leishmaniose**

<b>I.</b>	Généralités .....	<b>01</b>
<b>II.</b>	La leishmaniose cutanée(LC) en quelques chiffres .....	<b>02</b>
	II .1. LC dans le monde.....	<b>02</b>
	II .2. LC dans l'Algérie.....	<b>04</b>
<b>III.</b>	Parasitologie ; <i>Leishmania</i> .....	<b>05</b>
	III .1. parasite.....	<b>05</b>
	III .2. Les formes parasitaires.....	<b>06</b>
	III .3. Les différentes espèces de Leishmaniose cutanée.....	<b>07</b>
	III .4. vecteur.....	<b>07</b>
	III .5. Les réservoirs.....	<b>08</b>

III .6. Transmission.....	09
III .7. Facteurs affectant la transmission.....	10
III .7.1. Mouvement de population.....	10
III .7.2. Facteurs socio-économiques.....	10
III .7.3. Facteur de risque environnementaux.....	10
<b>IV.</b> L'immunité contre la leishmaniose .....	10
<b>V.</b> Co-infection VIH/leishmania.....	11
<b>VI.</b> Diagnostique.....	12
VI.1. Examen microscopique.....	12
VI.2. Culture.....	12
VI.3. Ponction ou biopsie.....	12
<b>VII.</b> Traitement.....	12

## **Chapitre II : Etat des connaissances sur *Peganum harmala***

<b>I.</b> Définition de la phytothérapie .....	15
<b>II.</b> Définition des plantes médicinales.....	15
<b>III.</b> Présentation du genre <i>peganum harmala</i> .....	15
III.1. Descriptions botaniques.....	15
III.2. Habitats.....	16
III.3. Propriétés pharmacologiques.....	17
III.3. Principe actifs.....	17
III. 3.1. Les alcaloïdes.....	17
III. 3.2. Les huiles .....	18

## **REVUE EXPERIMENTALE**

<b>Chapitre III : Matériels et méthodes.....</b>	<b>19</b>
<b>I.</b> Préparation du plante ; <i>P.Harmala</i> .....	<b>19</b>
I .1. Habitats.....	<b>19</b>
I .2. Extrait aqueux.....	<b>19</b>

I .2.1. Par Macération.....	19
I .1.2.2. Par Décoction .....	21
I .1.2.3. Par soxhlet .....	22
I .3. L'extraction de l'huile essentielle.....	23
II. <i>Préparation du Parasite ; Leshmania</i> .....	25
II .1. Milieux de cultures.....	25
II .1.1. Milieu NNN.....	25
II .1.2. Milieu à base de blancs d'œufs.....	28
II .1.3. Milieu Harrat.....	29
II .2. Prélèvement du Leishmania.....	30
II .2.1. Teste directe .....	31
II .2.2. Prélèvement de la souche.....	34
II .3. Testes in vitro.....	37
<b>Chapitre IV : Résultats et Interprétation</b> .....	<b>39</b>
I. Préparation de la plante ; <i>Péganum harmala</i> .....	39
I .1. Rendement de l'extrait aqueux.....	39.
I.2 Extraction de l'huile essentielle .....	40
II. Prélèvement et mise en culture des Leishmanies.....	41
III. Tests in vitro.....	42
<b>∴ CONCLUSION</b>	
<b>∴ ANNEXES</b>	
<b>∴ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

# ILLUSTRATIONS



<b>OMS</b>	:	Organisation mondiale de la santé.
<b>WHO</b>	:	World health organization.
<b>LV</b>	:	Leishmaniose Visceral.
<b>LCM</b>	:	Leishmaniose Cutané-Muqueuse.
<b>LC</b>	:	Leishmaniose Cutané.
<b>EMR</b>	:	Région du Méditerranée oriental.
<b>AMR</b>	:	Région du Méditerranée des Amériques.
<b>EUR</b>	:	Région Européennes.
<b>SEAR</b>	:	Région de l'Asie du Sud-est.
<b>AFR</b>	:	Région Africaine.
<b>WPR</b>	:	Région du Pacifique Occidentale
<b>n</b>	:	noyau.
<b>K</b>	:	Kinétoplaste.
<b>mt</b>	:	mitochondrie.
<b>f</b>	:	flagelle.
<b>fp</b>	:	poche flagellaire.
<b>L.Major</b>	:	Leishmania Major.
<b>L.tropica</b>	:	Leishmania Tropica.
<b>L.Inffantum</b>	:	Leishmania Inffantum.
<b>LTh</b>	:	Lymphocyte T helper.
<b>IFN-gamma</b>	:	Interféron gamma .
<b>NK</b>	:	Natural Killer.

<b>CMH</b>	:	Complexe d'histocomptabilité majeure.
<b>IL</b>	:	Interleukine.
<b>VIH</b>	:	Virus d'immunodéficience humain.
<b>SIDA</b>	:	Syndrome d'Immunodéficience Acquise.
<b>NNN</b>	:	Novy-McNeal-Nocolle.
<b>PCR</b>	:	Réaction de polymérisation en chaines.
<i>P.harmala</i>	:	<i>peganum harmala</i> .
<b>MAOI</b>	:	Mono-Amine-Oxydase Inhibiteur.
<b>SNC</b>	:	système nerveux centrale.
<b>IPA</b>	:	Institut Pasteur d'Alger.
<b>L'IPA 32/06</b>	:	Souche de référence de <i>leishmania major</i> obtenue à partir du service éco-épidémiologie parasitaire.
<b>t</b>	:	Teste.
<b>R%</b>	:	Le rendement.
<b>mi</b>	:	La masse initiale de matière végétale.
<b>mf</b>	:	La masse finale (l'extrait en poudre après le séchage).
<b>EA</b>	:	Extrait Aqueux.



- Figure 01** : Fillette souffrant de LV, associée à une hépto-splénomégalie à l’Ethiopie.
- Figure 02** : Patient atteint de LCM.
- Figure 03** : LC chez un enfant (Afghanistan).
- Figure 04** : Répartition géographique de la LC dans le monde.
- Figure 05** : Diagramme représente le nombre de pays d’endémie pour la LC.
- Figure 06** : Diagramme représente la distribution des cas de LC dans l’Algérie par Année et par mois.
- Figure 07** : Les formes parasitaires de *Leishmania*.
- Figure 08** : Morphologie et photographie du phlébotome.
- Figure 09** : Cycle évolutif de *Leishmania*.
- Figure 10** : Différentiation des lymphocytes T CD4+, lors de l’infection par les leishmanies.
- Figure 11** : Papule, nodule, et plaque au cas de LC.
- Figure 12** : La plante de *peganum harmala* (l’harmel).
- Figure 13** : Fruit, et les graines de *Peganum harmala*.
- Figure 14** : (A)Protocole de macération. (B) Protocole de filtration.
- Figure 15** : Flacon de l’extrait finale.
- Figure 16** : Montage de l’extraction par décoction .
- Figure 17** : Le montage de soxhlet.
- Figure 18** : L’extraction de l’huile par hydrodistillation classique.
- Figure 19** : A : lapin sain adulte, B : Prélèvement du sang du lapin par ponction cardiaque.
- Figure 20** : A : jeunes hamsters ; B : prélèvement oculaire de sang.

- Figure 21** : A. Préparation de la gélose ; B : gélose dans les tubes à vis.
- Figure 22** : Exemple des tubes inclinés .
- Figure 23** : Préparation du milieu Bâchi (2001).
- Figure 24** : A. Fiche de questionnaire au patient ; B. Patient (l'Enfant) présentant une lésion cutanée.
- Figure 25** : Patient (le jeune homme) présentant une lésion cutanée.
- Figure 26** : Etapes de l'examen direct.
- Figure 27** : Etapes du prélèvement et de la mise en culture du parasite.
- Figure 28** : Etapes du repiquage.
- Figure 29** : Etapes de prélations pour l'évaluation in vitro.
- Figure 30** : Graphique du rendement obtenu pour chaque méthode d'extraction.
- Figure 31** : Résultat négative du texte direct.
- Figure 32** : La formes promastigote sous le microscope optique (X100).
- Figure 33** : Le comptage du parasite sur la cellule de Neubauer (Sans l'ajout de *p.harmala*).
- Figure 34** : Le comptage du parasite sur la cellule de Neubauer par l'ajout de l'extrait à 03 concentrations (objectif X10).
- Figure 35** : Graphique représente l'effet antileishmanienne de l'EA de *P.harmala*.
- Figure 36** : Cellule de Neubauer.
- Figure 37** : Description d'une cellule de numération.
- Figure 38** : Numération cellulaire sur un quadrillage.

**Tableau 01** : L'effet antileishmanienne de l'EA de *P.harmala*.

**Tableau 02** : Résultats du rendement de l'extrait aqueux de *Peganum harmala*.

## ABSTRACT

leishmaniasis represent the parasitical disease with heavy social-economic consequences most frequent vector-borne diseases in Algeria.

Indeed the available treatments require for the most, parenteral administrations which are costful for the concerned populations. The research of new active molecules is then a necessity. To participate in the effort of the research of therapeutic alternatives, we are interested in studying one plant species from the *Zygophelaceae* family, *Peganum harmala* in this case, with both biological study. The obtained results reveal the metabolic richness of these species in with variations from an extract to another according to the method used for the extraction. The antileishmanial activity of *peganum harmala* extracts on the promastigote form of the species *L.major*, which cause the cutaneous leishmaniasis (LC) in Algeria constitute a strong promising result as a therapeutic alternative headline.

**Key words:** Leishmaniasis – LC - antileishmanial activity – *Peganum Harmala* .

## ملخص

اللشمانيات تمثل مجموعة الامراض المنتقلة الشائعة في الجزائر حيث تترك عواقب اجتماعية و اقتصادية . ان تأكيدهم البيولوجي ضروري جدا قبل الشروع في العلاج المخصص لهم إلا انه يبقى في غالب الاحيان مكلف جدا او ذات تأثير سلبي في بعض الاحيان وبالتالي فإن البحث عن جزيئات نشطة جديدة أمر ضروري. بصدد المساهمة في تنمية الجهد لمزيد من البحوث و الاكتشافات لعلاج بديل هممنا بدراسة بيولوجية لنوع من النباتات الطبية التي تنتمي الى العائلة الرطريطية , صنف السنب البري او ما يعرف بالحرملة حيث تكشف النتائج التي تم الحصول عليها عن ثراء الأيض لهذا النوع من النبات مع وجود تباينات في الغلة من مستخلص إلى آخر وفقاً للطريقة المعتمدة في الاستخلاص. يعتبر النشاط المضاد لصنف اللطفيلي المسؤول عن داء اللشمانيا الجلدي في الجزائر ، نتيجة واعدة كبديل للعلاج.

الكلمات المفتاحية: اللشمانيات – الرطريطية – السنب البري – اللشمانيا الجلدي .



## RESUME

Les leishmanioses, représentent les maladies vectorielles aux conséquences socio-économiques lourdes les plus fréquentes en Algérie. Leur confirmation biologique est nécessaire avant l'administration des traitements contraignants, coûteux et toxiques qui leurs sont réservés.

Et donc La recherche de nouvelles molécules actives est une nécessité. Pour contribuer à l'effort de recherche d'alternative thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude biologique d'une espèce de plantes de la famille des *Zygophelaciaes*, *Péganum harmala* ou l'*Harmel* en l'occurrence. Les résultats obtenus, révèlent la richesse métabolique de cette espèce avec des variations de rendement d'un extrait à l'autre selon la méthode d'extraction utilisée . L'activité antileishmanienne des extraits de *peganum harmala* sur la forme promastigote (sur le milieu de culture NNN) de l'espèce *L. major*, responsable de la leishmaniose cutanée (LC) en Algérie, constitue un résultat prometteur en terme d'alternative thérapeutique.

**Mots-clés** : Leishmaniose - LC - Activité anti-leishmanienne - *Peganum harmala* - milieu NNN - *Zygophelaciae* .

# INTRODUCTION

Les leishmanioses forment un ensemble des maladies parasitaires qui se différencient par leurs manifestations cliniques en : leishmaniose cutanée (**LC**), leishmaniose cutanéomuqueuse (**LCM**) et leishmaniose viscérale (**LV**). Elles sont dues au parasite protozoaire, *Leishmania* qui à son tour est transmis entre les vertébrés par la pique de la femelle du Phlébotome [1]. L'OMS estime la fréquence de la Leishmaniose à 1.5 à 2 millions de nouveaux cas par an, l'Algérie se place malheureusement parmi les pays les plus concernés par cette maladie du pourtour méditerranéen [2]. Le genre *Leishmania* présente statistiquement des potentialités pathogéniques différentes. Citons par exemple, *L.major*, *L.tropica* et *L.inffantum* qui sont responsables de formes cutanées de la maladie qui sont potentiellement graves et défigurantes, elles se présentent sous forme de lésions cutanées généralement sans fièvre ni symptômes généraux [3]

Aujourd'hui, la tendance est à la médecine naturelle qu'elle soit préparée en laboratoire ou chez soi parce que les solutions phytothérapeutiques trouvent toutes leurs origines dans les plantes dites médicinales, ces dernières dont l'utilisation concerne des milliers d'espèces différentes issues de la nature. Citons par exemple, le genre de *Peganum harmala* (*harmel*) de la famille Zygophyllaceae, à fleurs blanc-jaunâtre. Anciennement utilisé en tant que calmant ou bien afin de traiter plusieurs maladies cutanées [4]

Ainsi, ce travail est subdivisé en trois parties différentes, la première consiste à restituer les connaissances actuelles concernant les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques, et phytothérapeutiques de la Leishmaniose, d'une part, et d'une autre part la présentation, la description, les habitats, et les propriétés de la plante expérimentée : *Peganum harmala*.

La deuxième partie décrit le climat expérimental : préparation de l'extrait et de l'huile essentielle issus de la plante, préparation des milieux de cultures des parasites, prélèvement sur patients.

La troisième et dernière partie concerne essentiellement les essais de mise en culture du parasite et des tests in vitro du potentiel Leishmanicide de *P.harmala*.

Nous terminerons enfin ce travail par une conclusion où nous proposerons quelques perspectives quant à l'amélioration des différents protocoles expérimentaux.

## *Chapitre I*

# **ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA LEISHMANIOSE**

## I - Généralités

La leishmaniose est une parasitose, c'est-à-dire provoquée par un genre de parasites spécifiques les *Leishmania*, ceux-ci se transmettent d'un vertébré à un autre, par la pique d'une mouche du genre de phlébotome. [2]

Selon l'OMS, la leishmaniose se présente sous trois principales formes :

**-La leishmaniose viscérale (LV)**, est également connue sous le nom **kala-azar**. Il s'agit d'une forme mortelle de Leishmaniose si elle n'est pas adéquatement traitée, selon l'OMS, les symptômes observés chez les patients qui en souffrent sont : des fièvres irrégulières, une anémie, une perte de poids ainsi qu'une augmentation du volume de foie et de la rate (**figure 01**).



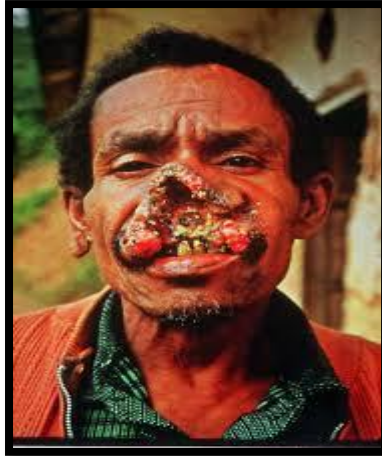
**Figure 01** : Fillette souffrant de LV associée à une hépatosplénomégalie (Ethiopie).

[5]

Chaque année l'OMS enregistre plus de 50.000 cas de LV, 90% concentrés au Bangladesh, Brésil, Inde, et au Soudan. [2]

**-La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)**, ou muco-cutanée, est une forme grave, destructive, qui affecte les muqueuses du nez, de la bouche,

ainsi que de la gorge (**figure 02**). 90% de LCM surviennent en Bolivie, au Brésil, et au Pérou. [1]



**Figure 02** : patient atteint de LCM. [6]

-La **leishmaniose cutanée (LC)**, c'est la forme la plus fréquente, elle provoque des ulcères et des lésions cutanées, sur les parties exposés du corps, comme le visage, les bras, et les jambes (**figure 03**). L'affection de ce type de leishmaniose, laisse des cicatrices graves, et des handicaps sévères. [2]



**Figure 03**: LC chez un enfant (Afghanistan). [5]

90% de **LC** sont retrouvés en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Iran, en Arabie saoudite et en Syrie. [1][2]

## II – La LC en quelques chiffres

### II – 1. LC dans le monde

Actuellement, la leishmaniose cutanée est présente dans **87** pays à travers le monde (selon l'OMS) , **20** pays parmi eux le nouveau monde comme l'Amérique du sud et centrale, et **67** pays de l'ancien monde comme l'Europe, l'Afrique, l'Asie, l'Inde...etc. (**figure 04**). La parasitose peut être persistante ou saisonnière, cela varie d'un pays a l'autre en fonction des conditions géographiques ou environnementales. [1]

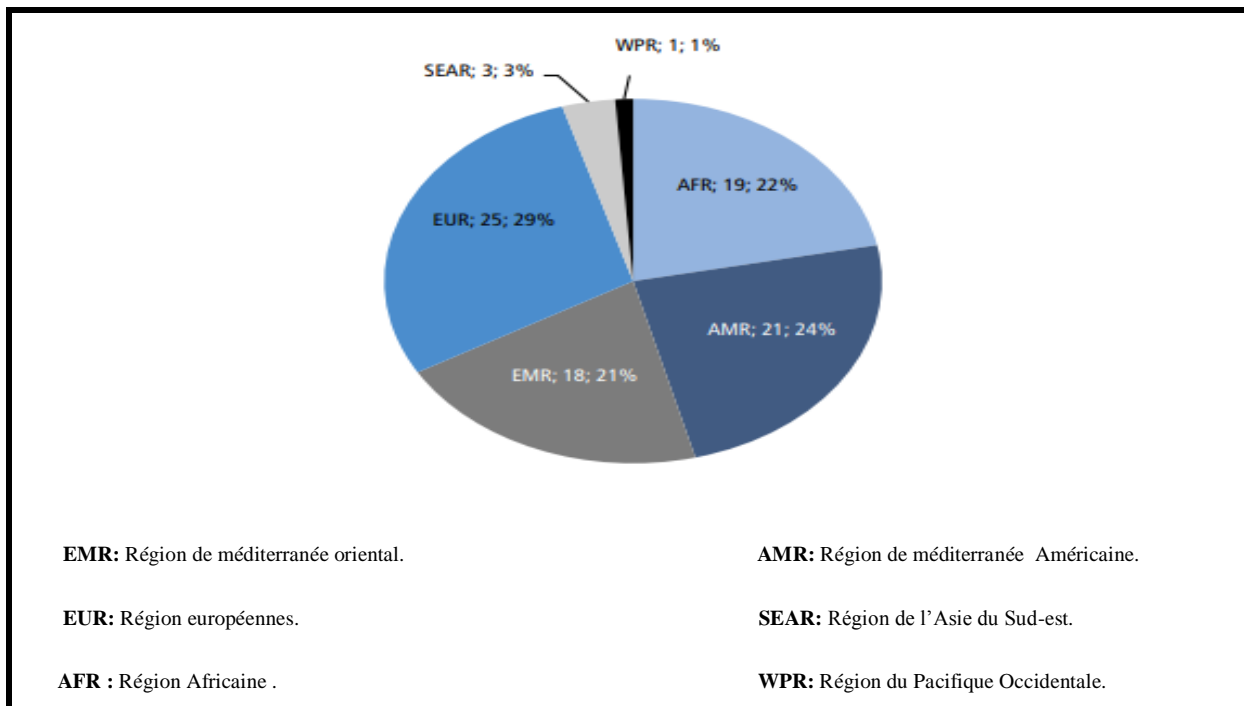
Chaque année l'OMS enregistre 500.000 à 1000.000 de cas de leishmaniose cutanée, affectant surtout les populations les plus pauvres, à cause des conditions de vie souvent défavorables : malnutrition et manque d'hygiène. [1][5][7]



**Figure 04** : Répartition géographique de leishmaniose cutanée dans le monde(en jaune). [7]

D'autre part, la LC est la forme la plus fréquente de la parasitose, le relevé épidémiologique hebdomadaire de l'OMS (2017), déclare que l'année 2015 enregistre des cas variés de LC chez **57** pays parmi les **87** pays dans le monde (**figure 05**). Ces derniers ont été principalement observés dans deux régions : européenne et la méditerranée Américaine. Des pourcentages moyens en Afrique et la méditerranée orientale . Des pourcentages très faibles à nuls en l'Asie du Sud-est et au Pacifique Occidentale. [7]

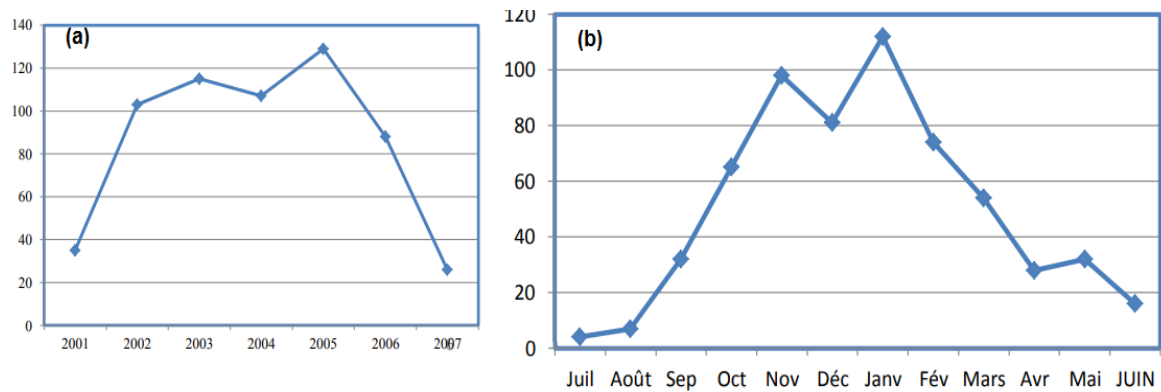




**Figure 05 :** Diagramme représente le nombre de pays d'endémie pour la LC. [7]

## II – 2. La Leishmaniose cutanée en Algérie

Selon l'OMS, la LC est une maladie très fréquente en Afrique et surtout en Algérie, où elle représente un sérieux problème de santé publique qui s'est accentué durant ces dernières années. Certaines régions présentent des taux parmi les plus importants dans le monde.[2][3] En effet, de 2001 à 2007, une équipe du service des maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital militaire universitaire de Constantine a observé un pic du nombre des cas en 2005, environ 25000 personnes de 19 à 45 ans (**figure 6-a**), en majorité de sexe masculin. Cette équipe signale également que la LC peut être présente toute l'année, mais avec des pics observés surtout en l'hiver (**figure 06- b**), généralement d'octobre à mars. [3]



**Figure 06 :** Diagramme de la distribution des cas de LC par Année (a), et par mois (b). [3]

### III – Parasitologie ; *Leishmania*

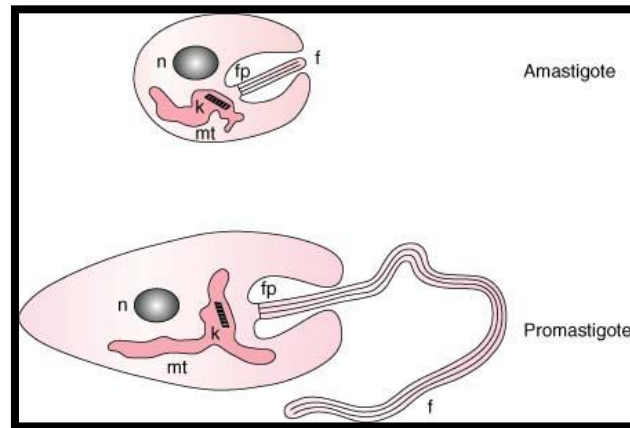
#### III – 1. Le parasite

La Leishmaniose cutanée est due à un parasite unicellulaire (Protozoaire), dont la classification est la suivante : [19]

1. **Règne :** Protista
2. **Sous-Règne :** Protozoa
3. **Embranchement :** Sarcomastigophora
4. **Sous-Embranchement :** Mastigophora
5. **Classe :** Zoomastigophorea
6. **Ordre :** Kinetoplastida
7. **Sous-Ordre :** Trypanosomatina
8. **Famille :** Trypanosomatidae
9. **Genre:** *Leishmania*

#### III – 2. Les formes parasitaires

Ces cette famille, les parasites sont présents sous deux formes (**figure 07**), dont chacune possède un noyau central (**n**), un Kinétoplaste (**K**) présent dans la seule mitochondrie (**mt**) , ainsi qu'un flagelle (**f**) provenant d'une poche flagellaire (**fp**) .



**Figure 07** : Les formes parasitaires du *Leishmania*. [6]

### La forme amastigote

Les leishmanies amastigotes sont de petite taille, celle-ci varie de 2 - 5 micromètres de long et environ 2 micromètres de large, leur forme est arrondie et sont immobiles. Elles vivent à l'intérieur des leucocytes mammifères (cellules hôtes) où elles se multiplient jusqu'à provoquer l'éclatement des cellules hôtes (**figure 07**). [1][2][9][10]

### La Forme promastigote

Les leishmanies promastigotes sont de forme plus allongée que les amastigotes, leur taille est de 10 à 25 micromètres de long, et de 4 à 5 micromètres de largeur, elles sont présentent un flagelle qui assure leur mobilité (**figure 07**). [1][2][9][10]

Les promastigotes vivent et se multiplient dans l'intestin de l'insecte qui transmet la leishmaniose (vecteur). C'est cette forme ci du parasite qui est mise en culture.

## III – 3. Les différentes espèces de Leishmaniose cutanée

La Leishmaniose cutanée peut être causée par différentes espèces appartenant au genre *Leishmania*, selon l'OMS (2004), il y aurait plus de 20 espèces, leurs seul point commun est d'être transmises dans des conditions naturelles par la pique d'un phlébotome femelle. Les plus fréquents restent : *L.infantum*, *L.mojor*, et *L.tropica*. [2]

### *L.infantum*

*L.infantum* est une espèce fréquente au niveau des zones humides et sub-humides, elle est d'une importance zoonotique car elle est l'agent de la LC affectant surtout les chiens et est beaucoup plus rare chez l'homme.[11]

### *L.mojor*

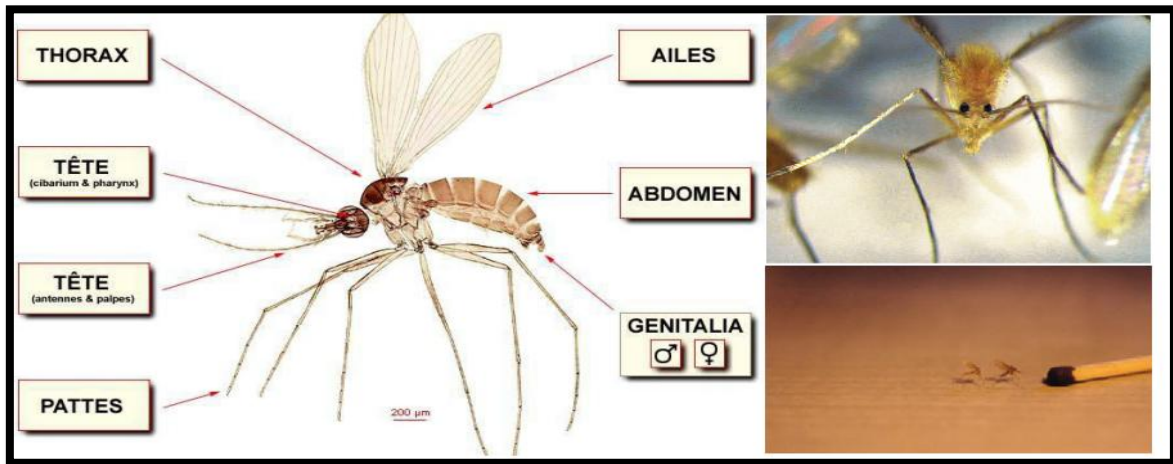
Il s'agit d'une forme de LC ne provoquant que des lésions bénignes chez l'homme, elle est également l'agent de la LC zoonotique, affectant généralement l'hôte réservoir représenté par les rongeurs. [12]

### *L.tropica*

C'est l'agent de la LC anthroponotique, elle cause des lésions dites 'sèches' transmissibles d'humain à humain. [13]

## **III – 4. Le vecteur**

Les Leishmanies sont transmis d'un vertébré à l'autre par l'intermédiaire d'un vecteur qui est généralement un insecte : la femelle du phlébotome, d'une taille de 2 à 3 millimètres de longueur, de couleur jaune paille, recouvert d'un tissu épais lui permettant de se déplacer silencieusement. Leur morphologie générale est incurvée avec de longues pattes, une pilosité développée et des ailes dressées au repos au dessus du corps à 45 degrés, il y'a une pièce buccale piquante et grattant le derme des cibles (**figure 08**). [2][11][14][15][16]



**Figure 08 :** Morphologie et photographie du phlébotome. [11][24]

La Phlébotome est également appelé « **la mouche de sable** », il est présent dans les zones sombres, dans les fissures, et dans les nids d'oiseaux où l'humidité et les matières organiques nécessaires pour la nourriture des larves sont abondantes. [2][11][14][15]

### III – 5. Les réservoirs

Les leishmanies affectent les vertébrés d'une manière générale mais avec différents types de persistance, on en distingue principaux types : [2]

- La première, quand les parasites sont transmis de l'humain à l'humain, ces parasites forment des réservoirs et persistent chez l'homme (**LC Anthroponotique**).
- La deuxième, le réservoir est représenté par des formes d'animaux sauvages, principalement des espèces de rongeurs (**LC zoonotique**).

### III – 6. Transmission

La femelle du phlébotome par leur pique avec leurs pièces buccales, produisent un creux ou un trou par le grattage des tissus du derme de l'hôte infecté, celui-ci contient des macrophages contenant la forme d'amastigote du parasite. En aspirant le sang, le vecteur aspire également ces macrophages. [2][9][10][13][16]

Les amastigotes se transforment en promastigotes dans l'intestin moyen de l'insecte et vont s'y multiplier. Les promastigotes prennent une forme méta-cyclique et deviennent infectieuses. Ce changement de forme nécessite le séjour de ces promastigotes dans l'intestin moyen durant 5 à 7 jours en moyenne. La forme infectieuse migre par la suite vers la trompe, le phlébotome est alors infectieux. [2][21][23]

Après un nouveau repas de sang, le phlébotome injecte les promastigotes, dans le derme d'une nouvelle cible (figure 09). Les promastigotes se convertissent amastigotes, ils sont phagocytés par les macrophages où ils se multiplieront par fission binaire. Généralement, l'apparition d'une lésion cutanée nécessite plusieurs semaines voire plusieurs mois afin qu'elle soit bien visible. [2][23]

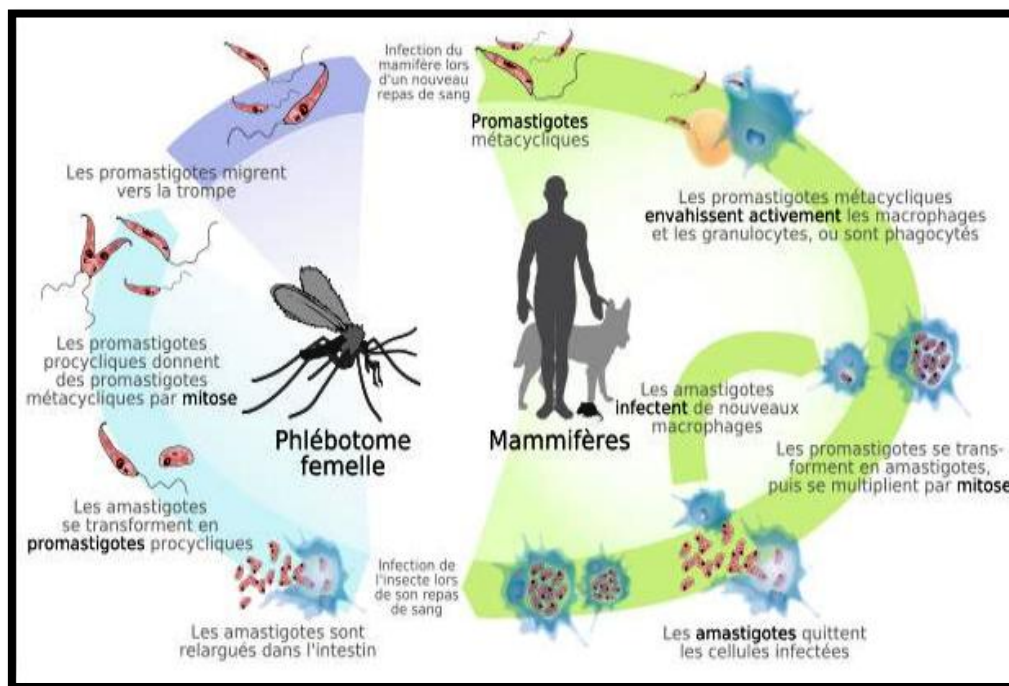


Figure 09 : Le cycle évolutif de la Leishmaniose. [17]

### III – 7. Facteurs affectant la transmission

#### III – 7.1. Mouvement de population

La transmission de la Leishmaniose est étroitement associée à la migration des populations, surtout lorsqu'il y'a un déplacement de personnes porteuses de la maladie vers des zones de transmission déjà existantes. C'est pour cette raison, qu'il est indispensable d'évaluer les risques avant de mettre en œuvre n'importe quel projet impliquant un mouvement de la population dans ces régions. [2]

#### III – 7.2. Facteurs socio-économiques

Selon l'OMS, le risque de transmission de la leishmaniose cutanée est étroitement lié aux conditions sociales et se trouve accru par la mauvaise gestion des déchets, les égouts ouverts, les mauvaises conditions sanitaires des logements, en résumé tout ce qui favorise la multiplication des foyers du phlébotome et facilite son accès à l'homme.

#### III – 7.3. Facteur de risque environnementaux

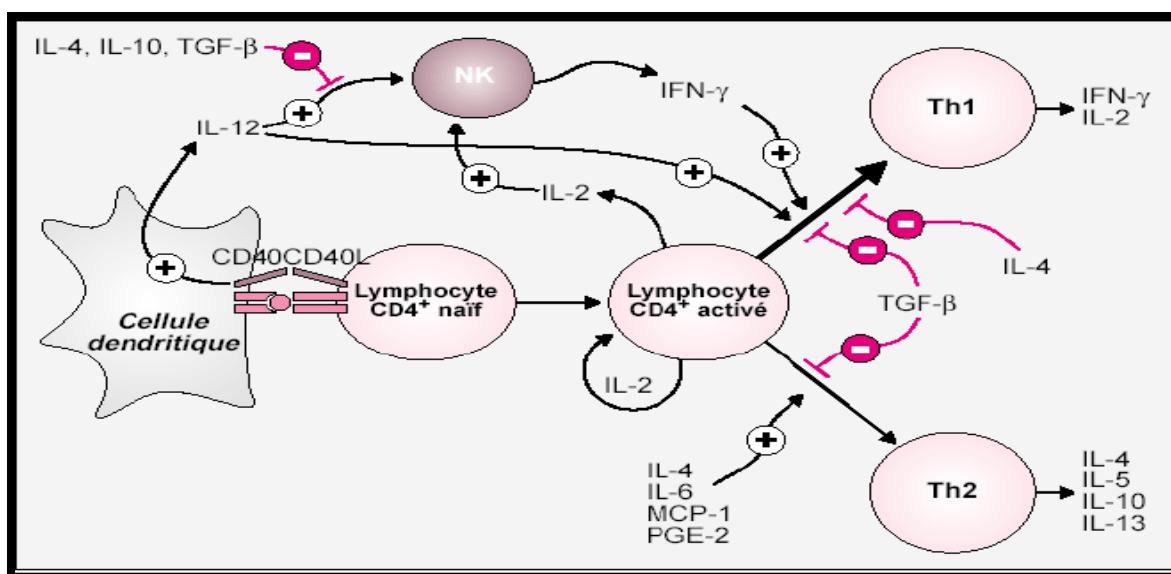
Le risque de transmission de la leishmaniose cutanée, dépend d'une manière très importante du climat et se trouve augmenté par le taux des précipitations, la température et l'humidité.

### IV – L'immunité contre la Leishmaniose

L'infection protozoaire telle que la leishmaniose, est une véritable menace pour la santé dans les pays en voie de développement. [8][18] Il est très difficile de s'immuniser contre les protozoaires, car la protection requière spontanément l'immunité cellulaire et humorale. [19]

La réponse immunitaire de l'hôte vertébré va se dérouler en plusieurs phases. Dans un premier temps. L'immunité innée naturelle va être activée lors de l'infection. Rapidement, la réponse immunitaire précoce non-adaptative va prendre le relais (**cellules NK**) (**figure 10**). Dans un deuxième temps, l'activation des lymphocytes T dépend de l'interaction entre les récepteurs lymphocytaires et les molécules de CMH présentées

par les cellules dendritiques. La réponse à médiation humorale se caractérise par la production d'interleukines 4, 10 et 13 (IL-4, IL-10, IL-13), par les cellules Th2 et conduit à la survie du parasite (**figure 10**). La réponse à médiation cellulaire protectrice est quant à elle définie par la production, par les cellules Th1, d'IL-12 et d'interféron gamma (IFN-gamma) et conduit à la mort des *Leishmania* (**figure 10**) On peut noter que cette dichotomie, nette chez les autres espèces de *Leishmania*. [8][21]



**Figure 10** : Différenciation des lymphocytes T CD4+, lors de l'infection par les leishmanies.

[8]

### V – Co-infection VIH/Leishmaniose

La leishmaniose comme toute maladie, peut être associée à une autre infection, souvent avec le virus d'immunodéficience humaine (VIH), ou le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), notamment dans le sud de l'Europe. [18]

La Co-infection VIH/Leishmaniose, est le cas d'un chevauchement entre deux maladies infectieuses, le VIH et la leishmaniose, mais généralement la LV est souvent associé à le VIH, et rarement la LC. [1][21][22]



## VI – diagnostic de LC

Il est obligatoire d'obtenir une confirmation parasitologique du diagnostic avant de s'engager dans un traitement anti-leishmaniose souvent contraignant et présentant de nombreux effets secondaires.

### VI – 1. Examen microscopique

Il permet la recherche des amastigotes intracellulaires dans les macrophages sur un frottis à la périphérie de la lésion. Les frottis fixés puis colorés au Giemsa. Généralement la microscopie semble être le meilleur examen pour le diagnostic. [25]

### VI – 2. Culture

Elle permet la croissance des formes promastigotes, dans des milieux d'isolement appropriés le plus utilisé est le milieu NNN, il donne d'excellents résultats avec un minimum de risque de contamination. Ce milieu est additionné d'antibiotiques : pénicilline- gentamycine. [26]

D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI . [26]

### VI – 3. Ponction ou biopsie

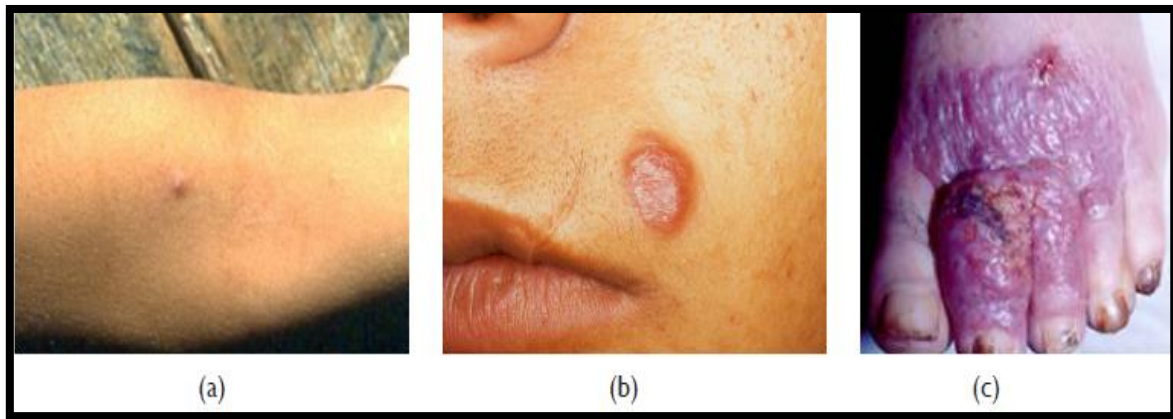
C'est une méthode moderne, permettant la mise en évidence d'infimes quantités de matériel génomique parasitaire, aussi de déterminer avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable, par la recherche d'anticorps monoclonaux et d'acides nucléiques parasites, par hybridation moléculaire (**sondes marquées aux isotopes**) ou amplification de séquences identifiées (**PCR**) suivie d'hybridation. [21]

## VII – Traitement de LC

La LC n'est pas une maladie mortelle, ou met la vie en danger, il est rarement de voire une complication grave. Cependant, son apparence sur la peau est indésirable et il s'agit donc beaucoup plus de préjudice esthétique.

Un grand nombre d'interventions thérapeutiques ont été utilisées pour la LC, ainsi que les espèces infectantes, le statut immunitaire, la taille de

lésion, le nombre des lésions, chez le patient peut affecter l'efficacité du traitement (**figure 11**). [2]



**Figure 11** : Cas de LC : (a) Papule (moins 1 cm), (b) nodule (moins de 4 cm), et (c) plaque (supérieure ou égale à 4 cm) .[2]

Selon l'OMS, le traitement face à la LC, doit prendre en compte trois situations:

#### Situation 01

Cette situation, est quand le patient présente moins de **04** lésions des tailles limitées, qui ne sont pas dans les zones apparentes du corps comme le visage ou les doigts, et ne présente pas de maladies chroniques comme le diabète. Généralement, dans ce type de situations il peut y avoir une guérison spontanée au fil du temps, un traitement local à base d'antiseptiques est suffisant. L'évolution des lésions est surveillée, si elles n'évoluent pas d'une manière satisfaisante le passage à la situation 2 s'impose. [2]

#### Situation 02

Le patient présente toutes les caractéristiques définies dans la première situation avec une mauvaise évolution, l'espèce impliquée peut être *L.infantum* ou *L.tropica*.

Il y a plusieurs options thérapeutiques utilisées pour la LC dans cette situation : [2]

- ✓ Cas de *L.infantum*, une pommade antibiotique : la **Paramomycine** à utilisation locale deux fois par jour pendant 20 jours.
- ✓ La **cryothérapie**, application sur la zone à traiter d'azote liquide à très basse température (**-195°C**) sur la lésion et en dehors de la zone (**environ 2 mm**) par l'utilisation d'un pulvérisateur jusqu'à ce que la lésion blanchisse puis une injection intra lésionnelle d'**Antimonié**.
- ✓ La **Thermothérapie** est l'application d'une chaleur locale de **50 °C** pendant **30** secondes en moyen, puis application d'un gel de **Dioxyde de chlore**.
- ✓ L'injection d'**Antimonié** seule de 1 à 5 millilitres, deux fois par jour jusqu'à la guérison complète.

### Situation 03

Quand les traitements des deux situations précédentes (**situation 01, et situation 02**), n'ont eu aucun effet, ou bien lorsque le patient présente plus de **04** lésions de tailles plus grandes (**supérieurs ou égales à 4 centimètres**), avec d'autres maladies associées : diabète, VIH..ect, le traitement consiste alors en l'administration par voie générale d'**Antimonié pentavalent systémique**, pendant **21** jours d'une dose présente selon le poids de patient, généralement **20** milligramme/kilogramme par jour. [2]

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

*Chapitre II*

**ETAT DES CONNAISSANCES SUR  
LA**

***PEGANUM HARMALA***

## I - Définition de la Phytothérapie

La phytothérapie dérive de deux mots grecs qui signifient essentiellement « **soigner avec les plantes** ». Il s'agit en l'administration d'un traitement basé sur l'usage de substances d'origine végétale. Cette thérapie, est considérée selon l'**OMS** comme une médecine traditionnelle qui malgré le progrès de la pharmacologie, demeure encore massivement utilisée dans les pays en voie de développement. La Pharmacognosie est une science appliquée considéré comme une phytothérapie grâce a leurs substances ou matières à potentielle médicamenteuse d'origine biologique végétale.[29] Il y a un large domaine d'applications de la phytothérapie, telle que le domaine cosmétique (**par la reproduction des savons, des poudres, des crèmes, déodorant..... à la base des plantes naturelles**), et les traitements des maladies dermatologiques...

## II – Définition des plantes médicinales

Dans le code de la santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « **une plante médicinale** » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. [30]

### III - Présentation du genre *Peganum harmala*

#### III – 1. Description botanique



**Figure 12** : La plante de *peganum harmala* (L'harmel). [31]

La *peganum harmala* (***P.harmala***) ou l'Harmel est une plante médicinale vivace, ligneuse, de 40 cm de haut. Les feuilles alternes vert glauque (**vert qui tire vers le bleu**) divisées ; Elles émettent une odeur forte désagréable quand on les froisse. Les fleurs possèdent 5 pétales blanc-jaunâtre (**figure 01**); le fruit, une capsule sphérique qui contient des graines noires en forme de triangle (**figure 02**). [4]

#### Classification :

1-**Règne** : *Plantae*

2 -**Sous règne** : *Tracheobionta*

3-**Division** : *Magnoliophyta*

4-**Classe** : *Magnoliopsida*

5-**Ordre** : *Sapindales*

6-**Famille** : *Zygophyllaceae*

7-**Genre** : *Peganum*

8-**Sous genre** : *peganum harmala*



**Figure 13 :** fruit et graines de *Peganum harmala*. [32]

### III – 2. Habitat

*Peganum harmala*, comme toute plante, se développe sur les décombres, les bords des chemins et les parcours steppiques dégradés, il pousse en Afrique du nord, l' Irak , le Koweït, la Jordanie, et la Syrie. [4][33]

C'est généralement, une plante saisonnière qui pousse de manière importante en été et au printemps .

### III – 3 . Propriétés pharmacologiques

Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle en tant que calmant, et vermifuges. Elle est aussi utilisé pour traiter les maux de tête, les douleurs nerveuses, et les crises cardiaques. [4] A partir de l'extraction des huiles des graines, il est possible de traiter diverses maladies cutanées et oculaires. Le broyat des graines augmente la fertilité masculine et la lactation chez la femme. [4][33]

### III – 4. Principes actifs

#### III – 4 .1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont naturellement présents dans les plantes telles que la *P.harmala*, les graines et les racines contiennent les alcaloïdes actifs suivants :[4]

##### L' harmaline

L'Harmaline, est l'alcaloïde majeur du *P.Harmala*, il semble agir comme MAOI (**MonoAmineOxidase Inhibiteur**) réversible. C'est un alcaloïde indole psychoactif fluorescent du groupe des alcaloïdes, harmala et des bêta-carbolines sont la forme partiellement hydrogénée de l'harmine.[34]

##### L'Harimine

Ces alcaloïdes possèdent des diverses activités pharmacologiques, et propriétés de neuromodulation. Ils stimulent le système nerveux central et sont mentionnés comme hallucinogènes dans la littérature. L'Harimine est un dérivé méthylé de la  $\beta$ -carboline de formule moléculaire  $C_{12}H_{10}N_2$ . [34]

##### L' Hermalol

*Hermalol* est un bêta-carboline bioactif et un membre des alcaloïdes harmala.[35]

##### La Pyganine

La peganine ou vasicine, est un alcaloïde de la quinazoline, il a un effet dépresseur cardiaque, tandis que la pegarine est un stimulant cardiaque faible; l'effet peut être normalisé en combinant les alcaloïdes. Il aurait également un effet tonique du muscle lisse.



### III – 4. 2. Les huiles

Une recherche sur les qualités organoleptiques de l'huile des graines de *Peganum harmala* a montré qu'elles étaient comestibles. Cette huile, composée majoritairement :[36]

#### Acide oléique

L'acide oléique est un acide gras mono-insaturé à 18 atomes de carbone, son nom vient du latin oléum. C'est le plus abondant des acides gras dans la nature. Il est le plus abondant dans le tissu adipeux humain et le plasma.

#### Linoléique

L'acide linoléique est un acide gras polyinsaturé à longue chaîne, de la famille des oméga-6. Sa désignation biochimique est 18:2 (n-6). 18 correspond au nombre d'atomes de carbone et 2 au nombre de liaisons. Cet acide gras est dit essentiel car il ne peut être synthétisé par l'organisme.

#### Palmitique

Un acide gras saturé, comme l'acide palmitique, est un acide gras ayant des atomes de carbone complètement saturés en hydrogène. On le symbolise souvent par les nombres 16:0 pour indiquer qu'il a 16 carbones et aucune liaison éthylénique.

On le retrouve très largement dans l'industrie alimentaire (biscuiterie, margarine, etc.). En règle générale, les matières grasses riches en acides gras saturés sont solides à température ambiante.

RVUE EXPERIMENTALE

## *Chapitre III*

# **MATÉRIEL & MÉTHODES**

Cette partie s'articule autour de quatre volets, la préparation des différents extraits à partir de *P.harmala*, la préparation des milieux de culture, les prélèvements et mise en culture du parasite et enfin les testes in vitro.

## **I. Préparation des extraits à partir de *P.harmala***

Notre plante, *P.harmala* a été récoltée dans la région d'El Kheither, wilaya d'El Bayadh. On procède d'abord à un séchage à l'ombre à température ambiante puis à un fin broyage, le but étant d'obtenir un extrait aqueux et une huile essentielle par les différents moyens prévus à cet effet et disponible dans le laboratoire de la faculté des sciences département de biologie de l'université de Saida.

### **I.1. Préparation de l'extrait aqueux**

#### **I.1.1. Par Macération**

Il s'agit d'une technique d'extraction solide-liquide destinée à retirer d'une substance solide les espèces chimiques qu'elle contient en les diluant dans un liquide. La macération est en effet une extraction « à froid », ce qui ne signifie pas qu'elle s'accompagne d'un refroidissement mais tout simplement qu'elle se fait à température ambiante sans bénéficier d'une hausse de température qui accélère la plupart des phénomènes chimiques. [37]

#### **Matériel :**

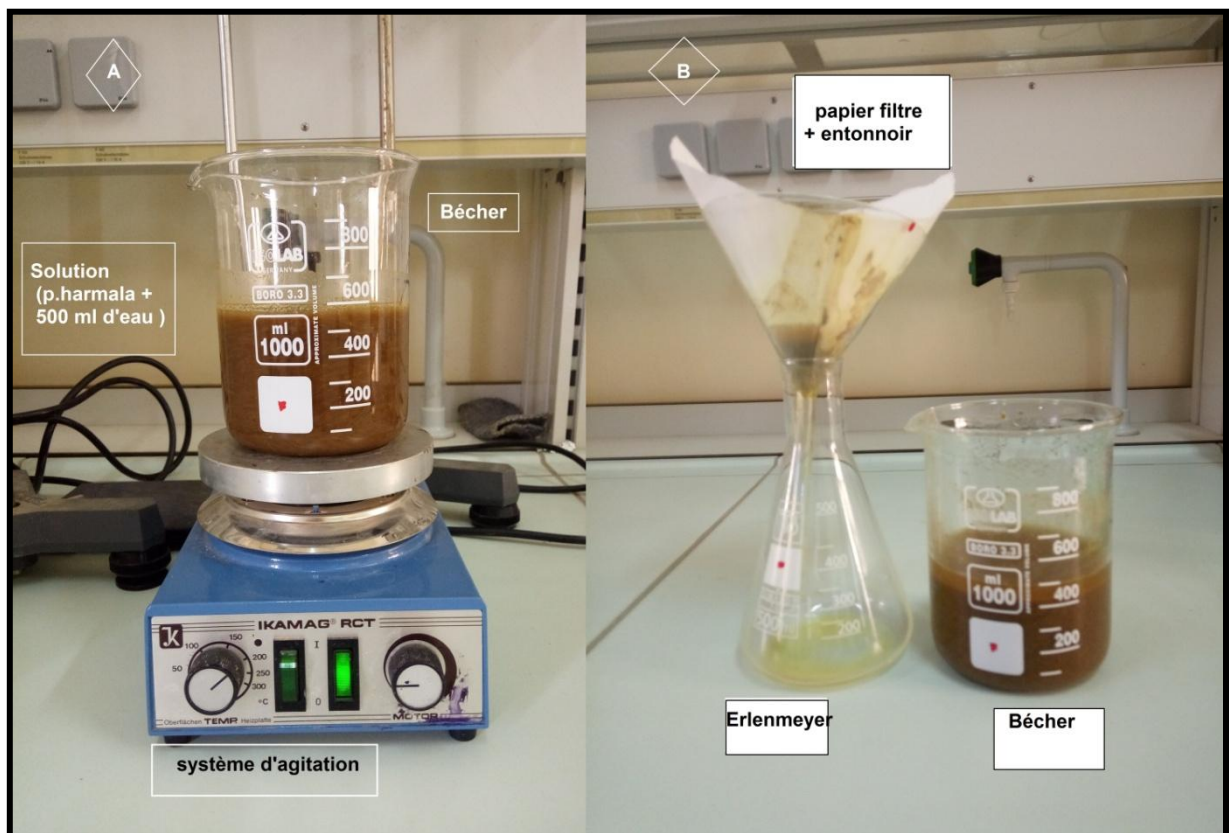
Le matériel utilisé pour réaliser cette extraction est :

- |                                           |                                      |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| -12.5 g de <i>P.harmala</i> .             | -250 ml d'eau distillé.              |
| -Agitateur                                | -Bécher                              |
| -Papier filtre + entonnoir + erlenmeyer . | -Papier aluminium + flacon en verre. |

**Méthodes**

Dans un bécher on met les 12.5 g de la plante et les 250 ml d'eau, puis on les place dans un agitateur pendant 24 heures (**figure 14 A**).

Après les 24 heures on a procédé à la filtration (**figure B.14**), puis récupère le filtrat dans un flacon en verre recouvert par de l'aluminium (figure 16), la conservation s'effectue à 4°C.



**Figure 14:** (A) Protocole de macération. (B) Protocole de filtration.



**Figure 15 :** Flacon avec extrait final.

**Note :** Pour réaliser les tests in vitro on a préparé l'extrait aqueux par macération en trois concentrations différentes 1%, 3% et 5% à partir de la *Peganum harmala* (**1 g pour 100ml, 3g pour 100ml et 5g pour 100ml**).

#### I.1.2. Par Décoction

La décoction est une méthode d'extraction consistant à chauffer l'élément avec de l'eau, jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante, afin d'en extraire les principes actifs. [37]

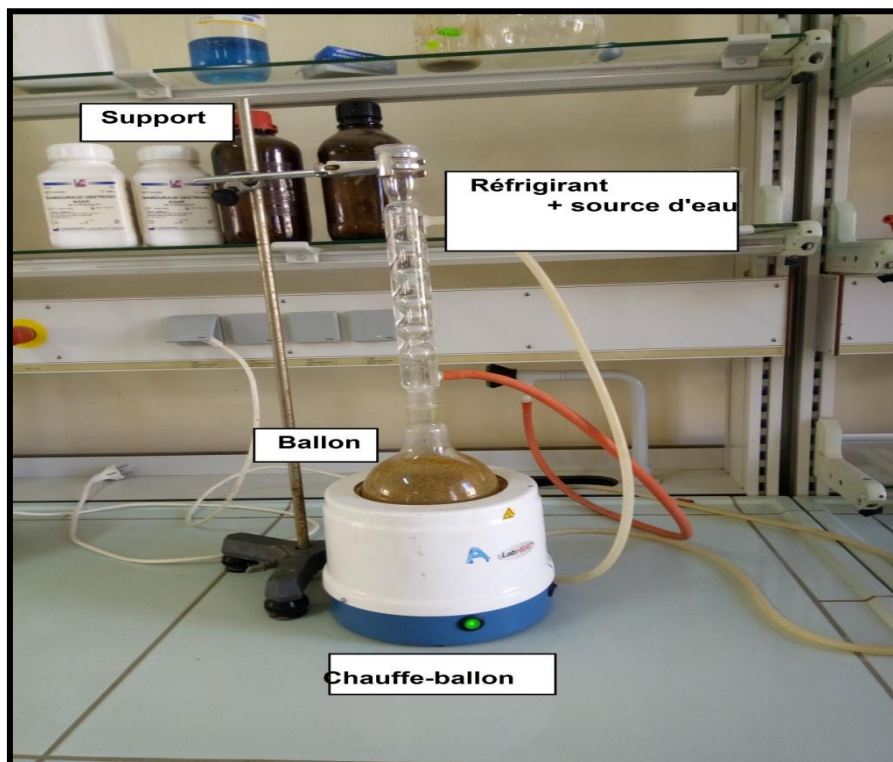
#### Matériel :

- 12.5 g de *P.harmala*
- 250 ml d'eau distillé.
- chauffe-ballon.
- Ballon.
- Réfrigérant associé d'une source d'eau froide.
- Erlenmeyer + entonnoir + Papier filtre.
- Flacon en verre + papier aluminium.

#### Méthodes :

Dans un ballon on met 12.5 g de *P.harmala* et les 250 ml d'eau, on les place dans un chauffe-ballon associé au réfrigérant (**figure 16**). Après 02 heures on y filtre notre solution (**figure 14.B**).

Le filtrat est conservé à 4°C dans un flacon en verre recouvert par de l'aluminium (figure 15).



**Figure 16 :** Montage de l'extraction par décoction.

### **I .1.3. Par la méthode de soxhlet**

Un extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction par solvant en continu d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide. Elle requiert nettement moins de solvant que la méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. [38]

#### **Matériel :**

- 12.5 g de *p.harmala*.
- 250 ml d'eau distillé.
- Chauffe-ballon.
- Ballon.
- Extracteur de soxhlet.
- cartouche en cellulose.
- Réfrigérant associé à une source d'eau froide.
- Flacon en verre + aluminium.

**Méthodes :**

On place les 12.5 g de *P. harmala* dans la cartouche, puis dans le réservoir de soxhlet et remplir le ballon avec les 250 ml d'eau distillée et on surmonte l'extracteur d'un réfrigérant. A l'aide d'un chauffe ballon, on porte le solvant à ébullition (**figure 17**). Le produit passe par la première tubulure et est condensé par le réfrigérant. Il tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la substance à extraire de *P.harmala*. Le réservoir se remplit dès que le niveau de solvant est à la hauteur du deuxième coude, le réservoir se vidange automatiquement. Le solvant et la substance à extraire sont entraînés dans le ballon. Pour réaliser une extraction correcte d'une substance, on réalise trois cycles tels que décrit précédemment.

-Le 1<sup>er</sup> cycle commence après 01 heure et 09 minutes de la réalisation de notre protocole.

-Le 2eme s'effectue après 11 minutes du 1<sup>er</sup> cycle.

-Le 3eme et dernier cycle se termine 6 minutes après le 2eme cycle.

L'extrait final est conservé à 4°C dans un flacon recouvert par de l'aluminium (**figure 15**).

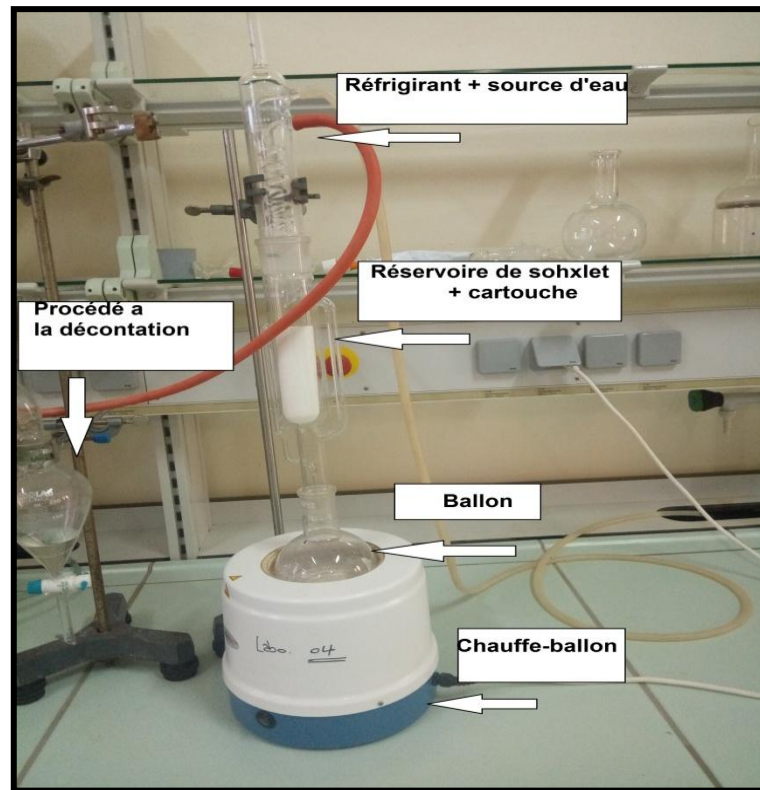


Figure 17 : Le montage de soxhlet.

## I .2. Extraction de l'huile essentielle

Sont appelée huile essentielle, ou parfois essences végétales, le liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Elles sont obtenues par extraction mécanique, entraînement à la vapeur d'eau ou par distillation à sec. Dans notre laboratoire, nous les obtenons par hydro-distillation classique.[39]

### I .2.1. Extraction par hydro-distillation

L'hydro-distillation est la méthode la plus utilisée pour extraire des huiles essentielles. Elle consiste à entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau. Cette technique est très ancienne. [39]



**Matériel :**

-50g de *P.harmala*.

-400ml d'eau distillé.

-Chauffe-ballon.

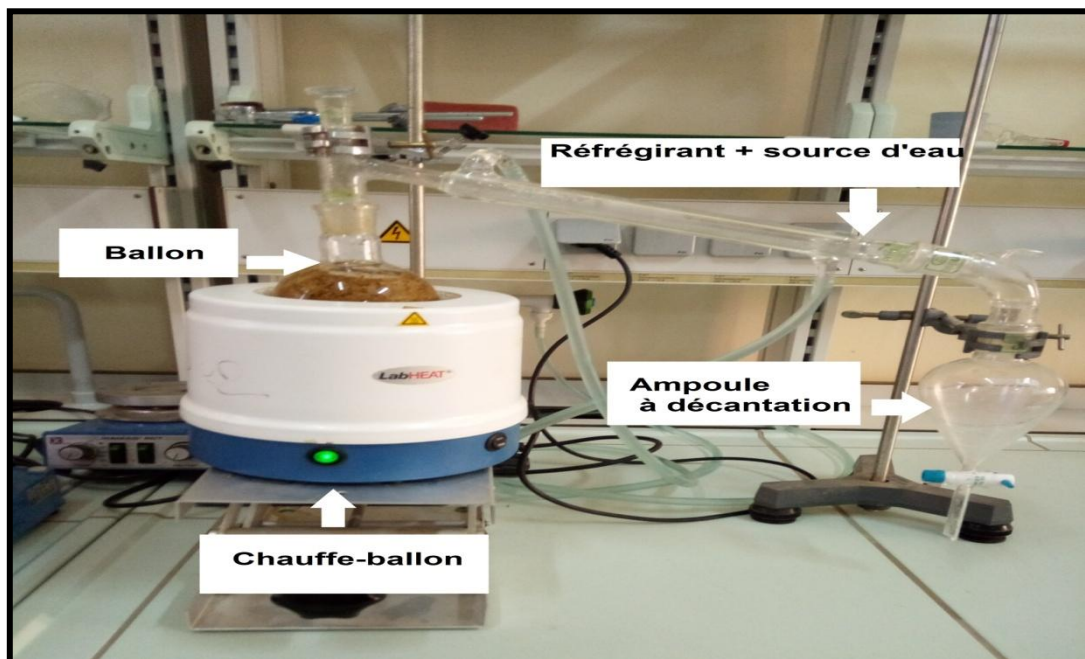
-Ballon.

Réfrigérant associée d'une source d'eau.

-Ampoule à décantation.

**Méthodes :**

Dans le chauffe ballon on place le ballon contenant la masse de la plante et l'eau distillé, ce ballon associés au réfrigérant est à son tour associé à l'ampoule à décantation (**figure 18**). On ajoute moins de 02 g de NaCl sur notre distillat pour faciliter la séparation de la phase hydrophobe et phase hydrophile.



**Figure 18 :** Extraction de l'huile par hydrodistillation classique.

## II. Préparation des milieux de culture des Leishmanies

### II .1 Milieu NNN (Novy-McNeal-Nocolle)

C'est le milieu le plus utilisé, pour les formes promastigotes du parasite (*leishmania*), c'est un milieu diphasique composé d'une phase solide faite de gélose salée avec 10% de sang de lapin défibriné et d'une phase liquide constituée de l'exsudat produit à partir de la gélose au sang (où se multiplier les leishmanies). [40]

#### Prélèvement du sang de lapin

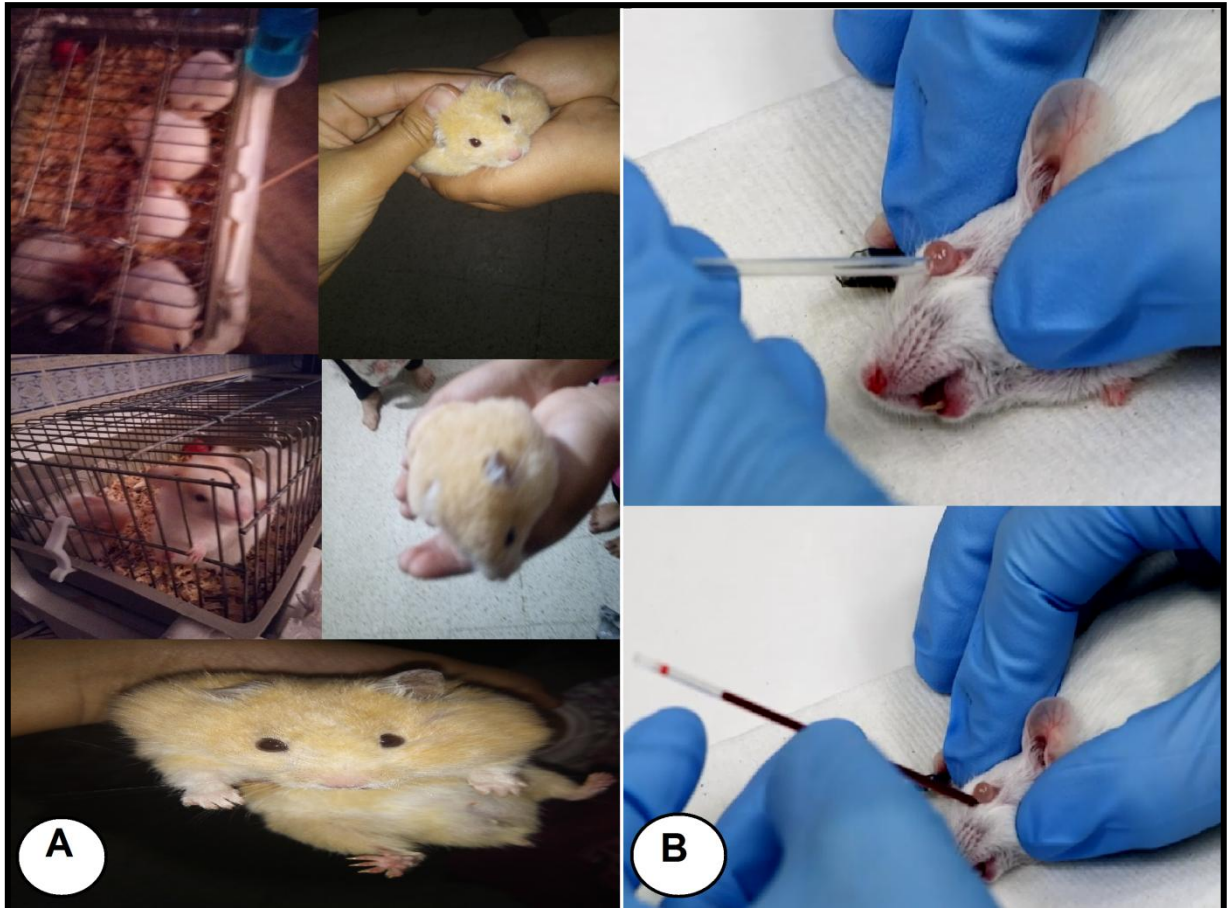
Sur un lapin adulte sain, (**figure 19.A**), on effectue un prélèvement par ponction cardiaque, pour ce faire, on place le lapin sur son dos, on stérilise la partie à piquer avec de l'alcool iodé, puis on identifie la zone de forts battements (**figure 19.B**). La pique s'effectue par une aiguille inclinée d'environ 30°, une fois que le sang arrive on aspire lentement sans bouger la seringue. [41]



**Figure 19** : A : lapin sain adulte ; B : Prélèvement du sang du lapin par ponction cardiaque (1:identification de la partie à piquer, 2: pression, 3:aspiration du sang).

**Prélèvement du sang d'hamsters**

On effectue des prélèvements oculaires sur de jeunes hamsters à l'aide d'une pipette pasteur stérile (figure 20 A et B).



**Figure 20. A : jeunes hamsters ; B : prélèvement oculaire de sang.**

**Matériel du milieu NNN :**

- |                            |                                           |
|----------------------------|-------------------------------------------|
| -10g d'Agar-agar.          | -6g de NaCl.                              |
| -1000ml d'eau distillé.    | -plaque chauffante + système d'agitation. |
| -Autoclave(cocote).        | -40ml de sang du lapin/hamster.           |
| -3ml de citrate de sodium. | -250 000 U de pénicilline.                |
| -Erlenmeyer, Bécher.       | - bec bunsen.                             |
| -Tubes à vis stériles.     | -Papier aluminium.                        |

**Méthodes :**

- La première étape consiste en la préparation de la gélose, sur un agitateur chauffant on dépose un erlenmeyer contenant le NaCl et l'eau distillée. avant l'ébullition, on ajoute l'Agar-agar jusqu'à la dissolution complète (**figure 21.A**). On laisse bouillir environ 3 minutes, puis on verse la gélose obtenue dans des tubes à vis stériles à raison de 8 ml par tube (**figure 21.B**), on les autoclave à 120°C pendant 20 minutes puis on les conserve à 4°C.



**Figure 21** : A : Préparation de la gélose ; B : gélose dans les tubes à vis.

- La deuxième étape concerne le sang de lapin/hamster prélevé, il est additionné de pénicilline et d'anticoagulant, pour ce faire, on prend 40ml du sang dans un bécher stérile contenant 3 ml du citrate de sodium et de 250 000 U de pénicilline G, bien mélanger le tout puis conserver à 4°C.
- La troisième étape est le mélange de la gélose et du sang , on place nos tubes de gélose dans un bain-marie afin que la gélose fonde puis on les laisse refroidir à 45°C, 1ml de sang par tube sont ajouté (**il faut un bec bunsen**) puis les tubes sont agités manuellement (sans faire de bulle) et mis à refroidir en position inclinée (**figure 21**).

**Note :** Les milieux peuvent rester conservés à 4°C pendant 30 jours.



**Figure 22 :** Exemple des tubes inclinés.

## II.2 Milieu Harrat (1996)

Il s'agit d'un milieu mis au point par une équipe de l'institut Pasteur d'Alger, afin de réaliser des cultures de Leishmanies pour les confirmations de diagnostics dans les laboratoires souvent démunis des zones endémiques de la parasitose.

### Matériel :

-Sérum du lapin.

-Pénicilline G à 250 000 UI.

-tubes à vis stérile.

-casserole (bain marie).

-Bécher.

### Méthodes :

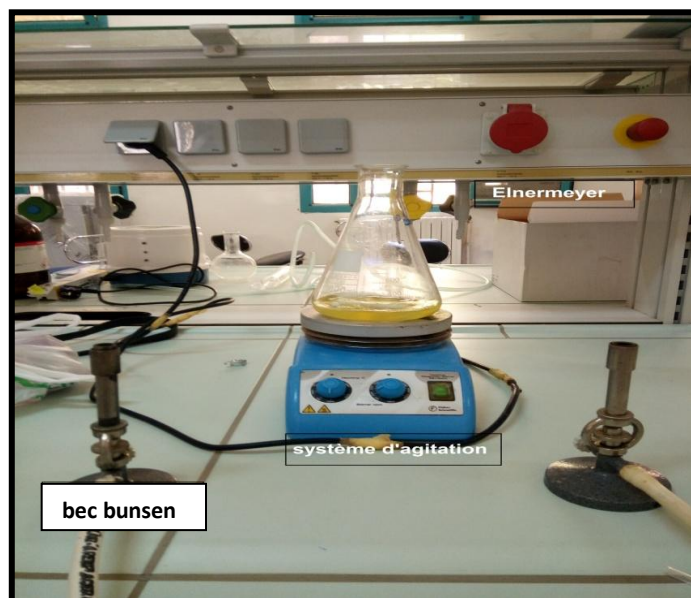
Après le prélèvement du sang du lapin on le récupère sur un flacon en verre contenant la pénicilline G à 250 000 U, on obtient le sérum par décantation du sang durant 24 heures. On met 3 ml de sérum par tube à vis stériles et on les incline dans un bain marie (**comme dans la figure 22**). La conservation se fait à +4°C.

**II .3 Milieu Bachi (2001) à base de blanc d'œuf****Matériel :**

- 04 blancs d'œufs.
- 300ul d'urine + micro-filtre.
- pénicilline à 250 000 UI.
- Tubes à vis stériles + l'aluminium.
- Bec bunsen.
- système d'agitation.
- Erlenmeyer.
- Tubes à vis stériles.
- Bain-marie.

**Méthodes :**

Dans un erlenmeyer avec agitation magnétique on pose les blancs d'œufs, la pénicilline G à 250 000 U, et les urines filtrées non contaminées jusqu'à l'homogénéisation de notre solution (**figure 23**). Après on met 3 ml par tube. Tout cela est réalisé dans une zone stérile des 2 becs bunsen. La coagulation est réalisée dans un bain-marie bouillant en plan incliné. La conservation du milieu se fait à +4°C.

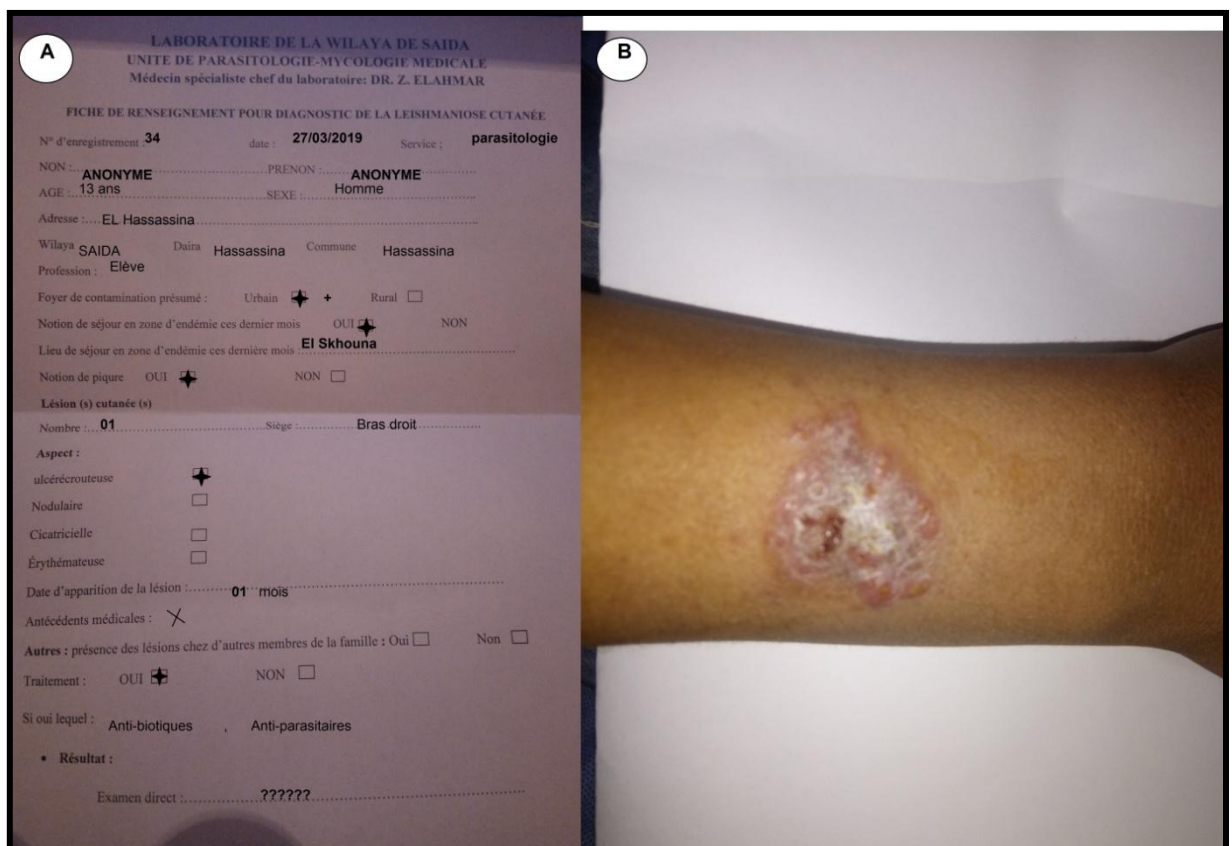


**Figure 23 :** Préparation du milieu Bâchi (2001).

### III. Prélèvement et mise en culture des Leishmanies

Les différentes étapes de ce volet ont été réalisées au laboratoire d'hygiène de la wilaya de Saida, sous l'égérie du parasitologue chef de service Dr Elahmar Zoheir.

Le premier patient est un enfant de 13 ans (originaire de la daïra d'El Hassasna, wilaya de Saida) présentant une lésion cutanée au bras droit (**figure 24.B**) qui s'est développée après environ 30 jours de la pique de l'insecte dans la région d'Ain Sekhouna wilaya de Saida (**figure 24.A**)



**Figure 24** : A : Fiche de questionnaire au patient ; B. Patient (l'Enfant) présentant une lésion cutanée.

Le deuxième patient est un jeune homme de 30 ans (originaire Skikda) présentant une lésion cutanée au pied gauche (**figure 25**) qui s'est développée après environ une semaine de la pique d'un insecte dans la région de Moulay El-Arbi wilaya de Saida.



**Figure 25 :** Patient (le jeune homme) présentant une lésion cutanée

### **III.1. Examen direct**

Il s'agit d'un examen microscopique afin de visualiser les leishmanies par coloration au May-Grunwald-Giemsa (MGG). [42]

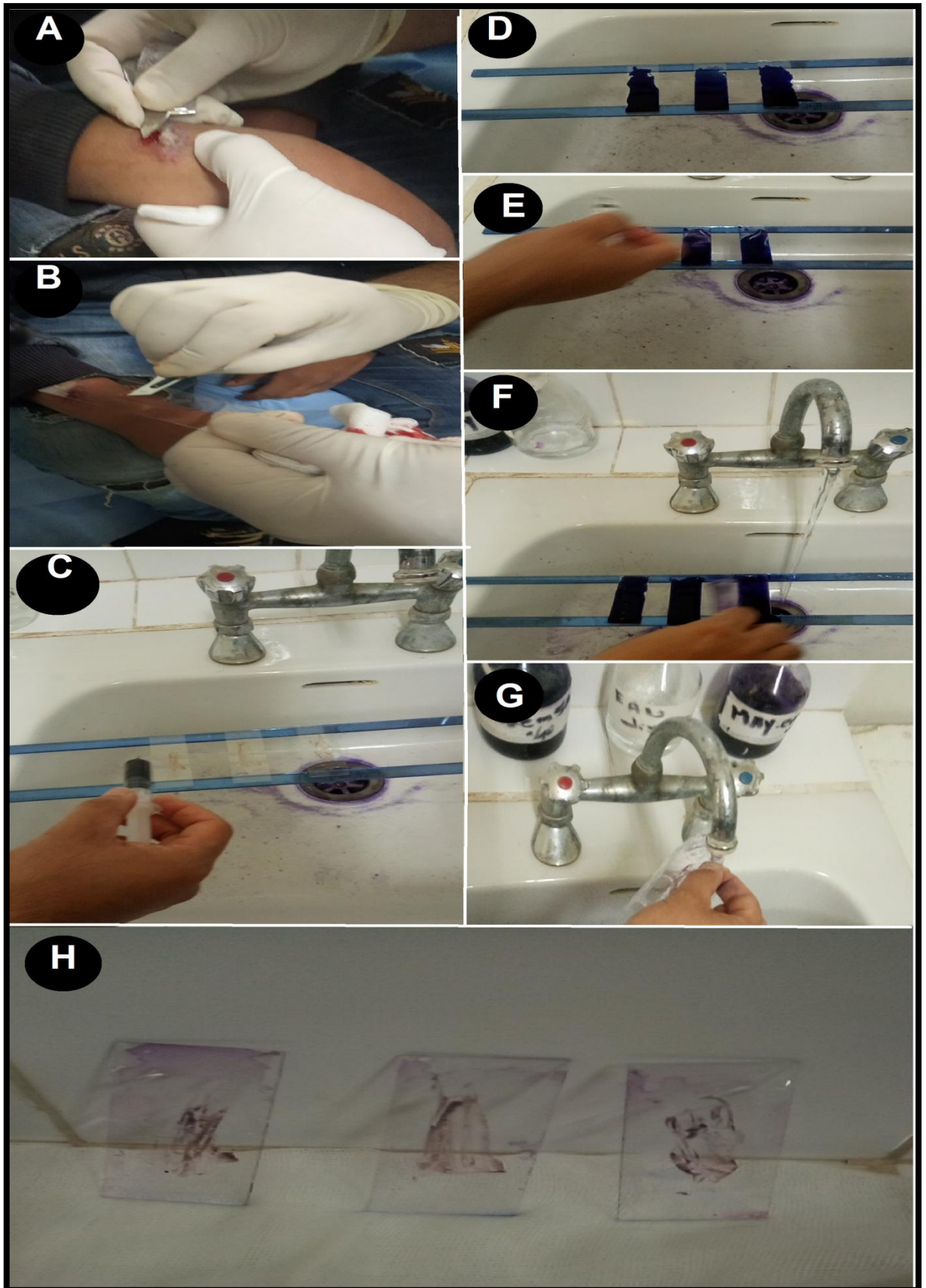
#### **Matériel :**

- Lame de bistouri stérile.
- Solution May-Grunwald.
- Lames et lamelles.
- Eau de robinet.
- Compresses stériles.
- Solution Giemsa.
- Eau neutre.
- Tube gradué.



**Méthodes :**

- La première étape est le prélèvement lésionnel, qui s'effectue à partir de raclage de la zone sèche de la lésion avec une lame bistouri stérile (**figure 26.A**), puis l'échantillon est déposé sur une lamelle (**figure 26.B**).
- La deuxième étape c'est la coloration MGG, le frottis est recouvert avec la solution de May-Grunwald (**figure 26.C**), avec une durée de réaction d'environ 03 minutes (**figure 26.D**). On ajoute autant de gouttes d'eau neutre que de gouttes du colorant (**figure 26.E**), après 02 minutes, l'excès de May-Grunwald sont éliminer sans lavage et addition enfin de Giemsa dilué à 1/10 à l'aide d'un tube gradué (**figure 26.F**), observation d'un temps de pause de 20 minute avant un rinçage avec simplement de l'eau du robinet avant de laisser sécher la lame (**figure 26.G**). L'échantillon est prêt pour l'observation microscopique à l'objectif à immersion (**x100**) (**figure 26.H**).



**Figure 26 :** Etapes de l'examen direct.

**III.2 Mise en culture des Leishmanies à partir des prélèvements****Matériel :**

- La présence de cas d'une lésion cutanée (LC).
- Lame bistouri stérile.
- Seringue stérile.
- Bec bunsen (zone stérile).
- Incubateur.
- Compresses stériles.
- L'eau physiologique.
- Milieux de cultures (NNN/Bâchi et Harrat).
- Microscope.

**Méthodes :**

Un raclage est effectué de la même manière que pour l'examen direct, le saignement observé est rincé avec d'eau physiologique à l'aide d'une seringue par injection/aspiration à plusieurs reprises mais sans faire pénétrer l'aiguille dans la lésion (**figure 27 de A à D**), l'eau additionnée de sang est ainsi prélevée. Dans la zone stérile d'un bec Bunsen, on récupère notre prélèvement qui est inoculé dans nos milieux de cultures (**figure 27 E**) et mis à incubé à 26°C (**figure 27 F**) sans serrer le bouchon du tube à vis.



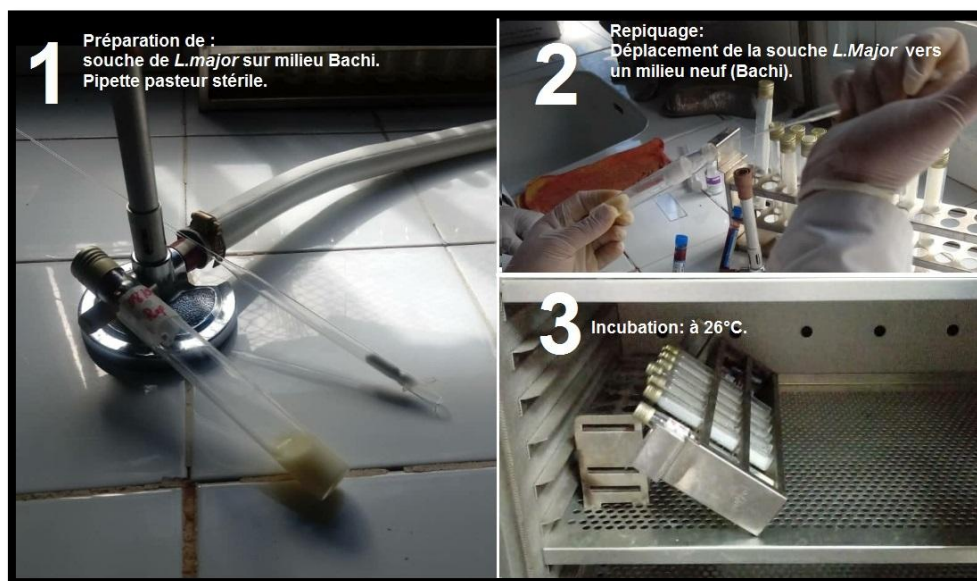
**Figure 27 :** Etapes du prélèvement et de la mise en culture du parasite.

#### IV. Tests in vitro

Ces tests sont réalisés par l'addition d'extraits aqueux de *P.harmala* quotidiennement aux cultures de forme promastigotes (**milieu Bâchi 2001**) de Leishmanies obtenues de l'institut Pasteur d'Alger, avec des concentrations de 1% ; 3% et 5%, le résultat de ces tests est comparé à une culture témoin, le traitement des données est traité statistiquement par le test « t » de Student afin d'évaluer le degré de significativité. Dans le laboratoire d'hygiène-Saida sous la direction du Parasitologue Dr El-Ahmar au niveau de l'unité de lutte anti Leishmaniose.

##### IV.1. La confirmation de la souche

Nous avons confirmé la présence de la forme promastigote du parasite dans la culture obtenue de l'IPA, la souche LIPA 32/06 : souche de référence de *Leishmania major*. L'examen direct s'effectue sous microscope optique (objectif x40), en premier sans coloration afin d'apprécier la mobilité du parasite puis par coloration au Giemsa et observation à l'objectif à immersion (x100). Après confirmation de la présence des promastigotes nous avons procédé à leur repiquage sur de nouveaux milieux de culture et à leur mise à l'étuve à 26° pendant 7 jours (**figure 28**).



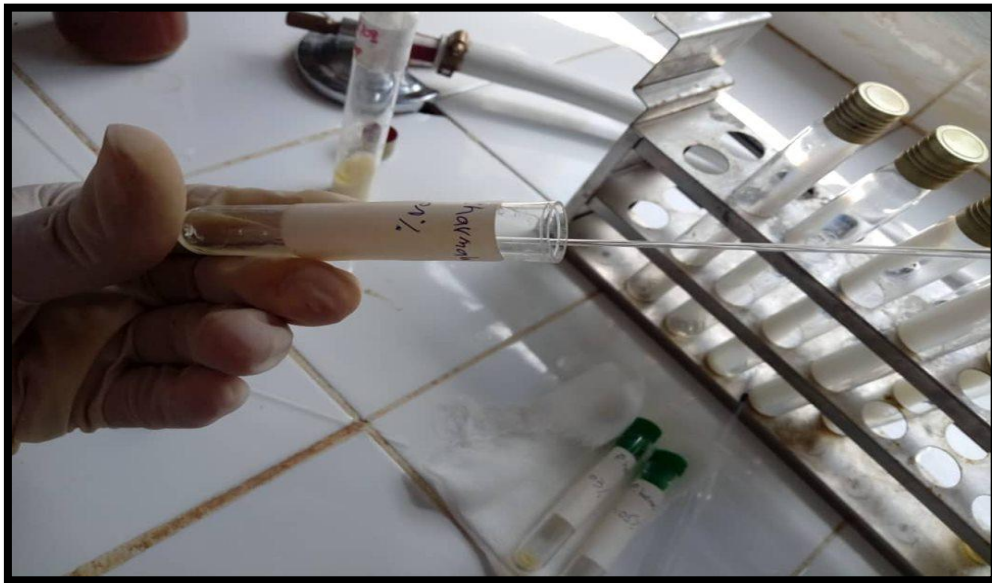
**Figure 28** : Etapes du repiquage.

**IV.2. Evaluation de l'activité anti-leishmanienne de *Peganum harmala***

Après dilution de la culture mère des promastigotes avec de l'eau physiologique, on les observe au microscope optique (**objectif X 10**) afin de procéder à une énumération initiale avant l'ajout de l'extrait aqueux de *P.harmala*, cette étape s'effectue à l'aide d'une cellule de Neubauer (**Annexe I**).[43][44]

Le test de l'activité leishmanicide de l'extrait aqueux de *P.harmala* se fait par :

- Ajout de 100 microlitres de l'Extrait aqueux à 1%, 3% et 5% dans trois tubes sec contenant la souche parasitaire de *L.major* (**figure 29**).
- Incubation pendant 24 heures à 4°C.
- Lecture sous microscope en présence du Bleu de méthylène (indicateur de la viabilité cellulaire): objectif X10 pour le visionnage du quadrillage, et objectif X40 pour le visionnage des cellules promastigotes.



**Figure 29** : Le mélange de la souche parasitaire avec l'extrait de *p.harmala*.

RVUE EXPERIMENTALE

## *Chapitre IV*

# **RÉSULTATS & INTERPRÉTATION**

## I. Préparation de la plante ; *Peganum harmala*

### I.1 Rendement de l'extrait aqueux

Nous avons procédé à l'extraction des solutions aqueuses à partir de *Peganum harmala* par trois méthodes différentes : la macération, la décoction et la méthode de soxhlet. Afin de comparer les rendements de chacune d'entre elles, nous avons à cet égard standardisé les quantités : 12.5g de *P. harmala* + 250 ml d'eau distillée. On a calculé le rendement ( $R^{\%}$ ) après l'évaporation de l'extrait résultant de chaque méthode utilisée par l'équation suivante :

$$R^{\%} = \frac{mf}{mi} \times 100$$

**Soit :**

$R^{\%}$  : Le rendement.

$mi$  : La masse initiale de matière végétale.

$mf$  : La masse finale (l'extrait en poudre après le séchage).

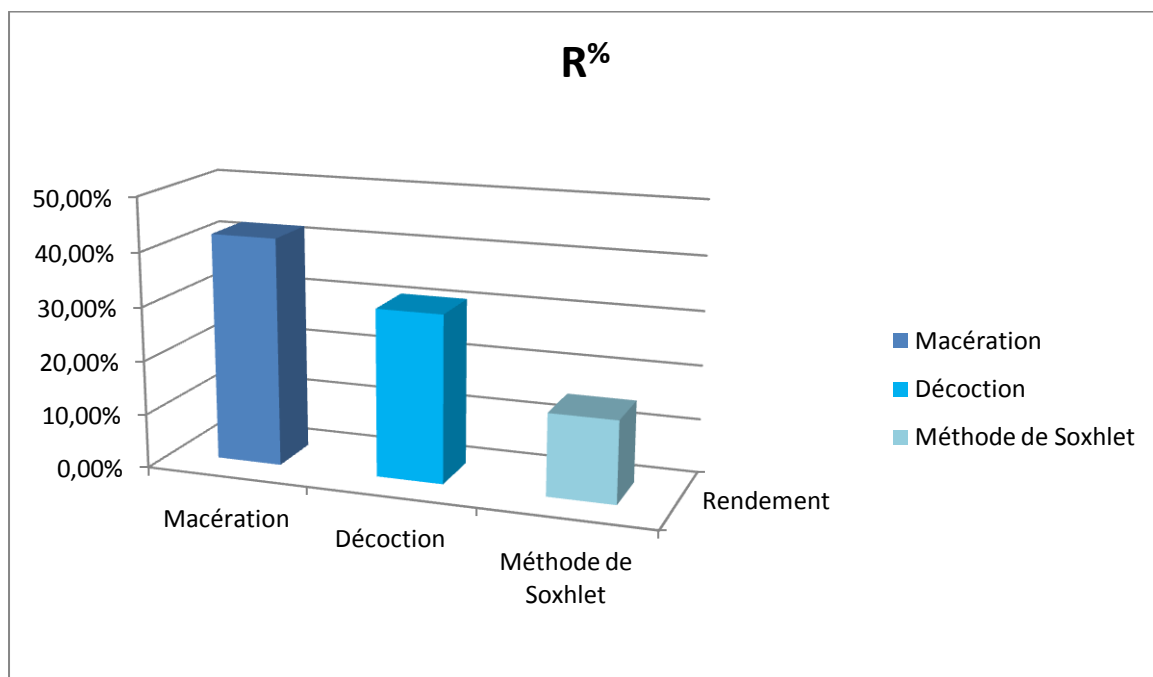
Méthode de l'extraction	Mi (g)	Mf (g)	Rendement %
Macération	12.5	5.3	42.2
Méthode de Soxhlet	12.5	1.9	15.5
Décoction	12.5	3.88	31

**Tableau 01 : Résultats du rendement de l'extrait aqueux de *Peganum harmala* .**

Parmi les trois méthodes d'extraction, le meilleur rendement est obtenu par macération ( $R^{\%} = 42.2 \%$ ) par rapport les deux autres méthodes ( **décoction et méthode de soxhlet**), la pluparts des manipulateurs préfèrent cette méthode , c'est généralement une extraction à froid et par conséquent elle limite la libération et la perte de substances chimiques volatiles dans l'air . Elle permet aussi d'éviter

l'altération de substances organiques fragiles qui peuvent à température plus élevée réagir et se dégrader, elle nécessite également moins de dispositif spécial de chauffage, il s'agit là d'une méthode simple et peu coûteuse.[45][46]. Cependant, il existe souvent un risque de contamination et de prolifération bactérienne par rapport aux autres méthodes, et ceci à cause de sa durée relativement longue nécessitant souvent plusieurs heures, de plus, la solubilité est moins bonne dans le solvant à froid.

La décoction est une très ancienne méthode, mais qui arrive cependant juste derrière la macération en terme de rendement, ( $R^{\%} = 31\%$ ), le rendement le plus faible a été obtenu par la méthode de Soxhlet qu'il a un rendement faible ( $R^{\%} = 15.2\%$ ) (**graphique 1**), mais cette méthode moderne et facile est plus rapide et prend beaucoup moins de temps que les deux précédentes. [46]



**Figure 30 :** Graphique du rendement obtenu pour chaque méthode d'extraction

## I.2 Extraction de l'huile essentielle

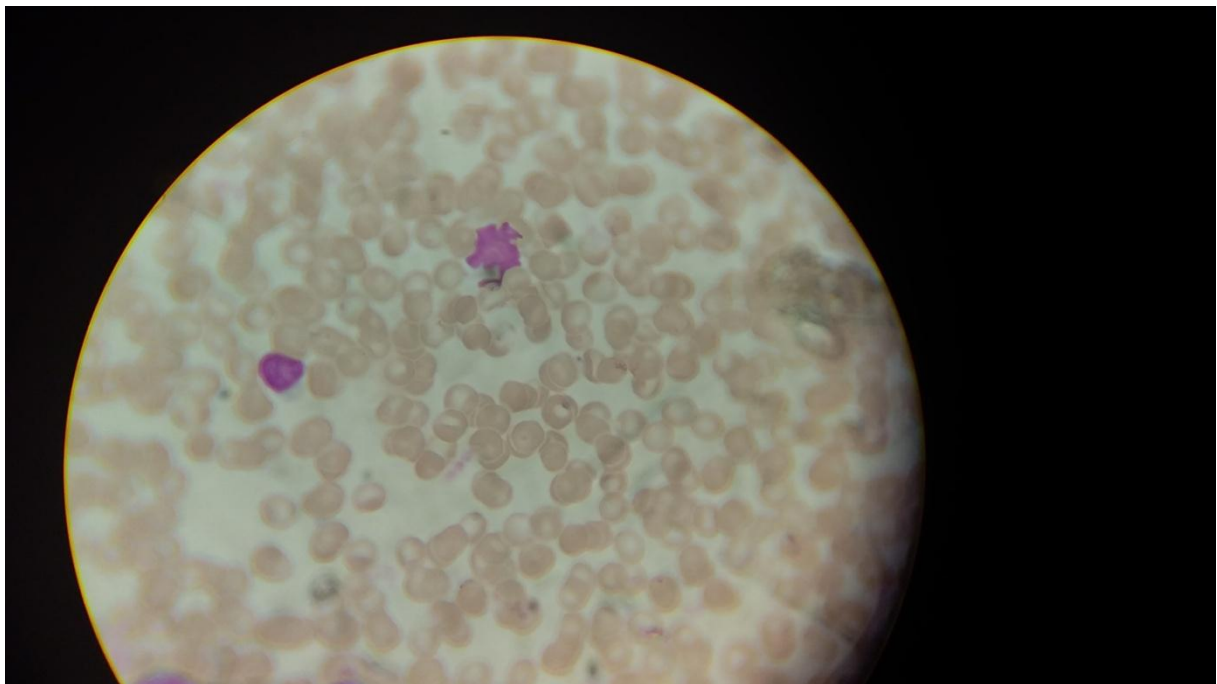
L'hydro-distillation ne nous a pas permis d'obtenir d'huile essentielle malgré la répétition de cette méthode durant six fois consécutives. Il s'agit d'une méthode classique, qui nécessite généralement de l'éthanol [47]. Dans ce travail nous avons



éviter autant que possible l'utilisation de substances potentiellement leishmanicides afin de pas biaiser nos résultats d'essais de cet effet de l'extrait de *P.harmala*.

### III. Prélèvement et mise en culture des Leishmanies

Après la fixation et coloration MGG la lecture se fait sous microscope optique (**objectif x100**) avec quelques gouttes de l'huile d'immersion. Les résultats de l'examen direct des frottis prélevés sur nos deux patients se sont révélés être négatifs et ne nous avons pas observé de forme amastigote (**figure 31**) nous allons toujours préparer trois lames pour chaque patient pour plus de certitude.

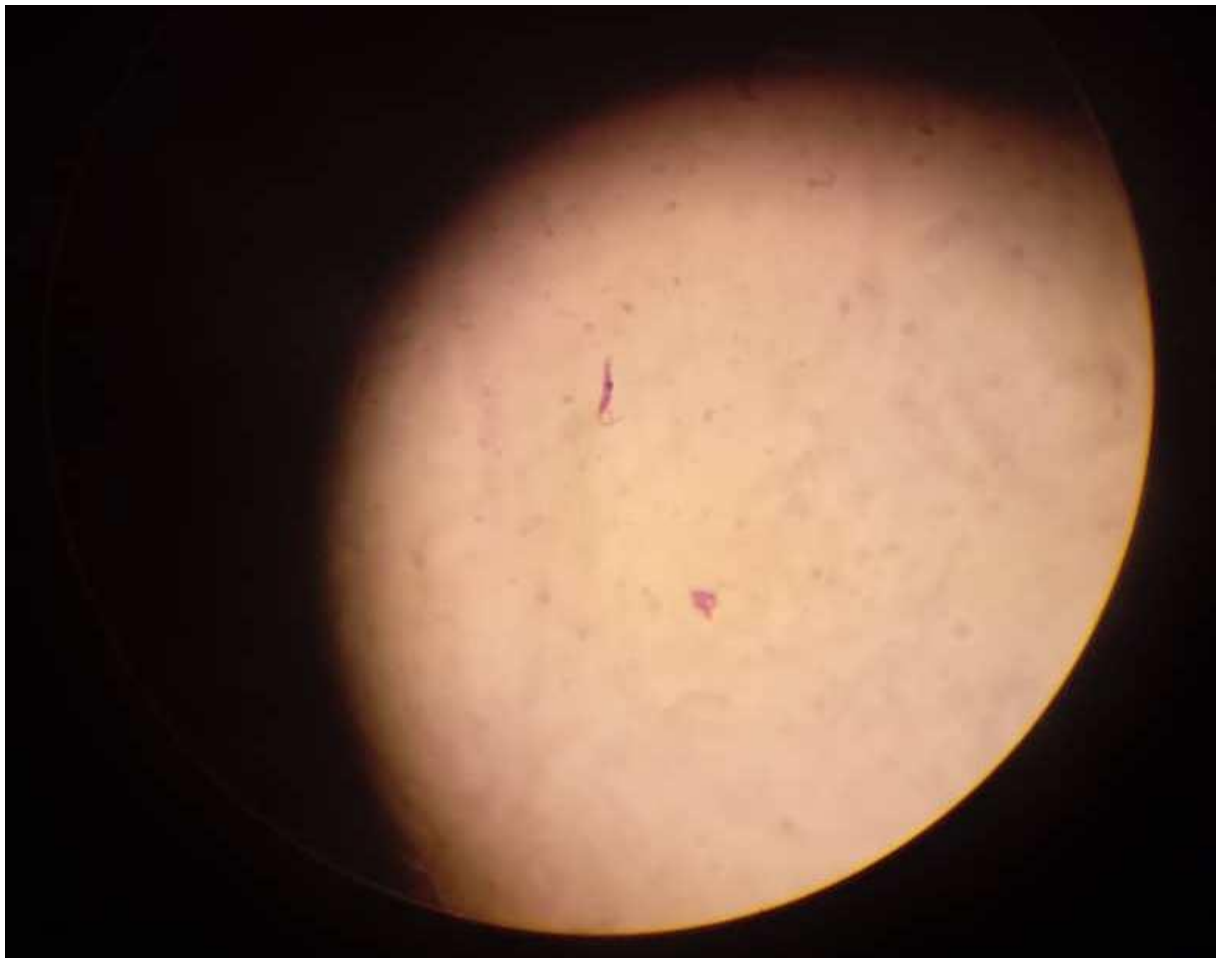


**Figure 31** : Résultats négatif du teste direct

Les cultures des prélèvements lésionnelles dans les milieux NNN et Bâchi, ne nous ont malheureusement pas permis d'observer la forme promastigote normalement présente à ce stade et ce malgré des repiquages hebdomadaires sur de nouveaux milieux et examens directs (figure). Nous expliquons ces résultats par le fait que nos patients aient déjà été mis sous traitement (antiparasitaire et anti-inflammatoires) ou bien que les lésions soient causées par d'autres microorganismes.

#### IV. Tests in vitro

Le fait de n'être pas arrivé à obtenir la forme promastigote du parasite afin de réaliser nos essais in vitro nous avons eu recours à l'Institut Pasteur d'Alger afin d'obtenir une souche de *L.major*, il s'agit de la souche LIPA 32/06 : souche de référence de *leishmania major* obtenue à partir du service éco épidémiologie parasitaire. Nous avons confirmé la présence de promastigotes vivants par un examen direct avec et sans coloration au MGG (le MGG ne permet pas d'apprécier la mobilité des parasites) (**figure 32**).

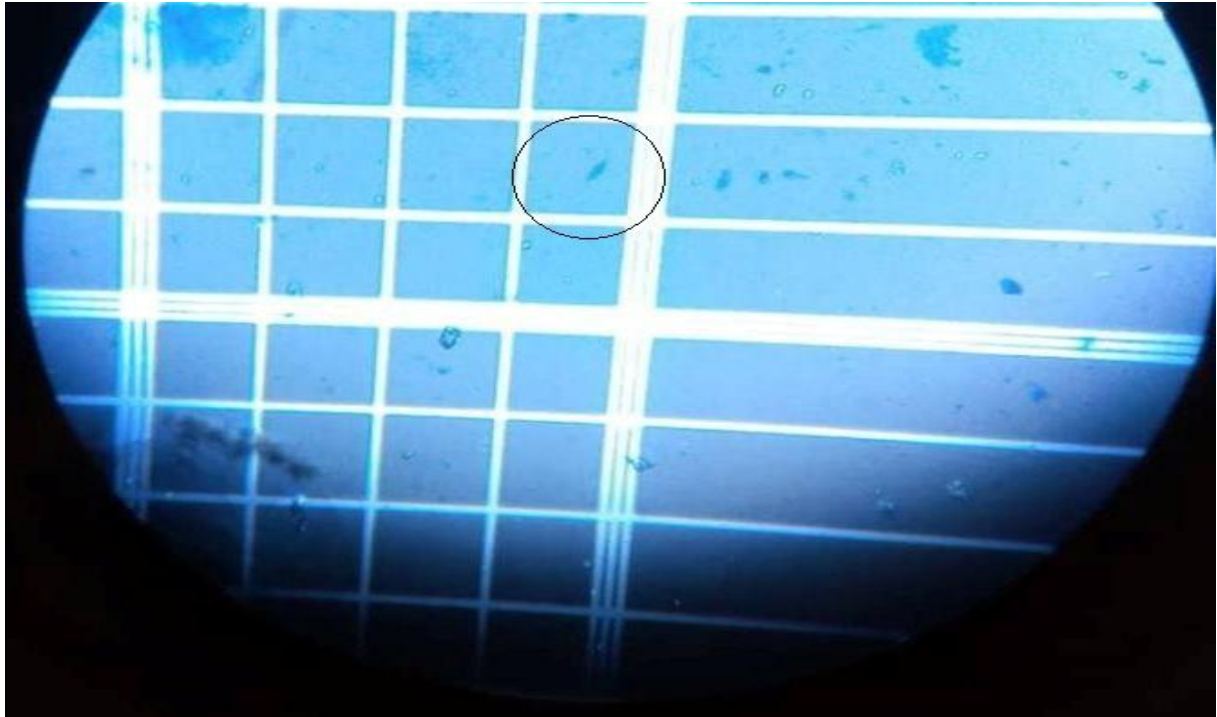


**Figure 32** : La forme promastigote sous le microscope optique (X100).

##### IV.2.1. Résultats des tests de l'activité anti-leishmanienne de *Peganum harmala*

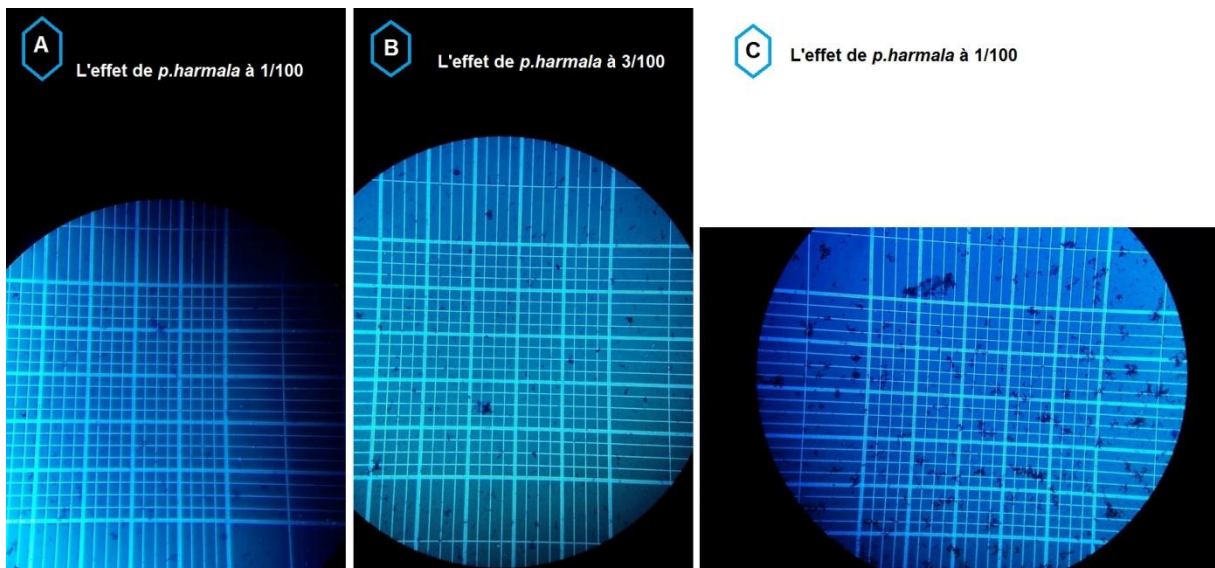
Etant donné que les repiquages aient été négatifs après 7 jours d'incubation, nous avons réalisé nos tests sur la souche de référence (LIPA 36/06) :

En absence de l'extrait aqueux on a compté 3 cellules promastigotes sous l'hématimètre Neubauer dans le quadrillage (**figure 33**).



**Figure 33** : Exemple d'une cellule promastigote comptée(X40).

par l'ajout de l'extrait aqueux de *P.harmala* avec les concentrations (1%, 3% et 5%) et l'incubation du 24 heures on obtient 00 promastigotes présents dans la culture (figure 34 :A B et C) .



**Figure 34** : Résultats de l'effet de l'extrait aqueux (*P.harmala*).

Le tableau suivant résume les résultats in vitro (Tableau 02)(Figure 35).

	Nombre de cellules comptées	Volume de comptage promastigote/microlitre
Sans extrait	03	25
EA a 1 %	00	-
EA a 2%	00	-
EA a 3%	00	-

Tableau 02 : l'effet antileishmanienne de l'EA de *P.harmala*.

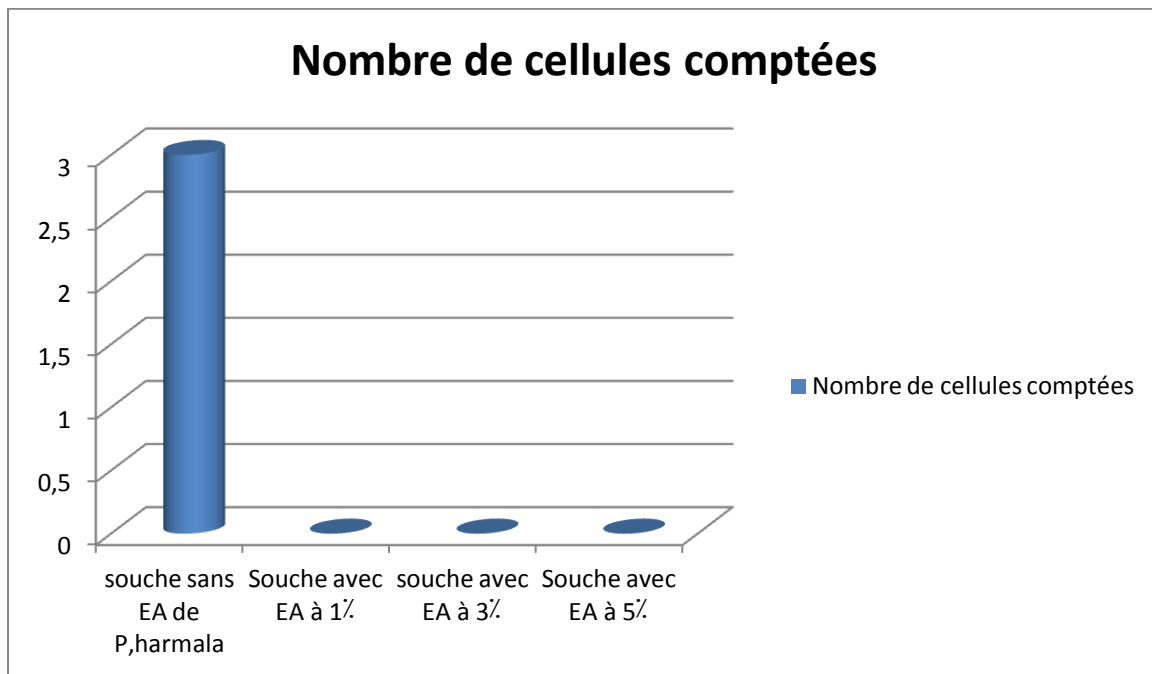


Figure 35 : graphique représente l'effet leishmanicide de l'EA de *P.harmala*.

Ces résultats ne confirment pas l'activité leishmanicide de l'extrait aqueux de *P.harmala*, la courte durée des tests, la négativité des repiquage ainsi que le nombre limité des échantillons sont assez de facteurs limitant le fait de ne pas pouvoir tirer de conclusion même si la littérature indique que l'activité antileishmanienne de *P.haramala*, a été testée avec succès en Iran [47].

# **CONCLUSION**

Un grand problème de santé publique est représentée par la maladie de leishmaniose généralement et LC spécialement, grâce à des conséquences sociales et économiques . Il est classé selon l'OMS parmi les maladies parasitaires majeures dans le monde. Les traitements disponibles aujourd'hui dans notre pays est requièrent grâce a leurs applications clinique lourd et le cout. La nécessité de trouver des nouvelles solutions face aux leishmanies laisse l'occasion à la médecine traditionnelle qui reste une priorité de santé publique pour les pays du tiers monde où sévit cette endémie.

Ce travail, se proposait de participer à la mettre l'accent sur une alternative thérapeutique de Leishmaniose en Algérie, par l'utilisation de la technique d'extraction.

En effet, par cette étude , nous nous proposons de mettre en évidence l'activité antileishmanienne de la plante médicinale de la famille *Zygophellaceae* , genre de *péganum harmala* ( *harmel*) .

Les résultats obtenus dans l'analyse de l'activité antileishmanienne a relevé que les extraits de l'harmel ont montré leur effet leishmanicide vis-à-vis de la souche *L.major* tandis que n'exerce pas un effet antileishmanienne dans les différentes concentrations 1% , 2% et 3% pendant la période du testes.

# **ANNEXES**

## I-Principe

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération).

## II-Technique de numération cellulaire

### II .1. Dilution préalable

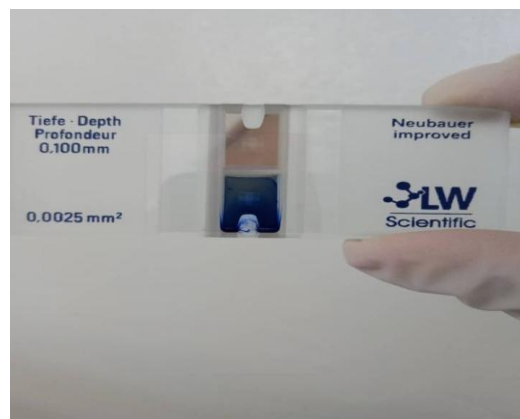
Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, lorsque la suspension est trop concentrée (grand nombre de cellules par unité de volume), il est difficile de compter les cellules.

### II .2. Utilisation de la cellule de numération

#### Présentation des cellules de numération

Il existe trois grands types principaux de cellules de numération :

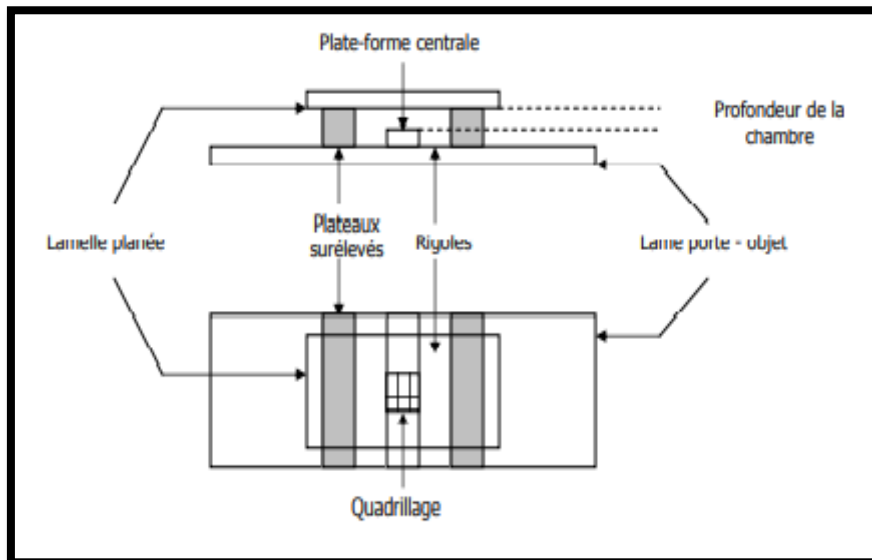
- Cellule de Thoma.
- Cellule de Malassez (la plus courante).
- Cellule de Neubauer(**figure 36**).



**Figure 36** : Cellule de Neubauer.



Une cellule de numération (**figure 37**) est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage :



**Figure37** : Description d'une cellule de numération.

Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame.
- la profondeur de la chambre.

#### Remplissage de la cellule de numération

-Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

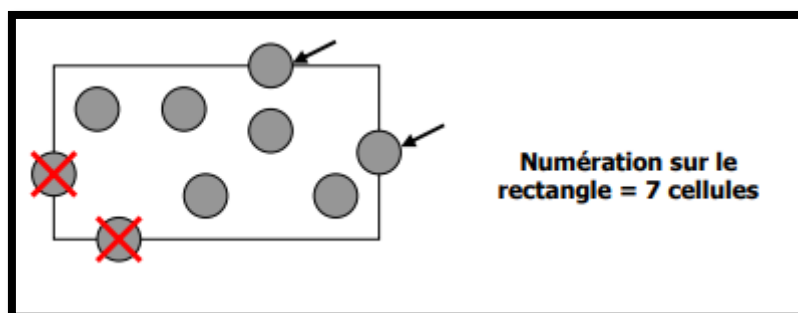
- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

- Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération
- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

### II .3. Numération

- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



**Figure 38** : Numération cellulaire sur un quadrillage.

La formule d'évaluation (générale) :

$$\text{Particules par } \mu\text{l volume} = \frac{\text{particules dénombrées}}{\text{surface dénombrée (mm}^2) \cdot \text{prof. de champ (mm)} \cdot \text{dilution}}$$

## ANNEXES

**ANNEXE I :**  
*La numération cellulaire*

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] :Mallorie H – 2004 : Variabilité pathologique du complexe Leishmania donovi agent de la leishmaniose viscérale - thèse du doctorat - université de monpelierII
- [2] : Ala A – 2004 : Manuel de la prise en charge de la Leishmaniose cutanée dans région de la méditerranée orientale – Bureau régional de l’OMS – Egypte .
- [3] : Merzougui A ; Berbadj M ; Inouri S et Bacha D - 2013: Prise en char de la LC en Algérie - La journée professionnelle - service des maladies infectieuses et tropicales-Hôpital militaire universitaire-Constantine.
- [4] : عبد الباسط محمد سيد ا. عبد التواب عبد الله ح- 2004 : الموسوعة الام للعلاج بالاعشاب و النباتات الطبية – دار القارئ للنشر و التوزيع – ص 453 .
- [5] : Black C – 2014 : Photos pour la Journée mondiale de la santé – Organisation Mondial de la Santé – vu le 12/02/2019.
- [6] : Jean Ierre D : Traitement de leishmaniose cutanéomuqueuse(LCM) - laboratoire de parasitologie – vu le 12/02/2019.
- [7] : World Health Organization (WHO) – 2017 : Weekly epidemiological record - N :38,2017,557-572 – Genève.
- [8] : Paul A – 2005:Phlébotomus - Lancaster University – Lancaster.
- [9] : Tariki R ; Yamani R ; et Bachir M – 2011 : Cycle biologique des Parasites - Office des publications universitaires - Editions :3.04.5235.
- [10] : Belkaid M ; Tabet Derraz O ; Zenaïdi N et hamrioui B – 1994 : Cours de parasitologie Protozooses - Office nationale des publications universitaires – Alger.
- [11] : Jérôme D et Nicol L – 1999 : Les Phlébotomes(Diptera ;psychodidae ;Phlébotominae) N :31,2016,237-259.
- [12] : Spinger V – 2011 : Spread of Leishmania major to the north of Alegria - Société de pathologie exotique – N :19,2014,167-172 - France.

- [13] : Yamani R et Tariki R – 2011 : Parasitoses des animaux domestiques - nationale des publications universitaires - Edition :3.04.4722-Ecole nationale vétérinaire :178-179.
- [14] : Nicol D : Phlébotomes et Leishmaniose à la Martinique - Laboratoire de parasitologie(service de démostication-lutte antiverctorielle, ARS-conseils générales Martinique) - CHU de fort de France/Manuel ETIENNE.
- [15] : الحشرات العامة / المنسق:الدكتور نعيم شرف / تأليف:د.نعيم شرف – د.توفيق مصطفى – د.ثابت علاوي / 1993/صفحة 351-352/د.مازن مكاوي / زهران للنشر و التوزيع-عمان-الاردن./ قسم وقاية النباتات
- [16] : علم الطفيليات العام/ الاوليات الحيوانية و الديدان / شكيب ارسلان باقي / ديوان المطبوعات الجامعية/ صفحة : 25-30.
- [17] : <http://www.escap.fr/maladies-vectorielles/Leishmaniose.html> - vu le 03/04/2019.
- [18] : Lydyard P ;Whelan et A Fanger M - 2009 : L'Essentiel en Immunologie - BERTI Editions - section O-Immunité anti-infectieuse - p 218.
- [19] : WHO – 1990 : controle of leishmaniasis - technical report - series N°793-Geneva.
- [20] : Dolmatova A et Lermine N – 1971 : les phlébotomes(phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent - office de la recherche scientifique et technique-outre-mer-initiation-documentation technique N°18-168.
- [21] : Touria H - 2012 : Profil épidémiologique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'ouest Algérien - université d'Oran- Mémoire Magister - option parasitologie : 68-76 .
- [22] : Desjeux P ; Piot B et Neil K – 2018 : Co-infections a Leishmania/VIH dans le sud d'Europe - Médecine tropicale, 2001 ;64 :187-193.
- [23] : Organisation mondiale de la santé – 2018 : Les principaux repères de la Leishmaniose - Un manuel manuscrit : 13-21.
- [24] : Johnson J.J -2011: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. Cancer Letters 305: p1–7. p474.

[25] : El Bekkali A – 2016 : Les techniques de coloration en hématologie thèse du doctorat en pharmacie-université Mohammed.V-Rabat-Maroc-2016 :10.

[26] : Chouih F ; Amri N ; Bouslimi E ;Siala K ; Selmi.Zallaga R ; Ben Abdallah A et Bouratbine K – 2001 : Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses Laboratoire de parasitologie clinique - institut Pasteur, Tunis, Tunisie : 09-15.

[27] : Rosenthal E ; Gangneux JP ;buffet P ;Liglitburn E ; Couppié P ; Marty P et Dedet J.P- 2013 : Le traitement de leishmaniose en France :proposition d'un référentiel consensuel - Nice.marseille-Montpetlier.

[28] : Barée D – 2014 : Atlas illustré des plantes médicinales et curativess - Office nationale des publications universitaires : 19.

[29] : Kam T.S., Sim K.M., Koyano T., Toyoshima M., Hayashi M., Komyiama K. (1998) Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *Journal of natural product* 61:1332–1336.

[30] : Amine.S – 2015 : Qu'est ce que la Harmel ? - La mielle . vu le 12/03/2019.

[31] : Wotfgong H – 2017: 250 plantes médicinales- les indispensables delachaux : N :38,2017,127-132

[32] : : [https://lamiellee.dz/Miel\\_Alg%C3%A9rie\\_quest-ce-que-le-harmel/\\_La\\_Miell\\_%C3%A9e.vu](https://lamiellee.dz/Miel_Alg%C3%A9rie_quest-ce-que-le-harmel/_La_Miell_%C3%A9e.vu) le 12/03/2019.

[33] : [https://Peganum\\_harmala#/media/File:Peganum\\_harmala\\_MHNT.OT.2015.34.29.j.vu](https://Peganum_harmala#/media/File:Peganum_harmala_MHNT.OT.2015.34.29.j.vu) le 12/03/2019.

[34] : Faramazi M – 2018: Determination of harmine and harmaline in *p.harmala* seeds by hight-performance liquid chromatography - *journal of applied sciences*8(9) 1761-1765 - faculté of pharmacy-Iran.

[35] : Bakiri N ; Kelif L.S et Slaoui M - 2016 : *Peganum harmala* L - *Rexue agriculture n ; spécial* 1(2016)38-42.

[36] : Tahrouch S; Rapior S; Mondolot-Cosson L;Idrissi-Hassani L; Bessière J et Andary C – 2002: : *PEGANUM HARMALA : SOURCE COMBINEE D'AROMES ET DE*

COLORANTS - Vol.2, No 2, December 2002. pp. 33-37 -Reviews in Biology and Biotechnology By The Moroccan Society of Biology in Canada.

[37] : Lehout R et Laib M – 2015 : Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : Artemisia herba alba Asso - Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master-Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire - Université des Frères Mentouri Constantine – page 9 .

[38] : Penchev p – 2010 : Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions – thèse en vue de l'obtention du doctorat - Institut National Polytechnique de Toulouse – page 50.

[39] : Benouali D – 2015 : Extraction et identification des huiles essentielles – faculté de chimie oran – page 7.

[40] : Chouih E , Amri F , Bouslimi N, Siala E , Selmi K , Zallagua N , Ben Abdallah R , Bouratbine A et Aoun K – 2009 : Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis - Pathologie Biologie  
Volume 57(3) - pages 219-224.

[41] : Tremblay J – 2015 : Prélèvement sanguin chez le lapin - Direction des services vétérinaires – page 7.

[42] : Bekkali A – 2016 : Les techniques de coloration en hématologie – thèse du doctorat en pharmacie Rabat – page 49.

[43] : <http://www.bioltrop.fr/spip.php?article361> vue le 06/05/2019.

[44] : [http://www.cscq.ch/SiteCSCQ/FichierPDF\\_FR/FT-Neubauer.pdf](http://www.cscq.ch/SiteCSCQ/FichierPDF_FR/FT-Neubauer.pdf) vue le 06/05/2019.

[45] : <http://webphysique.fr/maceration/>- La macération-publié le 11/06/2017- vu le 12/04/2019.

[46] : <http://www.maxicours.com/se/fiche/3/1/182131.html> -Les différentes techniques de l'extraction- vu le 14/04/2019.

[47] : Parvaneh R-M, Soltan A-E, Hourmazd O., Monavvar S, Maryam K, Giti H-H, Mohammad H-AI, Massoud M., Massoumeh S-In vitro and in vivo activities of Peganum harmala extract against Leishmania major-J Res Med Sci / August 2011; Vol 16, No 8-p1033.



