

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
الوزارة الوطنية للتعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche scientifique



الجامعة الوطنية لمحمد بوقارا  
a O??? G?????????  
Université M'HAMED BOUGARA *Boumerdes*  
Faculté Des Sciences  
Département de Biologie

## Mémoire de magister

Pour l'obtention du titre de Magister en Biologie  
Option Biochimie et Microbiologie appliquées

Présenté et soutenu publiquement par : M<sup>elle</sup> MAAMRI Sarah

Le : 15/06/2008

Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien :  
dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens

### *Devant le jury:*

Mme FAZOUANE F.

Mr CHIBANE M.

Mme BACHI F.

Mr YOUSFI M.

Melle HALOUANE F.

Mme KEBBOUCHE-GANA S.

Maître de conférences (UMBB)

Professeur (UAMB)

Professeur (IPA)

Maître de conférences (UATL)

Maître de conférences (UMBB)

Chargée de Cours (UMBB)

Président

Rapporteur

Co-rapporteur

Examineur

Examinatrice

Examinatrice

*Boumerdes 2008*



## Abstract

---

The knowledge of traditional healers often represents a basis for the pharmacological and phytochemical investigation of natural medicaments.

This work has focused first on the comparative study of *Pistacia atlantica* in two regions south - Algeria (Laghouat and Ain Oussera), through their content of phenolic compounds existing in the leaves and fruit and the content of their fruits fat on the one hand. Thus on the evaluation of the antioxidant activity and antileishmanian activity in vitro the other.

The results reflect a quantitative and qualitative variability in metabolism of phenolic compounds and lipid in leaves and fruit, between *Pistacia atlantica* of the two regions and for the same region. So polyphenols and lipids are specific individual characteristics for each *Pistacia atlantica* studying what suggests that these are good molecular markers for the biogenetic study of *Pistacia atlantica*.

The antioxidant activity test shows that these phenolic and lipidic extracts have good antioxidant compared with antioxidants used as a reference. In addition, it still reflects the variability of antioxidant metabolism whose *Pistacia atlantica* of Ain Oussera are most rich in antioxidants (polyphenols, flavonoids, sterols, tocopherols).

One of the most important results is that the phenolic and lipidic extracts discover antileishmanian activities at different concentrations against the forms promastigotes of two species responsible for leishmaniasis identified in Algeria and the former World (*L. Infantum* : visceral leishmaniasis and *L. major*: cutaneous leishmaniasis).

**Key words:** *Pistacia atlantica*, polyphenols, flavonoides, lipids, stérols, tocophérols antioxidant activity, antileishmanian activity in vitro, promastigot, *L. Infantum*, *L. major*.

# Sommaire

Introduction .....	01
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	
Chapitre I : Etude des plantes médicinales	
I	Etude des plantes médicinales..... 03
I.1	Intérêt de l'étude des plantes médicinales..... 03
I.2	Notions sur la plante investiguée ..... 04
I.2.1	Caractéristiques botaniques du <i>pistacia atlantica Desf</i> ..... 05
I.2.2	Propriétés de l'arbre ..... 05
I.2.3	Utilisations de l'arbre..... 06
I.2.4	Travaux antérieurs sur <i>Pistacia atlantica Desf</i> ..... 06
Chapitre II : Généralités sur les composés phénoliques	
II.1	Les différentes classes de composés phénoliques..... 08
II.1	Les flavonoïdes ..... 08
II.1.1	Structure chimique et classification ..... 08
II.1.2	Distribution et localisation ..... 09
II.1.3	Propriétés des flavonoïdes..... 10
II.1.3.1	Les flavonoïdes comme antioxydants ..... 11
II.1.3.2	Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes..... 11
II.2	Les Tanins ..... 13
II.2.1	Structure chimique..... 13
II.2.2	Activité biologique des tanins ..... 14
Chapitre III : Généralités sur les lipides	
III	Généralités sur les lipides..... 16
III.1	Définition ..... 16
III.2	Classification des lipides ..... 16
III.2.1	Les acides gras..... 17
III.2.2	Lipides simples..... 18
III.2.2.1	Glycérides..... 18
III.2.2.2	Cérides ..... 19
III.2.2.3	Stérides..... 19
III.2.3	Lipides complexes..... 19
III.2.4	Lipides polyisopréniques ..... 19
III.2.4.1	Les stérols..... 20

III.2.4.1.1	Structure chimique .....	20
III.2.4.1.2	Rôle biologique des phytostérols.....	20
III.2.4.2	Les tocophérols .....	21
III.2.4.2.1	Structure chimique .....	21
III.2.4.2.2	Rôle biologique de la vitamine E.....	22
<b>Chapitre IV : Oxydation et radicaux libres</b>		
IV	Oxydation et radicaux libres.....	23
IV.1	Les radicaux libres dans les systèmes biologiques.....	23
IV.2	Activité antioxydante.....	24
IV.2.1	Les antioxydants.....	25
IV.2.1.1	Les antioxydants synthétiques.....	25
IV.2.1.2	Les antioxydants naturels.....	25
IV.2.2	Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	26
<b>Chapitre V : Généralités sur les leishmanioses</b>		
V	Généralités sur les leishmanioses.....	28
V.1	Définition .....	28
V.2	Epidémiologie .....	28
V.2.1	Le parasite.....	28
V.2.1.1	Taxonomie.....	28
V.2.1.2	Morphologie .....	28
V.2.2	Vecteurs.....	29
V.2.3	Réservoirs.....	29
V.2.4	Cycle évolutif .....	30
V.2.5	Distribution géographique.....	33
V.2.6	Les Leishmanioses en Algérie .....	33
V.3	Manifestations cliniques.....	34
V.4	Diagnostic .....	35
V.5	Traitements .....	35
V.6	Vaccins.....	36
<b>Partie II : Partie expérimentale</b>		
<b>Chapitre I : Matériel et méthodes</b>		<b>37</b>
I.1	Matériel .....	37
I.1.1	Matériel et équipements .....	37
I.1.2	Matériel végétale .....	37
I.1.2.1	Lieu et climat des régions de la collecte des échantillons .....	38
I.1.2.2	Echantillonnage.....	38

I.1.3	Matériel Biologique.....	40
I.2	Méthodes .....	40
I.2	Extraction et quantification.....	42
I.2.1	Extraction.....	42
I.2.1.1	Méthode d'extraction des composés phénoliques .....	42
I.2.1.2	Méthode d'extraction des lipides .....	43
I.2.2	Analyse quantitative .....	44
I.2.2.1	Analyse quantitative des composés phénoliques .....	44
I.2.2.1.1	Dosage des phénols totaux.....	44
I.2.2.1.2	Dosage de flavonoïdes.....	44
I.2.2.2	Analyse quantitative des fractions minoritaires des lipides .....	45
I.2.2.2.1	Dosage des stérols totaux.....	45
I.2.2.2.2	Dosage des tocophérols totaux.....	45
I.3	Evaluation de pouvoir antioxydant des extraits de <i>Pistacia atlantica</i> .....	46
I.3.1	Application du test chimique (Test du DPPH•).....	46
I.3.1	Application du Test biologique (test d'hémolyse).....	48
I.4	Etude de l'activité antileishmanienne des extraits de <i>Pistacia atlantica</i> .....	49
I.4.1	Préparation des milieux de cultures .....	49
I.4.1.1	Milieu NNN.....	49
I.4.1.2	Milieu RPMI .....	49
I.4.2	Culture parasitaire .....	49
I.4.2.1	Culture sur milieu NNN.....	49
I.4.2.2	Evaluation de l'activité antileishmanienne in vitro (culture sur milieu RPMI)	50
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>		
II.1	Résultats de l'analyse quantitative.....	51
II.1.1	Analyse quantitative des Composés phénoliques .....	51
II.1.1.1	Taux des phénols totaux .....	51
II.1.1.2	Taux des flavonoïdes.....	52
II.1.2	Analyse quantitative des lipides.....	55
II.1.2.1	Teneur en lipides.....	55
II.1.2.2	Analyse Quantitative des fractions minoritaires des lipides .....	56
II.1.2.2.1	Taux des stérols totaux.....	56
II.1.2.2.2	Taux des tocophérols totaux.....	56
II.2	Résultats de l'étude du pouvoir antioxydant .....	57

II.3.1	Test chimique DPPH.....	57
II.3.2	Test biologique (test d'hémolyse).....	65
II.4	Résultats de l'étude d'activité antileishmanienne .....	69
II.4.1	Activité antileishmanienne des extraits phénoliques .....	70
II.4.1.1	Effets des extraits phénoliques sur <i>L .Infantum</i> .....	70
A/	Extraits phénoliques des feuilles.....	70
B/	Extraits phénoliques des fruits.....	73
II.4.1.2	Effets des extraits phénoliques sur <i>L .major</i> .....	77
A/	Extraits phénoliques des feuilles.....	77
B/	Extraits phénoliques des fruits.....	80
II.4.2	Activité antileishmanienne des extraits lipidiques .....	84
II.4.2.1	Effets des extraits lipidiques sur <i>L .Infantum</i> .....	84
II.4.2.2	Effets des extraits lipidiques sur <i>L .major</i> .....	87
	Conclusion .....	95
	Référence bibliographique .....	97
	Annexe.....	109

## Liste des figures

Figure n°01 :	La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).....	09
Figure n°02 :	Piégeage des radicaux libres (R•) par les flavonoïdes (Van Acker et al., 1996).....	11
Figure n°03 :	Exemples de Tannoïdes.....	13
Figure n°04 :	Structure des tannins condensés .....	14
Figure n°05 :	Classification des lipides (El Atyqy. 2007).....	17
Figure n°06 :	Acide gras (El Atyqy. 2007).....	17
Figure n°07 :	Les glycérides.....	18
Figure n°08 :	structure de base des Stéroïls (Naudet. 1992) .....	20
Figure n°09 :	Structure des tocophérols .....	21
Figure n°10 :	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).....	24
Figure n°11 :	Cycle parasitaire des <i>Leishmanioses</i> .(Chappuis , 2006).....	31
Figure n°12 :	Répartition géographique de <i>L.infantum</i> et de <i>L.major</i> en Algérie et localisation des différent zymodèmes (Bachi, 2006).....	34
Figure n°13 :	Arbre du Pistachier d'Atlas.....	37
Figure n°14 :	Feuilles du Pistachier de l'Atlas.....	38
Figure n°15 :	Fruits du Pistachier de l'Atlas.....	38
Figure n°16 :	Diagramme représentant des étapes de notre étude sur <i>Pistacia atlantica</i> .....	41
Figure n°17 :	Système d'extraction au Soxhlet.....	43
Figure n°18 :	Courbes représentant la variation de la de densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH.....	47
Figure n°19 :	Réduction du radical libre DPPH. (Molyneux., 2004).....	47
Figure n°20 :	Variation de la densité optique du milieu réactionnel en fonction du temps (Test d'hémolyse)...	48
Figure n°21 :	Comparaison de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des feuilles de l'ensemble étudié de <i>Pistacia atlantica</i> .....	53
Figure n°22 :	Comparaison de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des fruits de l'ensemble étudié de <i>Pistacia atlantica</i> .....	53
Figure n°23 :	Comparaison du contenu en lipide, en stéroïls totaux et en tocophérols totaux des fruits de l'ensemble étudié de <i>Pistacia atlantica</i> .....	57
Figure n°24 :	Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles par le test du DPPH.....	58
Figure n°25 :	Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques des fruits par le test du PPH.....	58
Figure n°26 :	Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits lipidiques des fruits par le test du DPPH.....	59
Figure n°27 :	Courbes représentant l'activité antioxydante des antioxydants de référence par le test du DPPH.....	59
Figure n°28 :	Classement croissant des extraits phénoliques selon leurs EC <sub>50</sub> .....	60

Figure n°29 :	Classement croissant des extraits lipidiques selon leurs EC <sub>50</sub> .....	60
Figure n°30 :	Corrélation entre le pouvoir d'inhibition (EC <sub>50</sub> ) d'extraits de fruits et la teneur en flavonoïdes...	61
Figure n°31 :	Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes ( Marfak, 2003).....	64
Figure n°32 :	Corrélation entre le pouvoir d'inhibition (EC <sub>50</sub> ) des lipides et la teneur en stérols totaux (a) et en tocophérols totaux (b).....	64
Figure n°33 :	Variation des valeurs de EC <sub>50</sub> en fonction du pourcentage d'inhibition du test d'hémolyse.....	67
Figure n°34 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	70
Figure n°35 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	70
Figure n°36 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture.....	71
Figure n°37 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> M <sub>2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	72
Figure n°38 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> M <sub>2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	72
Figure n°39 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	73
Figure n°40 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	74
Figure n°41 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	75
Figure n°42 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	75
Figure n°43 :	Numération <i>de L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	76

Figure n°44 :	Numération de <i>L.infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	76
Figure n°45 :	Numération de <i>L.major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	77
Figure n°46 :	Numération de <i>L.major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	78
Figure n°47 :	Numération de <i>L.major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture.....	79
Figure n°48 :	Numération de <i>L.major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> M <sub>pf</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	79
Figure n°49 :	Numération de <i>L.Major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	80
Figure n°50 :	Numération de <i>L.Major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	80
Figure n°51 :	Numération de <i>L.Major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture(Concentration minimale effectrice).....	81
Figure n°52 :	Numération de <i>L.Major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-2pg</sub> en fonction de l'âge de la culture .....	82
Figure n°53:	Numération de <i>L.Major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	82
Figure n°54 :	Numération de <i>L. infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	83
Figure n°55 :	Numération de <i>L. infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	84
Figure n°56 :	Numération de <i>L. infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-IL</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	84

	effectrice).....	
Figure n°57 :	Numération de <i>L. infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	85
Figure n°58 :	Numération de <i>L. infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-2L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	85
Figure n°59 :	Numération de <i>L. infantum</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-2L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	86
Figure n°60 :	Numération de <i>L. major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	86
Figure n°61 :	Numération de <i>L. major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>2</sub> F <sub>2-1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	87
Figure n°62 :	Numération de <i>L. major</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> P <sub>21</sub> F <sub>2-2L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).....	88
Figure n°63 :	Numération de <i>L. major</i> en présence de 100µg des extraits lipidiques des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).....	88
Figure n°64 :	Morphologie des formes promastigote à des doses toxiques d'extraits comparativement au témoin (Lames colorées au Giemsa grossissement X 100) .....	89
Figure n°65 :	Morphologie des formes promastigote à des doses toxiques d'extraits comparativement au témoin (Lames colorées au Giemsa grossissement X 100).....	90
Figure n°66 :	Variation des valeurs de EC <sub>50</sub> des composés phénoliques en fonction des concentrations effectrices minimales sur <i>L. infantum</i> .....	92
Figure n°67 :	Variation des valeurs de EC <sub>50</sub> des composés phénoliques de feuilles en fonction des concentrations effectrices minimales sur <i>L. major</i> .....	93

## *Liste des tableaux*

Tableau I:	La distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes. (Richter, 1993).....	10
Tableau II:	Distribution géographique des différentes espèces de <i>Leishmania</i> .....	33
Tableau III:	Caractéristiques de distinction entre les échantillons de <i>Pistacia atlantica</i> Desf. étudiés .....	39
Tableau IV:	Les extraits testés sur les leishmanies.....	50
Tableau V:	Teneur en phénols totaux des différents échantillons.....	51
Tableau VI:	Teneur en flavonoïdes totaux de différents échantillons.....	51
Tableau VII:	La teneur des graines en huile .....	55
Tableau VIII :	Quantité des stérols totaux dans les huiles.....	56
Tableau IX.5:	Quantité des tocophérols totaux dans les huiles étudiées.....	56
Tableau X:	Le pouvoir d'inhibition EC <sub>50</sub> d'échantillons étudiés.....	60
Tableau XI:	Balayage de spectre UV de différents extraits phénoliques de feuilles de <i>pistacia atlantica</i> .....	62
Tableau XII:	Balayage de spectre UV de différents extraits phénoliques de fruits de <i>pistacia atlantica</i> .....	63
Tableau XIII:	Le pourcentage d'inhibition des extraits phénoliques dans le test d'hémolyse.....	65
Tableau XIV:	Intervalle de Concentrations Effectrices des différents extraits de <i>Pistacia atlantica</i> sur <i>L. Infantum</i> et <i>L. major</i> .....	91

## Liste des abréviations

AAPH un générateur de radicaux libres [Dichlorate de 2,2'-azobis (8-tetraméthylchromane-2-carboxylique -)]

A<sub>Témoin</sub> Absorbance témoin

A<sub>Echantillon</sub> Absorbance d'échantillon

ABTS : Radical cation 2,2-azinobis-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

AG: Acide gras

ARN: Acide ribonucléique

BHA:Butylhydroxyanisole

BHT: Butylhydroxytoluène

CCM: Chromatographie sur couche mince

C4H : Cinnamate 4-hydroxylase

DMPD : Radical cation N, N' - p-di-méthylque –phénylènediamine

DMSO :diméthyle sulfo-oxyde

DPPH le radical stable [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl]

EC<sub>50</sub> : La concentration en extrait phénolique nécessaire pour l'inhibition de 50% des radicaux libres

F1 : femelle N° 1

F2 : femelle N° 2

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GIPL : Phospholipide de glycosylinositol

gp63: Glycoprotéine (63 Dalton)

HPLC: Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxyde d'hydrogène

HOCl: Acide hypochloreux

L : lipides

LC: Leishmaniose Cutanée LIPA114 MHOM/DZ/83/LIPA114 : Genre *Leishmania infantum* typée à Montpellier

LMC: leishmaniose cutaneo-muqueuse

LPG : Lipophosphoglycan

LV: leishmaniose viscérale

M: male

NNN : Nicolle Mac Neal Novy

NO<sup>•</sup>: Monoxyde d'azote

IO<sub>2</sub>: Oxygène singulet

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Anion superoxyde

OH<sup>•</sup>: Radical hydroxyle

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONOOH: Nitroperoxyde

ORAC : Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène

PAL: Phénylalanine-ammonia lyase

pH :potentiel d'hydrogène

PI : Pouvoir d'inhibition

PIÈGE: Paramètre total d'antioxydant de radical piégeage

PLC : Photochemiluminescence

PG: Gallate propylée

PPG: protéophosphoglycanes

P 1 : pied de Laghouat (région1)

P 2: pied de Ain Oussera (région2)

P2F2-1 : fruits matures de P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>

P2F2-2 : fruit immature de P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>

Pf : polyphénols des feuilles

pg : polyphénols des fruits (graines)

P<sub>1</sub>F<sub>1pf</sub>: Polyphénols des feuilles du pied femelle N° 1 de Laghouat (région1)

P<sub>1</sub>F<sub>2pf</sub>: Polyphénols des feuilles du pied femelle N° 2 de Laghouat (région1)

P<sub>2</sub>F<sub>1pf</sub>: Polyphénols des feuilles du pied femelle N° 1Ain Oussera (région2)

P<sub>2</sub>F<sub>2pf</sub>: Polyphénols des feuilles du pied femelle N° 2 Ain Oussera (région2)

P<sub>1</sub>M<sub>pf</sub>: Polyphénols des feuilles du pied male de Laghouat (région1)

P<sub>2</sub>M<sub>pf</sub>: Polyphénols des feuilles du pied male de Ain Oussera (région2)

P2F2-1 : Fruits matures de P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>

P2F2-2 : Fruit immature de P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>

P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub>: Polyphénols des fruits (graines) du pied femelle N° 1 de Laghouat (région1)

P<sub>1</sub>F<sub>2pg</sub>: Polyphénols des fruits (graines) du pied femelle N° 2 de Laghouat (région1)

P<sub>2</sub>F<sub>1pg</sub>: Polyphénols des fruits (graines) du pied femelle N° 1Ain Oussera (région2)

P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub>: Polyphénols des fruits matures (graines) du pied femelle N° 2 Ain Oussera (région2)

P<sub>2</sub>F<sub>2-2pg</sub>: Polyphénols des fruits immatures (graines) du pied femelle N° 2 Ain Oussera (région2)

P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub>: Lipide des fruits du pied femelle N° 1 de Laghouat (région1)

P<sub>1</sub>F<sub>2L</sub>: Lipide des fruits du pied femelle N° 2 de Laghouat (région1)

P<sub>2</sub>F<sub>1L</sub>: Lipide des fruits du pied femelle N° 1Ain Oussera (région2)

P<sub>2</sub>F<sub>2-1L</sub>: Lipide des fruits matures du pied femelle N° 2 Ain Oussera (région2)

P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub>: Lipide des fruits immatures du pied femelle N° 2 Ain Oussera (région2)

ROO<sup>•</sup>: Radical de peroxyde

RPMI: Roswell Park Memorial Park Institut.

TBA :Thiobarbiturique

TBA-MA : Thiobarbiturique- malonaldéhyde

TBHQ: Tetra-butylhydroquinone

Trolox: un analogue de vitamine E [Acide 6-hydroxy -2, 5, 7, (amidinopropane)]

# *Itroduction*

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. (Maurice, 1997).

Par l'étendue des domaines de recherches impliqués actuellement, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la comparaison entre différents individus de Pistachier de l'Atlas : *Pistacia atlantica Desf* (Anacardiaceae), issus de deux populations de pistachier d'atlas de deux régions du sud algérien (Laghouat et Ain Ouassera), selon deux marqueurs bio-organiques (lipides et polyphénols) choisis d'après l'étude phytochimique déjà réalisée dans le laboratoire des sciences fondamentales de l'université de Laghouat (Yousfi et al., 2003 ; Yousfi et al., 2008), suivie d'une étude de l'activité antioxydante et antileishmanienne de ces extraits.

Le choix de ce travail est basé sur :

- Le fait que cet arbre est très répandu dans toutes les régions steppiques et présahariennes de l'Algérie. Ainsi, cette espèce est utilisée en Algérie comme antiseptique, antifongique, et dans des maladies abdominales (Baba Aissa, 2000).
- De même, aucun travail n'a été consacré sur l'activité antileishmanienne de l'arbre (feuilles, fruit), en plus certaines classes de polyphénols et de lipides sont connues pour leur activité antiparasitaire surtout antileishmanienne (Tasdemir et al., 2006 ; Shweta et al., 2006; Hatimi et al., 2000).
- Les leishmanioses représentent un problème de santé majeur en santé publique. Bien que des médicaments existent pour traiter ces maladies, ceux-ci ne sont pas toujours efficaces. du fait de l'apparition de parasites résistants et de la toxicité des produits. 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 (Fournet et Muñoz, 2002).

Dans le cadre de cette étude, les capacités matérielles mises à notre disposition, nous ont permis de mettre en place une stratégie de recherche pour l'étude phytochimique de six individus de l'espèce étudiée et de tester l'activité antileishmanienne *in vitro* des extraits phénoliques et lipidiques de la plante.

A travers ce travail, nous s'intéressons dans un premier temps à donner quelques connaissances bibliographiques concernant l'intérêt d'étude des plantes médicinales ;

structure et propriétés des deux classes de molécules : polyphénols et lipides ; l'activité antioxydante et un aperçu scientifique sur la leishmaniose.

Par la suite, nous étudions la teneur de feuilles et de fruits en polyphénols totaux et en flavonoïdes ; la teneur de fruits en lipide, dosage de stéroïls totaux et de tocophérols totaux.

Troisièmement, nous s'intéressons à l'évaluation de l'activité antioxydante par deux tests, l'un chimique et l'autre biologique. Le choix des tests est finalement fixé sur une analyse mesurant le pouvoir des extraits phénoliques de balayer le radical stable DPPH comme test chimique, tandis que, le test biologique est basé sur la mesure du statut antioxydant de ces extraits vis-à-vis de l'altération des érythrocytes induits par un générateur des radicaux libres (AAPH).

Un autre objectif principal étant consacré à l'étude de l'activité antileishmanienne *in vitro* des extraits phénoliques et lipidiques de la plante.

# Partie I:

# Synthese Bibliographique

*Chapitre I*  
*Etude des plantes médicinales*

## I Etude des plantes médicinales

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques 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 précieuses pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutique (Fouché et *al.*, 2000).

Les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'Absinthe chinoise (*Artemisia Annuua*) et surtout son principe actif pour soigner la malaria lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments (Iserin, 2001).

### I.1 Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plus part des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (Iserin, 2001).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Decaux, 2002). La tubocurarine, le relaxant musculaire le plus puissant, est dérivée du curare (*Chondrodendron tomentosum*), la morphine, l'analgésique le plus puissant, est tirée du pavot à opium (*Papaver somniferum*) et la cocaïne utilisée comme anesthésiants, est tirée du coca (*Erythroxylum coca*). (Fouché et *al.*, 2000).

L'exploration des ressources naturelles, et notamment du monde végétal, est encore capitale à l'heure actuelle. Elle est réalisée par :

- ✦ **Etude chimiotaxonomique** qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique. Ainsi les Apocynaceae, les

Rutaceae, les Rubiaceae renferment souvent des alcaloïdes et c'est parmi ces familles que l'on recherche d'abord les alcaloïdes.

- ✦ **Etude ethnopharmacologique** qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Amérique du Sud, dans les îles du Pacifique, en Afrique ou dans le Sud-Est Asiatique.
- ✦ **Etude pharmacologique** est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel. Les interactions plantes-plantes (allélopathie), plantes-microorganismes, plantes-insectes, plantes-animaux sont associées à des signaux chimiques. (Fouché et *al.*, 2000).

## I.2 Notions sur la plante étudiée

### I.2.1 Caractéristiques botaniques du *Pistacia atlantica* Desf

**Nom commun:** Pistachier.

**Nom latin :** *Pistacia atlantica* Desf, proche *Pistacia vera*, *Pistacia chinensis*.

**Famille :** Anacardiaceae.

**Catégorie :** arbre dioïque.

**Port :** arrondie à ramification étalée, jeune le rameau est rougeâtre.

**Feuillage :** caduc, composé, imparipenné; 3 à 5 folioles ovales-acuminées, tomenteux puis coriace à l'âge adulte.

**Floraison :** en été en panicule de petites fleurs apétales (1 à 3) et 1 à 5 sépales.

Pollinisation effectuée par le vent. Fruits récoltés en septembre-octobre.

**Couleur :** vert brunâtre.

**Croissance :** lente et ne produit qu'à partir de 5 -7 ans.

**Hauteur :** 10 à 12 m.

**Plantation :** à l'automne ou au printemps.

**Multiplication :** par bouture.

**Sol :** tous mais bien drainé.

**Emplacement :** au soleil.

**Pays d'origine:** Méditerranée orientale (Crimée, Grèce et Turquie).

**Entretien :** arroser pour augmenter la production, tailler pour faciliter la récolte.

**Autres noms :** Le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.); *elbetoum*, *botma*, *betouma* ou *btouma* en Arabe local et *Igth* en berbère. Le nom commun de cette espèce se rapporte aux montagnes d'atlas où cette espèce se développe. Cet arbre est également

généralement connu comme pistachier sauvage, faux pistachier; fruits globuleux, petits rouge-brun, renfermant une graine verte. Les fruits sont appelés *ElKhodiri* par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur verte foncée à maturité.

Espèce nord-africaine, endémique, relativement commune dans toute l'Algérie (avec une prédilection pour les lieux arides), mais moins répandue dans le Sahara : Hoggar, Tassili. Le bétoum est considéré comme un puissant astringent, cela est dû à sa forte teneur en tanins. En outre, son écorce exsude une oléo-résine très odorante (Baba Aissa, 2000; Belhadj, 2003). *Pistacia atlantica* ainsi que ses sous-espèces : *Calibula*, *Mutica*, *Kurdica* et *Atlantica*, occupent une aire très vaste englobant le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, la Syrie, la Jordanie, Palestine, l'Iran et l'Afghanistan (Kaska et al., 1996 ; Khaldi et Khouja, 1996 ; Sheibani, 1996).

### **I.2.2 Propriétés de l'arbre**

Le bétoum est un bel arbre, qui existe à l'état disséminé dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaâd), Laghouat (partie sud) et Ghardaïa (dans l'oued m'zab) (Monjauze, 1980 ; Hadj-Hassan et Kardouch, 1995). Il présente un intérêt tout particulier, parce qu'avec arganier, c'est le seul arbre qui s'accommode de l'étage climatique aride et peut vivre dans les conditions écologiques les plus sévères. En raison de sa rusticité, de la caducité de ces feuilles qui produisent de bons sols forestiers, de sa résistance à la sécheresse et de ses faibles exigences pluviométriques. Il est très utile pour recevoir la greffe de *Pistacia vera*. Les arbres greffés sont d'une grande vigueur, très rustiques et d'une longévité remarquable (Monastra et al., 2000). Il peut y être cultivé et supporter les vents forts et les longues périodes de sécheresse. Les principaux facteurs qui contribuent à sa dégradation sont l'exploitation forestière, les incendies de forêt et l'action des animaux. En Algérie, *Pistacia atlantica* est trouvée en association avec *Ziziphus lotus* qui protège ces nouveaux plants contre les animaux et les vents violents. L'utilisation de la culture reste faible malgré son potentiel d'adaptation aux conditions arides du milieu. Les conditions climatiques de la plupart des régions agricoles montagneuses et semi-arides de notre pays sont favorables à son extension (Belhadj, 2003).

### **I.2.3 Utilisations de l'arbre**

Cet arbre peut présenter plusieurs Utilisations :

#### **-Utilisations Médicinales**

Très utile comme Antiseptique, antifongique, et dans des maladies abdominales (Baba Aissa, 2000).

### **-Utilisations Comestibles**

Le fruit donne une excellente huile de table est obtenue à partir des graines qui contiennent environ 55% d'huile (Daneshard et *al.*, 1980).

### **-Utilisations locales**

Les fruits de cet arbre (*El Khodiri*) sont des drupes comestibles de la grosseur d'un pois, légèrement ovales et aplaties, utilisées à des fins culinaires et médicinales. Ils sont riches en huile dense très énergétique. L'huile est souvent mélangée aux dattes écrasées et peut être consommée à toute heure de la journée avec du petit lait. L'huile a un goût très proche de celui du beurre, elle est très appréciée dans la région. Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes. L'écorce produit une résine-mastic qui exsude naturellement de façon abondante par temps chaud. Les populations locales s'en servent pour usage médical. Le suintement du tronc donne ' l'encre rouge des tolbas', il est utilisé, également, pour la tannerie des peaux. Jadis, l'arbre était abondant. L'arbre fournit un bois d'artisanat et toutes les espèces du pistachier constituent un apport en fourrage considérable pour l'alimentation du bétail surtout en automne. Cette essence peut entrer dans le cadre de la lutte contre la désertification utilisée pour la fixation des dunes, comme brisevents (Belhadj, 2003).

De plus ils existe d'autre utilisation tels que : Colorant, Gomme, Encre, Résine, Rhizome; Tannin, Bois.

### **I.2.4 Travaux antérieurs sur *Pistacia Atlantica Desf***

L'analyse phytochimique des différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas a été l'objet de quelques études via la composition du fruit en acides gras, en acides amines, en éléments minéraux et le dosage quantitatif des protéines, des fibres et de l'amidon (Daneshard et *al.*, 1980 ; Yousfi et *al.*, 2003).

En outre une étude plus récente sur les extraits phénoliques de cinq différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas à savoir: les feuilles, les écorces, les gales, les fruits et la partie dégradée de l'arbre (champignon). Les résultats ont montré que les différents extraits sont riches en composés phénoliques à l'exception des extraits des écorces. L'analyse de l'activité antioxydante de ces derniers et l'application des techniques spectrale ont permis de mettre en évidence de deux produits à structure phénolique responsable de cette activité ( Yousfi et *al.*, 2008).

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude comparative des populations des *Pistacia atlantica*, on trouve l'étude comparative de la micro-morphologie de l'épiderme des feuilles dans huit populations de *Pistacia atlantica Desf* issues de différentes régions algériennes (Belhadj et *al.*, 2007) qui montre l'existence d'une variabilité qui pourrait être due aux conditions écologiques.

Par ailleurs, aucune référence bibliographique concernant la comparaison des populations du Pistachier de l'Atlas à travers leur métabolites n'a été trouvée: la teneur de fruit en l'huile ainsi ces fractions minoritaires (Tocophérols et stérols) et en polyphénols ; de même pour la teneur des feuilles en polyphénols. Ainsi, aucune référence bibliographique ne montre que l'activité antileishmanienne de l'arbre est étudiée.

# Partie I:

# Synthese Bibliographique

*Chapitre I*  
*Etude des plantes médicinales*

## II Les différentes classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol  $C_6H_5OH$  qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Les composés phénoliques représentent de 2 à 3 % de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10 % et même d'avantage. Tous les phénols, à de très rares exceptions (exemple : la lignine) sont des métabolites énergétiques des échanges cellulaires et interviennent activement dans différents processus : photosynthèse, respiration, croissance, résistance aux maladies infectieuses (Rakipov, 1987). Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins).

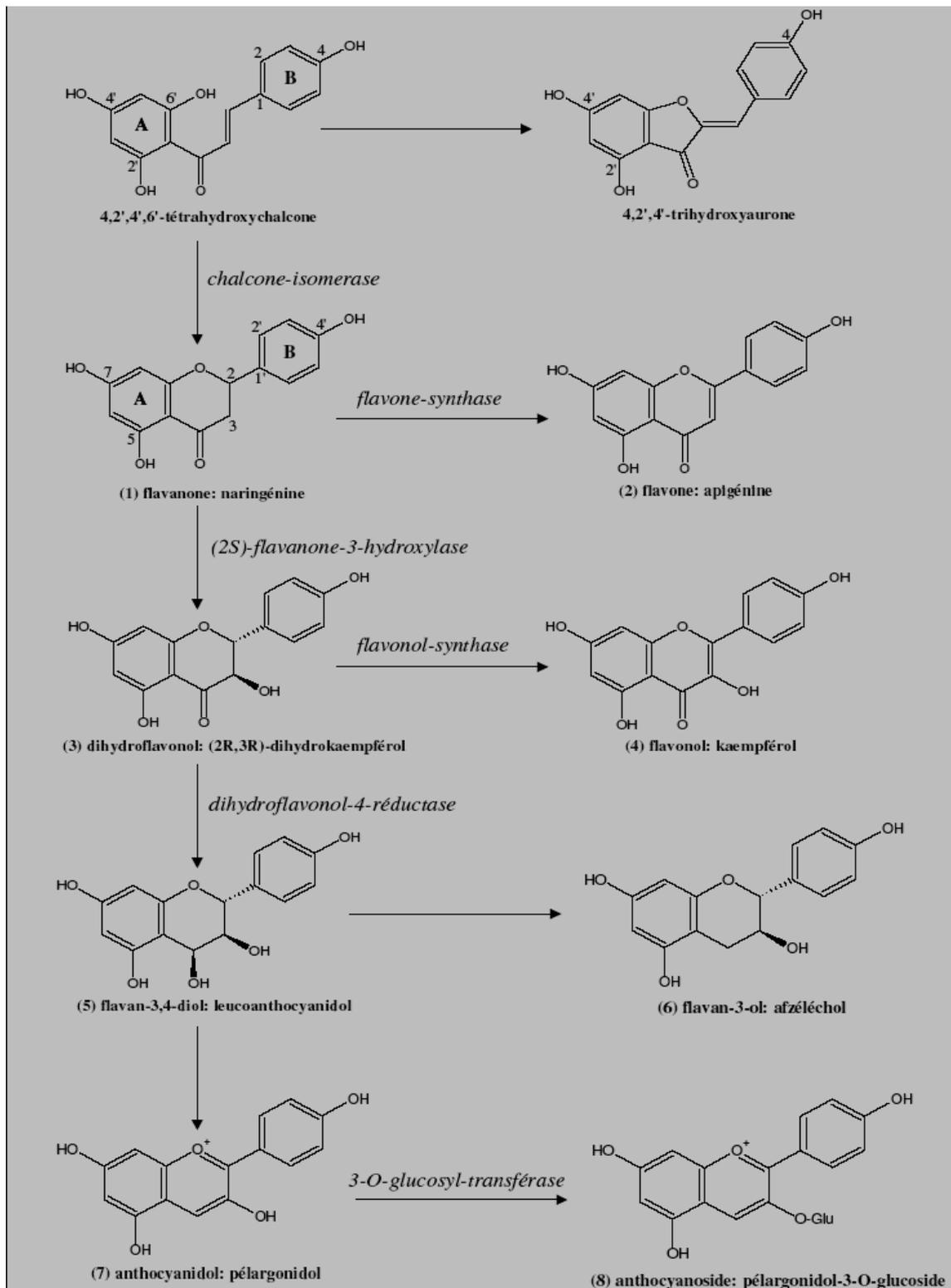
Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes (Oka et *al.*, 1972 ; Kooter et *al.*, 2002). Le terme "flavonoïde", est utilisé pour la première fois par Geissman et Hinreiner (Harborn, 1975).

### II.1 Les flavonoïdes

#### II.1.1 Structure chimique et classification

Structuralement les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols (Graham, 1998).

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (voire figure n°01). A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.



**Figure n°01:** La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

## II.1.2 Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. Présents dans tous les organes

aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux) (Paris et *al.*, 1991). Sur le plan tissulaire, les flavonoïdes sont rencontrés plus précisément dans les vacuoles des cellules ainsi que dans les chloroplastes (Bruneton, 1987).

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (Guignard, 1996; Bronner et *al.*, 1995; Hollman et *al.*, 1996; Crozier et *al.*, 1997). Le tableau I regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.

**Tableau I:** Distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes (Richter, 1993)

<b>Flavonoïdes</b>	<b>Aliments</b>
<b>Flavonones</b>	
naringénine	Fruits de genre citrus
<b>Flavones</b>	
chrysin	Peau des fruits
apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
lutéonile	Persil, céleri
<b>Flavonols</b>	
kæmpférol	Radis, brocoli, thé noir
quercétine	Oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate
myricitine	Canneberge, vin rouge
<b>Flavan-3-ols</b>	
épicatéchine	Thé vert, thé noir
catéchine	Thé vert, thé noir
épigallocatechine	Vin rouge
<b>Anthocyanidols</b>	
cyanol	Cassis, myrtilles
malvidol	Raisins, fraises, cassis
apigenidol	Framboises, fraises

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires.

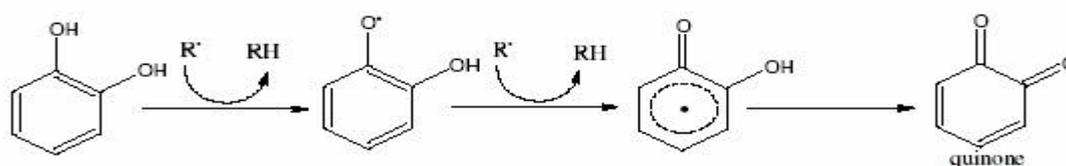
### II.1.3 Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (*Prix Nobel*, 1937), chercheur de l'Université de Szeged

(Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) (Scalbert, 2004).

### II.1.3.1 Les flavonoïdes comme antioxydants

Les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Figure n°02) (Van Acker et al., 1996).



**Figure n°02:** Piégeage des radicaux libres (R•) par les flavonoïdes (Van Acker et al., 1996).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipoxygénase (Cos et al., 1998 ; Landolfi et al., 1984).

### II.1.3. 2 Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

#### -Effets Antiallergiques

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca<sup>2+</sup>-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (Di Carlo et al., 1999).

#### -Effets Anti-Inflammatoires

Sous l'action de la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes tels la quercétine et la myricétine, l'apigénine et la chrysin sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes en inhibant ces enzymes (Landolfi et al., 1984).

### **-Effets Anti-Ulcereux**

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes (Di Carlo *et al.*, 1999).

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel (Izzo, 1996). En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

### **-Effets Anticancereux**

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale (Bracke *et al.*, 1991). Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (Larocca *et al.*, 1994).

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres (Di Carlo *et al.*, 1999). En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène (Scutt *et al.*, 1987) et inhibe l'activité de la collagénase (Makimura *et al.*, 1993).

### **-Autres Effets Biologiques**

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry *et al.*, 1983). Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Ong *et al.*, 1997 ; Ong *et al.*, 2000).

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (Hertog *et al.*, 1993).

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés (Chu *et al.*, 1992).

## II.2 Les Tanins

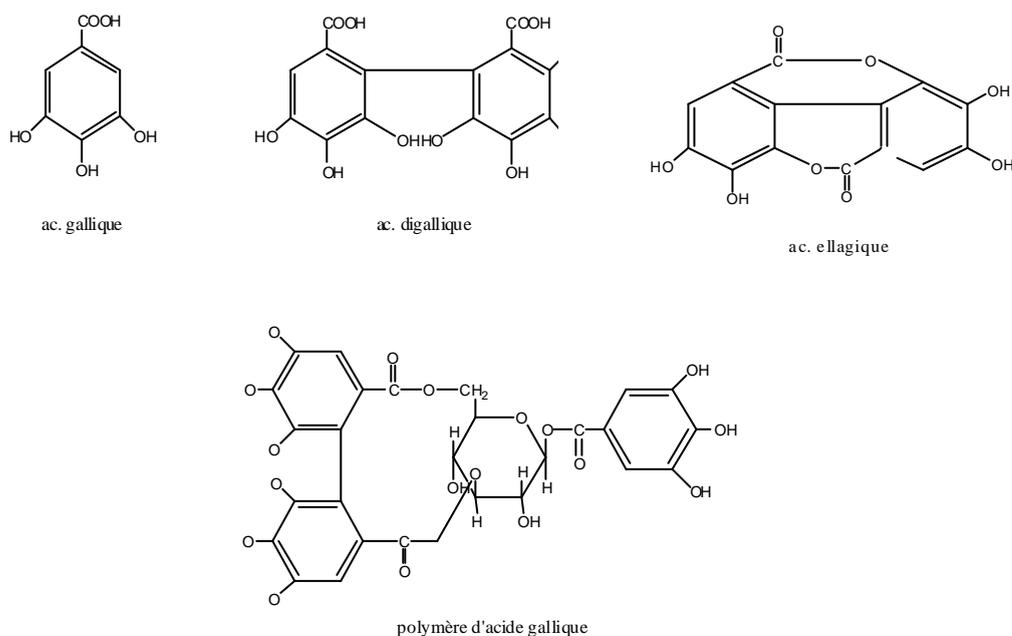
Composés phénoliques de haut poids moléculaire utilisés dans l'industrie du cuir, également responsables de l'astringence de certains aliments (Haslam, 1989).

### II.2.1 Structure chimique

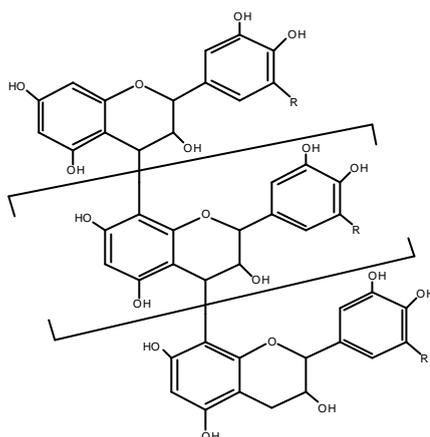
On distingue les tanins hydrolysables ou tannoïdes (Figure n°03) qui sont des polymères de l'acide gallique et les tannins vrais non hydrolysables (condensés) (Figure n°04), qui sont des polymères de certains flavanols, les catéchines ou catéchols et de proanthocyanidols.

L'astringence des fruits et des boissons provient souvent de l'interaction des polyphénols présents avec les protéines salivaires. Donc Les tanins ont la propriétés de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux ; ils précipitent également les protéines de la salive ce qui correspond à leur action astringente. Cette propriété rend les tissus riches en tanins peu consommables par les herbivores. L'importante quantité de tannin rencontrée chez les plantes parasitées correspond à une réaction de défense.

La dispersion des tannins chez de nombreux fruits lors de leur maturation indique qu'ils peuvent, comme de nombreux autres composés phénoliques, être réutilisés par la plante (Guignard *et al.*, 1985).



**Figure n°03:** Exemples de Tannoïdes.



**Figure n°04** : Structure des tannins condensés (R = H, OH).

## II.2.2 Activité biologique des tanins

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec des macromolécules en particulier avec les protéines. Cette propriété semble être essentielle dans leurs activités à l'encontre des virus. Ainsi, leur association avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôtes serait à l'origine de la diminution de la charge virale. De telles activités ont été trouvées à l'encontre de l'herpès (Takechi et *al.*, 1985) et en particulier contre le HIV ou SIDA (Vlietinck et *al.*, 1997). L'acide chébulagique extrait de *terminalia chebula*, par exemple, utilise ce mode d'action contre le HIV. Egalement, il apparaît que les tanins agissent en inhibant des enzymes essentielles à la réplication du virus, comme l'acide ellagique inhibiteur de la 'VHI transcriptase reverse' ou l'acide chébulagique et la corilagine, extraits de deux espèces de phyllantus, inhibiteurs de la ADN polymérase du virus Epstein-Barr (Chen Lui et *al.*, 1999) .

De façon plus générale, les tanins sont des inhibiteurs enzymatiques de l'élastase, de l'histidine décarboxylase et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Bruneton, 1993).

L'acide chébulagique est réputé comme inhibiteur de la topoisomérase I et surtout II de l'ADN humain. Ce dernier possède également la propriété, qu'ont de nombreux autres tanins ellagiques, d'être cytotoxique à l'encontre de lignées cellulaires cancéreuses. Plus récemment, des propriétés antiplasmodiales ont pu être trouvées. L'extrait méthanolique d'écorces de *tristanopsis calobuxus* de Nouvelle Calédonie, contenant de nombreux tanins, a donné des résultats prometteurs (Quideau et *al.*, 1996).

L'acide ellagique est l'un des composés actifs. Plusieurs drogues à tanins existent mais leurs applications restent restreintes. Elles sont utilisées par voie interne pour leur effet anti-diarrhéique et par voie externe pour imperméabiliser les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes. Elles ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant la perte en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique (antibactérien et antifongique) clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatose,...) (Bruneton,1993 ; Veroffa, et *al.*, 2001).

D'autres tanins sont aussi connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, l'acide chébulagique ou la corilagine extraits de *terminalia citrina* (plante utilisée dans la médecine traditionnelle Thaïlandaise) présentent de nombreuses activités à l'encontre de souches pathogènes de l'homme, comme *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsielle pneumoniae*, *Candida albicans* ou encore *Enterococcus SPP* (Mazza et *al.*, 1993).

Enfin, les potentialités des tannins dans l'inhibition de la peroxydation des lipides ont mis en évidence leurs propriétés de piègeurs de radicaux libres et d'inhibiteurs de la formation de l'ion super oxyde (inhibiteurs de la xanthine oxydase).

*Chapitre III*  
*Généralité sur les lipides*

## III Généralités sur les lipides

### III.1 Définition

Les lipides sont un ensemble très hétérogène de composés faisant partie de la constitution des êtres vivants et ayant la propriété commune d'être insolubles dans l'eau (*lipos*) et solubles dans les solvants organiques apolaires comme l'hexane, le benzène, le chloroforme et l'éther (El Atyqy, 2007).

Dans l'organisme, les lipides ont 4 fonctions principales :

**-Réserve d'énergie** : stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux, les lipides constituent ainsi une réserve énergétique mobilisable (1 g de lipides donne environ 9,3 Kcal).

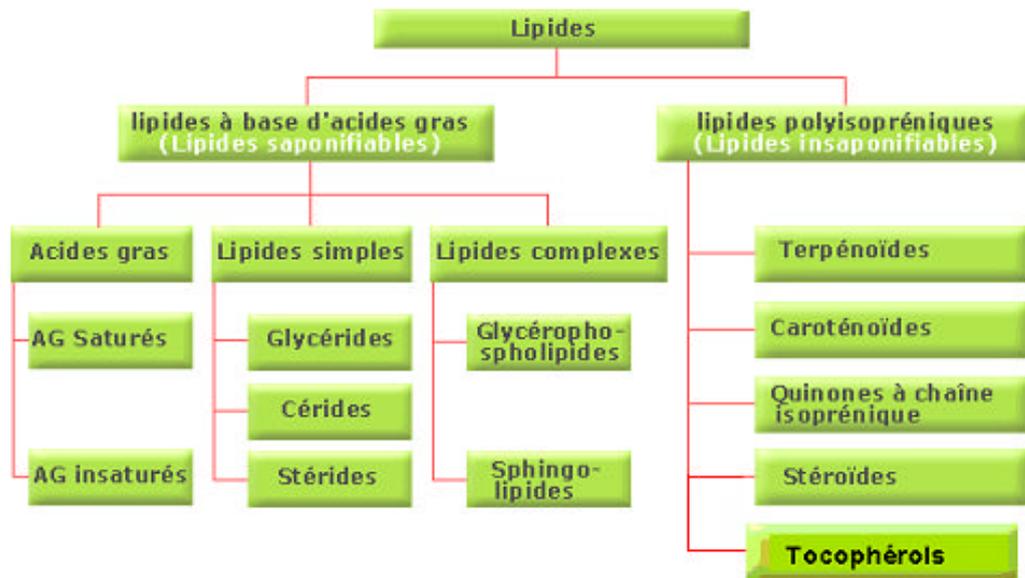
**-Un rôle structural** : les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes autour des cellules et des organelles. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité, viscosité).

**-Un rôle de messenger** : les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra et extra-cellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes, hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine, etc.

**-Un rôle de transport de vitamines** : les corps gras alimentaires véhiculent quatre vitamines liposolubles : A, D, E et K (Fahy et al., 2005).

### III.2 Classification des lipides

On classe les lipides en deux grandes catégories : les lipides à base d'acides gras et les lipides à base d'isoprène (lipides polyisopréniques) (Figure n°05).



**Figure n°05:** Classification des lipides (El Atyqy, 2007).

Les lipides à base d'acides gras sont également appelés « **lipides saponifiables** » (lipides qui, traités avec NaOH ou KOH, donnent du savon). En revanche, les lipides n'aboutissant pas à la formation du savon par traitement alcalin sont appelés « **lipides insaponifiables** » (El Atyqy, 2007; Fahy *et al.*, 2005).

### III.2.1 Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques aliphatiques à chaîne carbonée plus ou moins longue dérivant de/ou contenu dans les graisses animales et végétales (Figure n°06). Par extension, le terme est parfois utilisé pour désigner tous les acides carboxyliques à chaîne carbonée non cyclique (Fahy *et al.*, 2005).



**Figure n°06:** Acide gras (El Atyqy, 2007).

Les acides gras ont généralement un goût aigre et une odeur prononcée. Ils sont insolubles dans l'eau, mais solubles entre eux et dans les solvants organiques comme l'éther. Ils se différencient entre eux par la longueur de la chaîne carbonée (de 4 à 18 atomes de carbone pour les acides gras les plus connus, généralement un nombre paire) et par le type de liaisons qui

réunissent leurs atomes de carbone : on dit qu'ils sont saturés lorsqu'ils ne contiennent que de simples liaisons, et insaturés lorsqu'ils comptent au moins une double liaison (Blond, 1993).

On connaît une quarantaine d'acides gras naturels, dont les plus importants sont l'acide butyrique (ou butanoïque), que l'on trouve dans le beurre, l'acide palmitique (huile de palme), l'acide stéarique (suif), l'acide linoléique (huile d'arachide) duquel est dérivé l'acide arachidonique, et l'acide linoléique (huile de bourrache). Les acides linoléique et linoléique sont des acides gras dits essentiels : les animaux sont incapables de les synthétiser et doivent donc obligatoirement les trouver dans leur alimentation. Les deux acides constituent ensemble ce qu'on appelait autrefois la vitamine F (Dymock, 2000).

### III.2.2 Lipides simples

Les lipides simples ou homolipides sont les lipides qui ne contiennent que le carbone, l'hydrogène et l'oxygène. Ils sont souvent des esters d'un alcool et d'acides gras. Les lipides simples sont classés en trois groupes : les glycérides, les Cérides et les stérides (Fahy et *al.*, 2005).

#### III.2.2.1 Glycérides

Les glycérides sont des lipides simples aussi appelés graisses. Ce sont des esters du glycérol et d'acides gras (un, deux ou trois acides gras). Selon le nombre d'acides gras combinés au glycérol, on distingue les monoglycérides, les diglycérides et les triglycérides (Figure n°07). Les triglycérides sont les constituants principaux des graisses animales et des huiles végétales (plus de 95%). Les monoglycérides et les diglycérides sont beaucoup moins abondants que les triglycérides (Naudet, 1992).

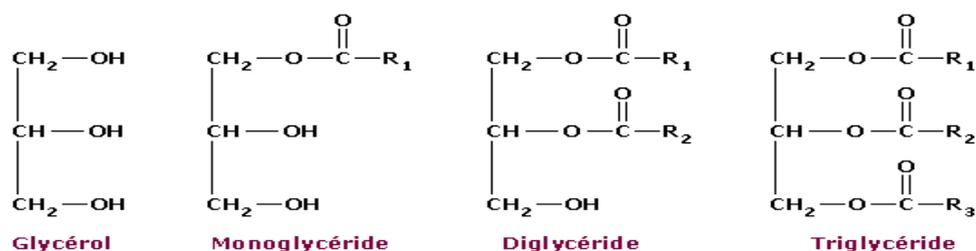


Figure n°07: Les glycérides.

### **III.2.2.2 Cérïdes**

Les cérïdes sont également appelés cires. Ce sont des esters d'un alcool aliphatique primaire de longue chaîne, appelé alcool gras, et d'acides gras supérieurs à l'acide palmitique (16 atomes de carbones). Ils se trouvent aussi bien chez les végétaux que chez les animaux. Chez les végétaux, ils sont représentés par une cuticule plus au moins imperméable à la surface des feuilles et des fruits et jouent un rôle protecteur (El Atyqy, 2007).

### **III.2.2.3 Stérides**

Les stérides sont des esters d'acides gras et de stérols. Les stérols sont des alcools tétracycliques rattachés au groupe des stéroïdes.

Suivant l'origine des stérides, on distingue 3 groupes : les fungistérols (qui sont spécifiques aux champignons), les phytostérols (constituants de la partie insaponifiable des végétaux) et les zoostérols (présents dans les tissus animaux). Le représentant principal des zoostérols est le cholestérol (El Atyqy, 2007).

### **III.2.3 Lipides complexes**

Les lipides complexes sont des lipides qui contiennent en plus du carbone, hydrogène et oxygène un ou plusieurs hétéroatomes (azote, phosphore, soufre). Suivant la nature de l'hétéroatome, on distingue : les lipides phosphorés, les lipides azotés et les lipides soufrés (Fahy et *al.*, 2005).

### **III.2.4 Lipides polyisopréniques**

Les lipides polyisopréniques sont des lipides à base d'isoprène. Ce groupe est aussi appelé lipides insaponifiables et jouent un rôle biologique fondamental (hormones et vitamines). Ils sont divisés en quatre catégories : les terpénoïdes, les caroténoïdes, les quinones à chaîne isoprénique et les stéroïdes. Les carotènes (pigment rouge-orangé), les xanthophylles (pigment jaune) et la vitamine A font partie des caroténoïdes. Les tocophérols, la vitamine K, les ubiquinones et les plastoquinones font partie des quinones à chaîne isoprénique. Les stéroïdes regroupent les stérols, les acides biliaires, les hormones stéroïdes et la vitamine D. Ces trois derniers sont des dérivés des stérols (Karleskind, 1992).

Les huiles essentielles des végétaux (géraniol, limonène, menthol, pinène, camphre) qui contribuent à l'odeur et à la saveur de certaines espèces sont aussi des lipides polyisopréniques (Fahy et *al.*, 2005).

### III.2.4.1 Les stérols

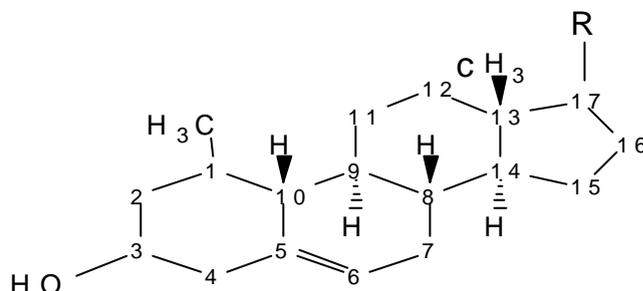
#### III.2.4.1.1 Structure chimique

Ce sont des composés tétra cycliques comportant le plus souvent 27, ou 28 et même parfois 29 atomes de carbone, ils diffèrent de leurs précurseurs biosynthétiques.

Le noyau tétra cyclique possède le plus souvent une double liaison localisée fréquemment en position 5, mais que l'on peut rencontrer en 7 (Figure n°08).

La chaîne latérale possède huit à neuf ou dix atomes de carbone; elle peut être saturée ou comporter en 22,24(25), 24(28) ou 25 (27) une ou deux doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées.

Les stérols constituent une fraction importante de linsaponifiable (Naudet, 1992). Le stérol le plus abondant dans le règne végétal et sans conteste les sitostérol, suivi du campestérol, du stigmastérol, de l'isofucostérol et dans règne animal on trouve le cholestérol (Polnoveski et *al.*, 1997).



**Figure n°08:** structure de base des Stérols (Naudet, 1992).

#### III.2.4.1.2 Rôle biologique des phytostérols

Les phytostérols ainsi que les stérols en générale sont étudiés en raison de leur diversité structurale et de leur une gamme étendue d'effets thérapeutiques telles que anticholestérolémique, antitumorale, antidiabétique, et anti-inflammatoire et également en raison de leur faible toxicité (Naït Said, 2007).

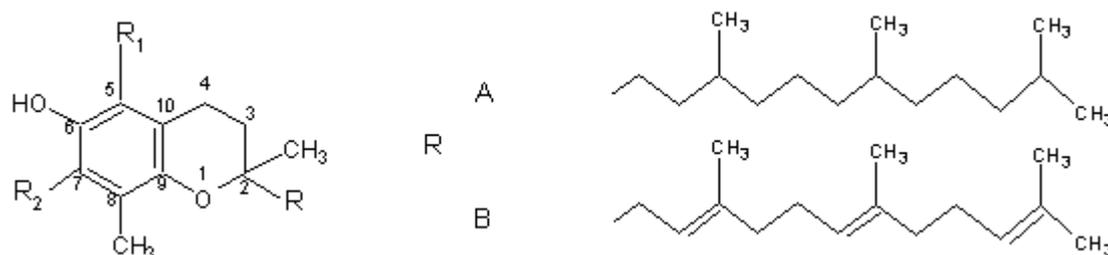
Les sitostérols et les stigmastérols constituent les précurseurs biogénétique et constituent la matière première pour l'hémisynthèse des hormones stéroïdiennes (hormone génitale ou corticosurrénal) (Smadi, 2007 ; Frénot et Vierling , 2001). Autre phytostérols qui contient un groupe éthylène possèdent des propriétés antioxydantes et anti-polymériques (Smadi, 2007).

Les stérols favoriseraient la sensibilisation des micro-organismes aux antibiotiques (Naït Said, 2007).

### III.2.4.2 Les tocophérols

#### III.2.4.2.1 Structure chimique

Ces composés sont de 8 -methylchroman 6 ols substitués en position 1 par un groupe méthyle une chaîne de polyisoprénique de seize atomes de carbone saturés tocophérol T ou tri insaturés tocotriérol T<sub>3</sub> (Figure n°09). Cette famille comprend quatre substances a -tocophérol, β -tocophérol, ? -tocophérol et d- tocophérol (Karleskind,1992). L'alpha tocophérol est le plus fréquent et le plus actif biologiquement et le bêta et gamma tocophérol représente une activité vitaminique réduite (respectivement 30et15% environ de l'activité de alpha tocophérol) (Vander, 1964).



Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
a tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
a tocotreinol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β tocophérol	CH <sub>3</sub>	H
β tocotreinol	CH <sub>3</sub>	H
? tocophérol	H	CH <sub>3</sub>
? tocotreinol	H	CH <sub>3</sub>
d tocophérol	H	H
d tocotreinol	H	H

Figure n°09: Structure des tocophérols [R chaîne latéral (A tocophérol et B tocotrienol)].

### **III.2.4.2.2 Rôle biologique de la vitamine E**

La vitamine E est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques (Polnoveski et *al.*, 1977). A cet égard, elle participe avec nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène, c'est-à-dire la lutte contre les radicaux libres et les éléments non radicalaires produits lors de la formation des radicaux libres (Cuvelier et *al.*, 2003). Elle stabilise les membranes cellulaires parce qu'elle participe à la formation à des phospholipides membranaires. La vitamine E a une action sur l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes sont riche en vitamine E et le déficit en ce dernier induit des microthromboses. En plus la vitamine E diminue l'activité de la lipoxygénase des plaquettes. Egalement, elle a une action sur le métabolisme des globules rouges. La vitamine E protège les membranes érythrocytaires contre l'action de la peroxydase de l'hémoglobine sur les AG désaturés. Elle Exerce un effet régulateur sur la synthèse de l'hème et des enzymes héminiques comme le cytochrome et la catalase (Frènot et Vierling, 2001).

*Chapitre IV*  
*Oxydation et radicaux libres*

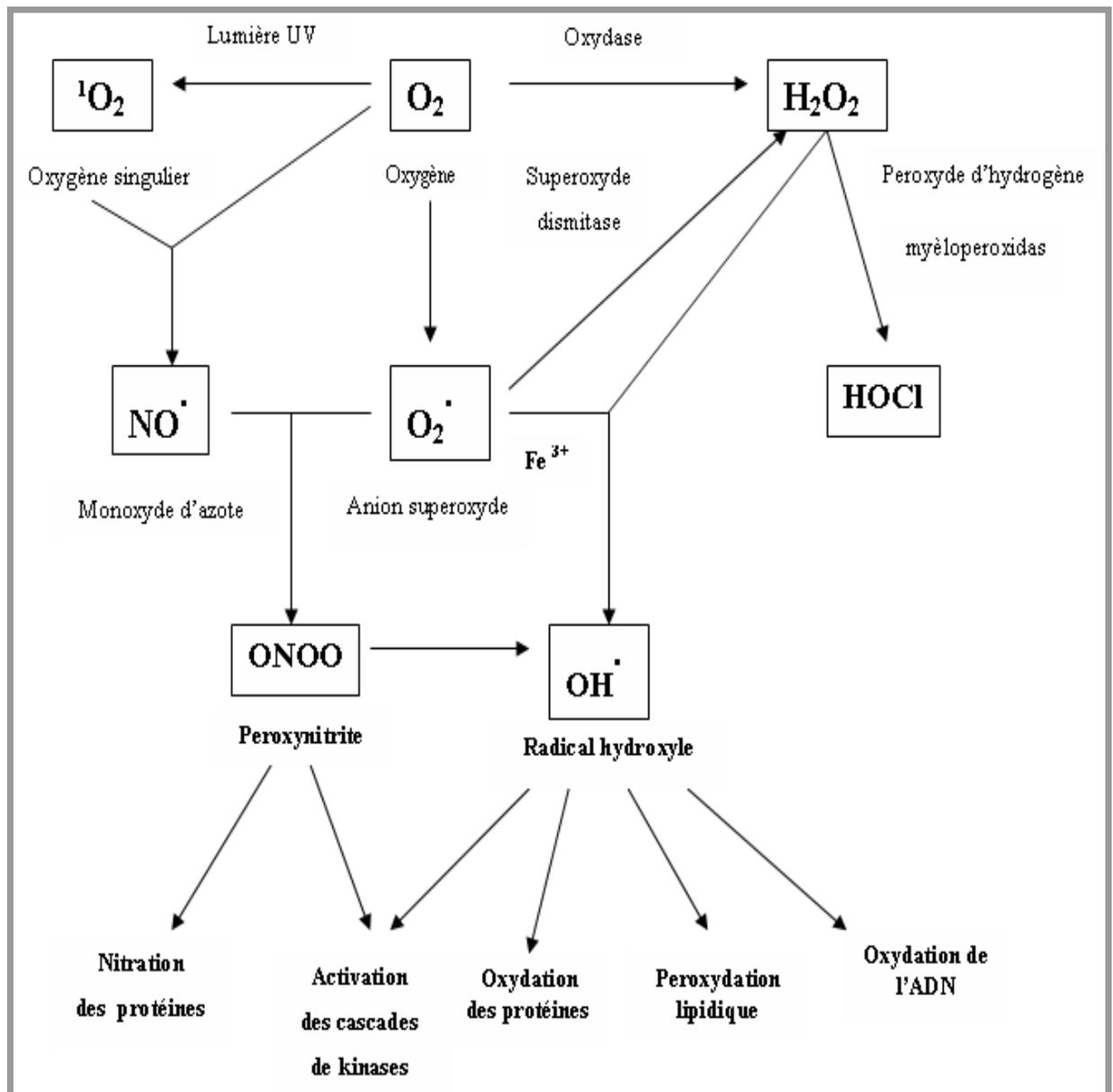
## **IV Oxydation et radicaux libres**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (Lesgards, 2000). Il existe plusieurs types de radicaux libres, mais tous sont constitués de molécules comprenant un électron impair dans leur orbite extrême. Chacune de ces molécules dotées d'une charge négative cherche une autre molécule avec laquelle elle peut se combiner. Particulièrement instables et actives, ces molécules sont en collision constante avec d'autres particules et les tissus. Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes; en fait, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libres dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac, l'exercice excessif et le stress sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (Favier, 2003).

### **IV.1 Les radicaux libres dans les systèmes biologiques**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel l'anion superoxyde  $O_2^\bullet$  et le radical hydroxyle  $OH^\bullet$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^\bullet$ . D'autres espèces dérivées de l'oxygène tel que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH) peuvent être des précurseurs de radicaux libres. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Figure n°10) (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont principalement produits par des sources endogènes, telles que les chaînes de transport d'électron, les peroxysomes et le système de cytochrome P-450. Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, Maladie d'Alzheimer ou la Maladie de Parkinson (Favier, 2003).



**Figure n°10:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

## IV.2 Activité antioxydante

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Elles disposent de moyens de défense, les uns sont d'origine endogène, comme des enzymes, et d'autres sont apportés par l'alimentation.

La vitamine E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes qui sont apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piègeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates (Favier, 2003).

Les systèmes enzymatiques intervenant selon ce mécanisme présentent un fonctionnement en chaîne. Les enzymes impliquées sont la superoxyde dismutase, une enzyme cupro-dépendante qui élimine le radical superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène, la glutathion peroxydase et la catalase, qui éliminent le peroxyde d'hydrogène, la glutathion réductase, qui régénère le glutathion réduit, et la glucose-6-phosphatase qui fournit les liaisons riches en énergie nécessaires au fonctionnement de la chaîne de réactions (Amstad et *al.*, 1991).

#### **IV.2.1 Les antioxydants**

Les antioxydants sont des substances endogènes ou exogènes capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Le corps produit des antioxydants, et on en trouve également dans plusieurs aliments. Les principaux antioxydants sont les vitamines C et E, les caroténoïdes et le sélénium. Les antioxydants permettent, également de faire en sorte que les produits alimentaires conservent leur goût et leur couleur et demeurent longtemps comestibles. Leur utilisation est particulièrement importante si l'on veut éviter l'oxydation des lipides et des produits contenant des lipides.

##### **IV.2.1.1 Les antioxydants synthétiques**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (**BHA**), butylhydroxytoluène (**BHT**), gallate propylée (**PG**) et le tetra-butylhydroquinone (**TBHQ**), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu Wang et *al.*, 2003).

##### **IV.2.1.2 Les antioxydants naturels**

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Les

métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes et sont " à faible prix de revient ".

Chez les plantes, il existe aussi un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, les acides aminés et les composés phénoliques (Cuendet, 1999).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures de tissus végétaux *in vivo* et *in vitro*. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, en particulier les flavonoïdes (Bahorun, 1996).

#### **IV.2.2 Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante**

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (Li Peiwu et *al.*, 1999). D'autres méthodes, moins pratiques, nécessitent la pulvérisation successive de deux solutions différentes. Une méthode à phase inversée de la chromatographie (chromatographie sur couche mince), a été proposée par Glavind et Holmer (Glavind et Holmer, 1967) combinée avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est directement reliée avec l'oxydation dans les nourritures et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde ( $O_2^{\cdot}$ ); le balayage de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ); le balayage d'acide hypochloreux (HOCl) (Sánchez-moreno, 2002) le balayage du radical d'hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) ou le

balayage du radical de peroxyde (ROO<sup>•</sup>). Parmi ces méthodes, nous citons ceux qui emploient l'azo-composant pour produire des radicaux de peroxydes, tels que la méthode de PIÈGE (Paramètre total d'antioxydant de radical piégeage) (Brasseur et *al.*, 1995) ; la méthode d'ORAC (capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (Cao et *al.*, 1993) ; la méthode d'ABTS (le balayage du radical cation 2,2-azinobis-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate)) (Duthie et *al.*, 1991); le balayage du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (la méthode du radical DPPH) (Blois, 1958; Uchiyama et *al.*, 1968, Molyneux, 2004), la méthode de DMPD (le balayage du radical cation N, N'- p-di-méthylque -phénylènediamine)(Li et *al.*, 1994) ou la méthode de Photochemiluminescence (PLC) (Magin et *al.*, 2000).

Actuellement, une des méthodes analytiques les plus communes pour déterminer l'oxydation de lipides est l'analyse de TBA (Ernster et *al.*, 1967), qui mesure un complexe thiobarbiturique- malonaldéhyde (TBA-MA) avec un maximum d'absorbance à 530 nm. La méthode de TBA a certaines limitations dans des systèmes de nourriture. Le TBA réagit non spécifiquement avec des composés tels que les sucres, l'acide ascorbique, et les produits non enzymatiques de brunissement souvent actuels en nourritures.

*Chapitre V*  
*Généralités sur les leishmanioses*

## V Généralités sur les leishmanioses

**V.1 Définition :** C'est un ensemble hétérogène d'affection toutes dues à l'infection de l'hôte par un parasite protozoaire *Leishmania* et transmises par la piqûre d'un insecte vecteur le phlébotome (Bachi, 2006).

### V.2 Epidémiologie

#### V.2.1 Le parasite

##### V.2.1.1 Taxonomie

Le parasite *Leishmania* d'après l'OMS (1990) appartient au :

Regne :	Protista
Sous regne :	Protozoa
Phylum :	Sarcomastigophora
Sous-Phylum :	Mastigophora
Classe :	Zoomastigophorea
Ordre :	Promastigotida/Kinetoplastida
Sous-Ordre :	Trypanosomatina
Famille :	Trypanosomatidae
Genre :	<i>Leishmania</i>

Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie identique, causent une panoplie de manifestations cliniques allant de la forme cutanée qui se résorbe d'elle-même à la forme viscérale qui est fatale en absence de traitement et à la forme cutaneo-muqueuse causant de graves défigurations. On regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en complexes selon leurs profils isoenzymatiques (Roberts et Janovy, 2000).

##### V.2.1.2 Morphologie

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

Le parasite est dimorphique, amastigotes intramacrophagiques chez les hôtes vertébrés dont l'homme et promastigotes libres dans l'intestin du phlébotome et dans le milieu de culture (ANOFEL, 2005).

### **-Les amastigotes**

Ovoïdes, elles mesurent 2 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre et ont un flagelle très court qui ne dépasse pas le corps cellulaire, présentent en microscopie optique après coloration panoptique de routine deux inclusions pourpres juxtaposées caractéristiques : le noyau, arrondi, et le kinétoplaste en bâtonnet plus sombre. Elles se multiplient par scissiparité dans la ou les vacuoles parasitophores dans le cytoplasme des macrophages. Libérées après éclatement du macrophage, elles parasitent d'autres macrophages sains (Sacks et Kamhawi, 2001).

### **-Les promastigotes**

Présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20  $\mu\text{m}$  de long et de 1 à 4  $\mu\text{m}$  de large, qui est prolongé par un flagelle qui émerge du pôle antérieur et peut atteindre jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  de longueur. Le kinétoplaste de cette forme est situé entre le noyau et la base du flagelle. Elles se multiplient par scissiparité longitudinale (Sacks et Kamhawi, 2001).

## **V.2.2 Vecteurs**

Les vecteurs de la leishmaniose appartiennent à l'ordre Diptera, de la famille des Psychodidae et de la sous-famille des Phlebotominae. Les genres prédominants dans la transmission connue du parasite *Leishmania* aux humains sont : *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde, et *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde (Killick-Kendrick, 1990). Seule la femelle transmet la maladie en prenant un repas sanguin chez l'hôte qui servira au développement des œufs (Pinto et al., 2001).

## **V.2.3 Réservoirs**

Les leishmanioses se divisent en deux types, anthroponotique et zoonotique.

**-Les leishmanioses anthroponotique :** Elle touche uniquement l'être humain.

**- Les leishmanioses zoonotiques :** Elle touche l'être humain et d'autres mammifères.

Dans le cas des leishmanioses zoonotiques, 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 chiens (Handman, 2001).

En Algérie les leishmanioses sont zoonotiques, ainsi les réservoirs sont présentés par les rongeurs et les chiens (Bachi, 2006).

#### **V.2.4 Cycle évolutif**

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, le Diptère hématophage et un mammifère (Handman, 2001). (Figure n°11). Lorsque le Diptère hématophage femelle infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, elle salive au site de piqûre et régurgite par la même occasion le parasite sous sa forme promastigote métacyclique infestante. Il est alors allongé et très mobile grâce à un flagelle situé en position antérieure. *Leishmania* infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes) du système réticulo-endothélial et se transforme en amastigote. Elle devient ovoïde ou sphérique et n'est plus mobile. S'en suit une multiplication du parasite par fission binaire dans les vacuoles parasitophores dans le cytoplasme du phagocyte. Les parasites ainsi libérés après éclatement du phagocyte infecté sont phagocytés par des cellules avoisinantes où le processus se poursuit (Sacks et Kamhawi, 2001).

Le cycle est complété lorsque le diptère hématophage prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant *Leishmania*. De retour dans le tube digestif de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils sont d'abord au stade procyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes plus allongés et mobiles, appelés nectomonades, commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leur flagelle. À partir de 7 jours, les parasites migrent vers la partie antérieure de l'intestin médian jusqu'à la valve du stomodaeum qui sépare l'intestin médian de l'avant du système digestif. Les nectomonades se transforment alors en haptomonades qui sont plus petits et plus arrondis et en promastigotes métacycliques qui eux, ne se divisent plus, sont plus minces avec un long flagelle et hautement mobiles. C'est cette forme qui est infectieuse pour les mammifères. La valve du stomodaeum se dégrade et permet la migration des métacycliques vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis (Sacks et Kamhawi, 2001).

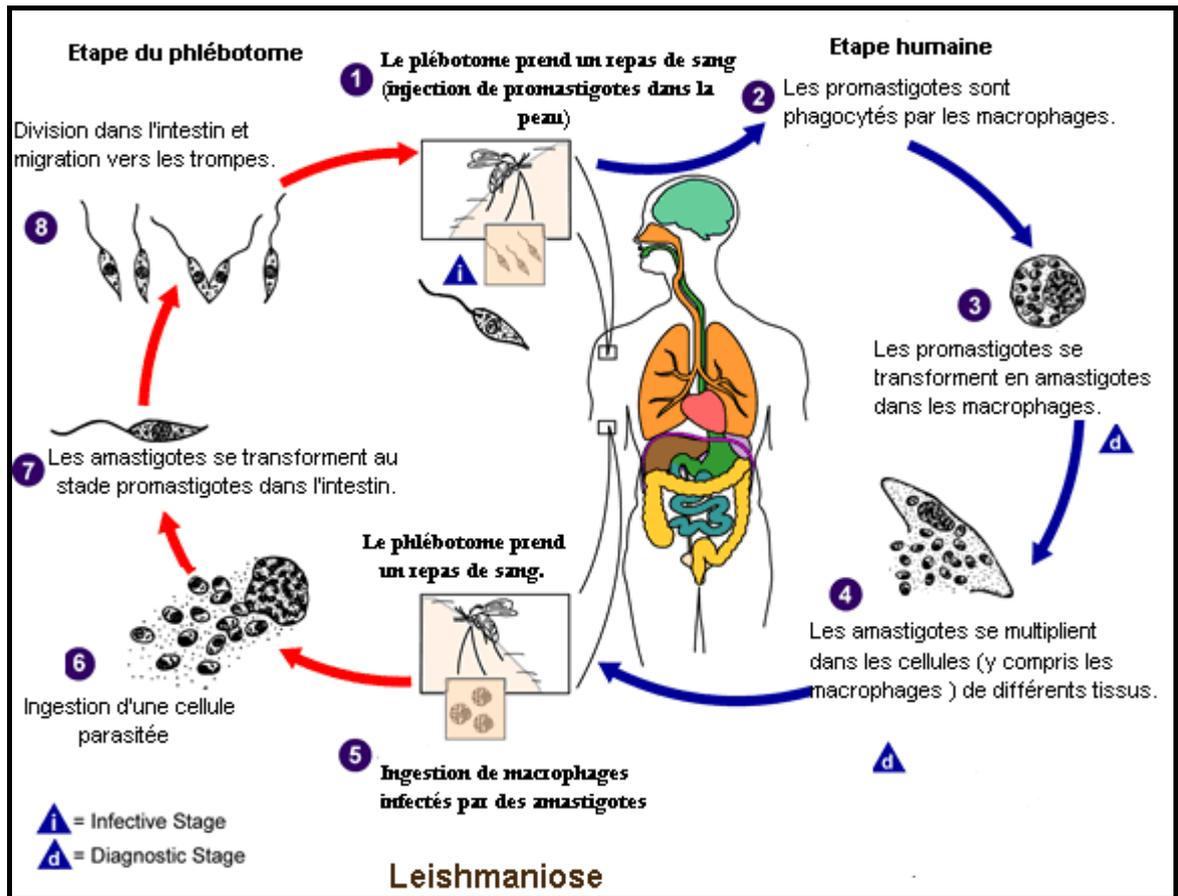


Figure n°11 : Cycle parasitaire des Leishmanioses (Chappuis, 2006).

Les différents stades du parasite *Leishmania* peuvent être identifiés selon leur morphologie ou leur emplacement dans le tube digestif du vecteur mais également selon les molécules qui composent leur surface. Les promastigotes sont recouverts d'un glycocalyx variant entre 7nm chez les procycliques et 17nm pour les métacycliques alors que les amastigotes en sont presque complètement dépourvus (Pimenta et al., 1991). Ce manteau est constitué de composés glycosylés et de protéines ayant tous une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Chez les promastigotes, la molécule de surface la plus abondante est le lipophosphoglycan (LPG). Sa structure varie d'une espèce de *Leishmania* à l'autre mais elle est principalement composée d'unités répétées d'un disaccharide et d'un phosphate suivant l'ancre GPI. Les espèces se différencient par la présence de chaînes latérales de glycanes, ainsi que par la composition et la situation de celles-ci sur la structure de base du LPG. Le LPG de *L. major*, par exemple, est très ramifié alors que celui de *L. donovani* ne l'est pas (McConville et al., 1995).

Cette molécule de surface est très importante dans l'infection des vecteurs hématophages et joue un rôle dans l'interaction avec les macrophages de l'hôte mammifère (Puentes et *al.*, 1990).

La deuxième molécule en importance chez le promastigote est la glycoprotéine gp63. C'est une métalloprotéinase qui requiert la présence de zinc et qui a une grande variété de substrats tels la caséine, la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine et le fibrinogène (McMaster et *al.*, 1994). Elle est environ 10 fois moins abondante que le LPG mais tout comme lui, elle recouvre la surface du parasite. Étant plus petite, la gp63 semble ensevelie sous le LPG (McConville et *al.*, 1995).

Une autre classe de glycolipides ayant une ancre GPI est le phospholipide de glycosylinositol (GIPL). Ces molécules sont 10 fois plus abondantes que le LPG (environ 107) et de petit poids moléculaire (McConville et Ralton, 1997). Ayant une longue demi-vie, elles joueraient un rôle de protection de la surface du promastigote puisque le LPG est éliminé continuellement (Proudfoot et *al.*, 1995).

Il existe également d'autres protéines de surface du parasite comme celles du complexe gp46/PSA-2 qui possèdent une ancre GPI.

Enfin, certaines molécules peuvent être sécrétées par le parasite telles les phosphatases acides et les protéophosphoglycane (PPG). Les phosphatases acides sont des enzymes hydrolytiques qui semblent jouer un rôle dans la résistance du parasite à son hôte de même que dans sa pathogénicité et sa nutrition (Lovelace et *al.*, 1986). Par contre, on ne les retrouve pas chez *L. major* (Lovelace et Gottlieb, 1986).

Pour ce qui est des molécules retrouvées à la surface des amastigotes, on observe deux différences majeures : une diminution marquée de l'expression du LPG (McConville et Ralton, 1997) et une diminution (moindre que celle du LPG) de la gp63 (Schneider et *al.*, 1992).

Les molécules de surface, le **LPG**, la **gp63** et **GIPL** ont été impliquées dans la virulence et la survie du parasite.

Le parasite *Leishmania* évite la réponse immunitaire innée dirigée contre lui en se reproduisant à l'intérieur des macrophages mais également en inhibant plusieurs fonctions de celui-ci qui pourraient lui être néfastes. Buates et Matlashewski ont montré qu'en fait, 37% de 245 gènes du macrophages infectés par *Leishmania* avaient une expression diminuée d'au moins

deux fois en comparaison à l'expression retrouvée chez les macrophages non infectés. L'inhibition des fonctions du macrophage peut s'effectuer par des changements au niveau de l'expression des gènes mais également au niveau post-transcriptionnel et post-traductionnel. On peut séparer ces fonctions en trois grands groupes : les fonctions microbicides, la production de cytokines et la présentation d'antigène et l'activation de cellules effectrices. (Puentes et al., 1990).

### V.2.5 Distribution géographique

Les différentes formes de leishmanioses sont retrouvées dans les régions tropicales et sub-tropicales du globe. On distingue deux grandes situations géographiques, l'Ancien monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-orient et Asie) et le Nouveau monde (Amériques 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*. Par contre, le sous-genre *Viannia* ne se retrouve qu'en Amérique (Handman, 2001) (Tableau II).

**Tableau II:** Distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania* (Handman, 2001)

<b>Espèce</b>	<b>Distribution géographique</b>
<b>leishmaniose cutanée</b>	
<i>L. aethiopica</i>	Éthiopie, Kenya
<i>L. major</i>	Afrique, Moyen-Orient, Asie soviétique
<i>L. mexicana</i>	Amérique centrale et du sud
<i>L. tropica</i>	Europe, Asie et Afrique du Nord
<b>leishmaniose cutaneo-muqueuse</b>	
<i>L. braziliensis</i>	Amérique centrale et du sud
<i>L. peruviana</i>	Amérique du sud
<b>leishmaniose viscérale</b>	
<i>L. chagasi</i>	Amérique du sud
<i>L. donovani</i>	Afrique et Asie
<i>L. infantum</i>	Bassin méditerranéen

### V.2.6 Les Leishmanioses en Algérie

Deux formes de leishmanioses sévissent en Algérie, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée. *Leishmania infantum* zymodème MON-1 est l'agent pathogène le plus fréquemment isolé à partir des LV humaines et de cas canins (Figure n°12).

Des souches appartenant au même complexe, *Leishmania infantum* MON-24 et MON-80 ont été également signalées. Des cas plus rare de LV infantile causés par *Leishmania infantum*

MON-24, principal agent de la leishmaniose cutanée sporadique du nord du pays ont été observées (Figure n°12).

La leishmaniose cutanée du nord est causée par *Leishmania infantum* MON-24 et MON-80. Dans les régions arides et présahariennes, elle est causée par *Leishmania major*, MON-25 (Figure n°12) (Bachi, 2006).

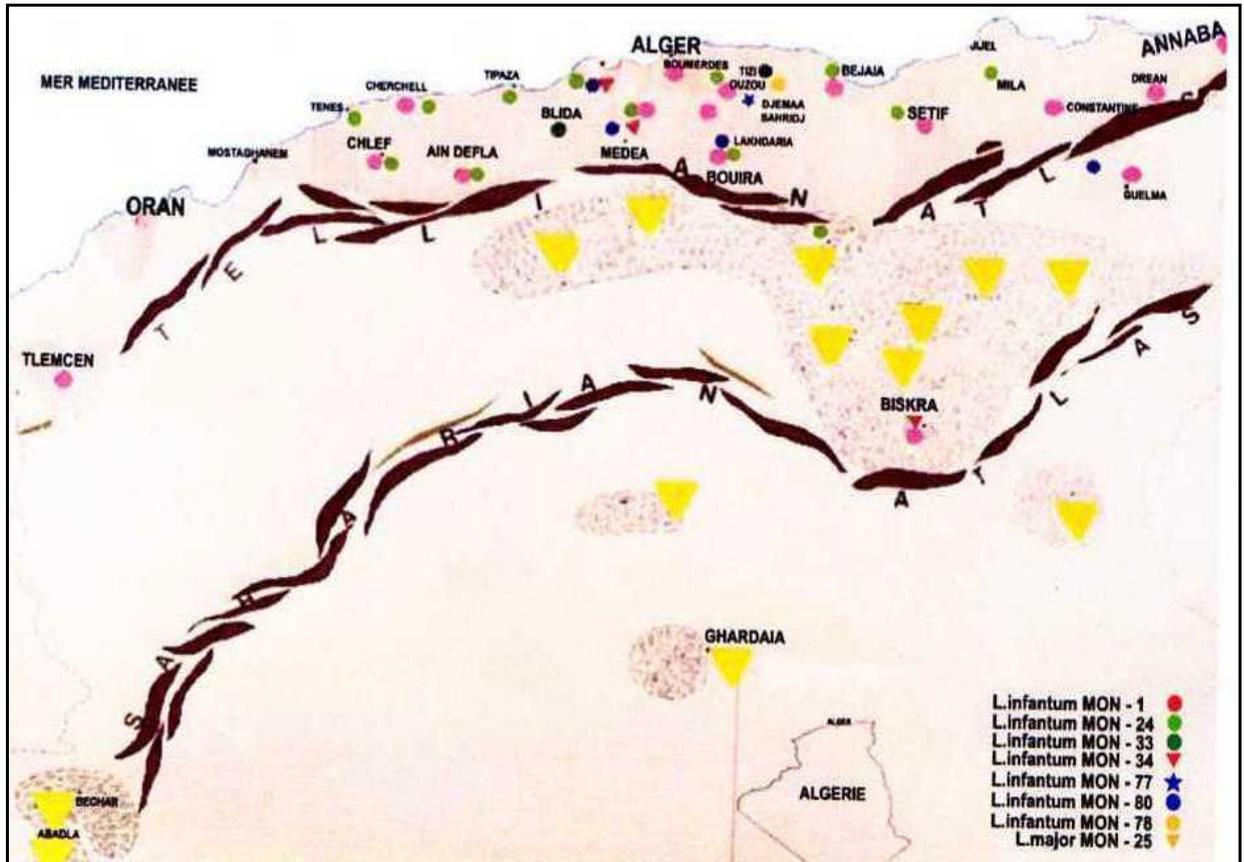


Figure n°12: Répartition géographique de *L. infantum* et de *L. major* en Algérie et localisation des différents zymodèmes (Bachi, 2006).

### V.3 Manifestations cliniques

Il existe quatre formes cliniques de leishmaniose à travers le monde:

- **La leishmaniose viscérale** –appelée également *kala azar*. C’est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l’absence de traitement. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids importante, une hépatosplénomégalie (augmentation du volume de la rate et du foie) et de l’anémie.

- **La leishmaniose cutanée** - la forme la plus répandue qui s'exprime par des lésions ulcero-croûteuse sur le corps et qui guérissent en quelques mois laissant les cicatrices particulièrement inesthétiques.
- **La leishmaniose cutanée diffuse** - cette forme produit des lésions cutanées étendues qui ressemblent à celles de la lèpre et sont particulièrement difficiles à traiter.
- **La leishmaniose cutaneo-muqueuse** - débute avec des ulcérations cutanées qui s'étendent et endommagent certains tissus (en particulier le nez et la bouche) (Sacks et Kamhawi, 2001).

#### V.4 Diagnostic

La confirmation du diagnostic passe par l'identification microscopique des amastigotes à l'intérieur des phagocytes de patients observées sur des frottis cutané (LC, LMC), et de frottis de la moelle osseuse (LV). La culture des échantillons sur milieux appropriés ou l'inoculation à l'hamster doré, permet d'augmenter le nombre des parasites présents car l'identification microscopique n'est pas toujours facile. La sérologie (l'utilisation des arguments immunologiques) est très sensible dans les formes viscérales. Les techniques d'amplification génique prennent une place de plus en plus importante (ANOFEL, 2005).

#### V.5 Traitements

Dans la majorité des cas, les différentes formes de leishmanioses sont traitées à l'aide de deux molécules couramment utilisées les dérivés de l'antimoine : l'antimoniote de méglumine (Glucantime®; Aventis Pasteur) et l'antimoine pentavalent tel le stibogluconate de sodium (Pentostam®; Burroughs Wellcome). Ceux-ci sont administrés par injections intramusculaires ou intraveineuses. Ces traitements ont plusieurs inconvénients. Ils nécessitent une hospitalisation de plusieurs semaines et ont des effets secondaires marqués (Guerin et *al.*, 2002). Mais le problème majeur de ces médicaments est l'émergence grandissante de souches de parasites résistants. En effet, dans la province de Bihar en Inde, où la leishmaniose viscérale est endémique, 65% des nouveaux cas d'infection sont dus à ces souches résistants (Sundar, 2001). Dans le Nouveau Monde, on dénote également des résistances pour les leishmanioses cutanées et mucocutanées (Grogl et *al.*, 1992).

Pour pallier aux échecs de traitement de la leishmaniose cutané au Pérou, un groupe d'étude a testé un immunomodulateur, l'Imiquimod utilisé actuellement contre les verrues génitales causées par des papillomavirus. Il est appliqué sous forme de crème sur l'ulcère

accompagné d'injections d'antimoine. Il semble que cette combinaison de traitements soit efficace chez les patients qui n'avaient pas répondu à un premier traitement à l'antimoine seul (Arevalo *et al.*, 2001). Dans la forme viscérale et en cas de résistance, on a généralement recours à l'Amphotéricine B comme traitement. Elle est très efficace (97% de guérison) et aucune résistance n'a encore été rapportée (Thakur *et al.*, 1996). Elle est par contre plus coûteuse que les traitements à l'antimoine et les effets secondaires sont importants. Pour diminuer cette toxicité, certaines formulations lipidiques d'Amphotéricine B ont été élaborées, soit les liposomes, dispersions colloïdales ou complexes lipidiques. Les liposomes sont les plus efficaces et les moins toxiques mais les coûts extrêmement élevés de l'ensemble de ces produits ne permet pas leur usage dans les pays en voie de développement (Guerin *et al.*, 2002).

Enfin, la Miltefosine (Impavido®), un nouveau médicament pour traiter la leishmaniose viscérale et cutanée. Elle a été produite à la base comme traitement anti-cancéreux, et présente le grand avantage d'être administrée oralement. On a observé des taux de guérison de 98% avec des effets secondaires négligeables (Ganguly, 2002). La Paromomycine, un antibiotique avec des effets anti- *Leishmania* (Thakur *et al.*, 2000), semble efficace et bien tolérée mais doit être administrée de façon parentérale. Il est concédé comme médicament orphelin en octobre 2006 (Chappuis *et al.*, 2006).

## **V.6 Vaccins et prophylaxie**

Le fait que la guérison de la leishmaniose cutanée induit une immunité à vie chez les individus touchés incite au développement d'un vaccin prophylactique. malgré plusieurs études à ce sujet, il n'existe toujours pas de vaccin contre la leishmaniose (Greenblatt, 1980; Kellina, 1981 ;Modabber, 1995; Serebryakov *et al.*, 1972 ; Handman, 2001 ; Handman *et al.*, 1983; Rivier *et al.*, 1993 ;Titus *et al.*, 1995 ; Rivier *et al.*, 1999. ;Russo *et al.*, 1991 ; Belkaid *et al.*, 1998; Kamhawi *et al.*, 2000). Par ailleurs, un vaccin contre la leishmaniose canine est en cour d'évaluation (Loup, 2006).

# Partie II:

# Partie Experimentale

*Chapitre I*  
*Matériel et méthodes*

## I Matériel et méthodes

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire des sciences fondamentales de l'université de Laghouat et du service biologie parasitaire, unité leishmaniose de l'institut Pasteur d'Algérie.

### I.1 Matériel

#### I.1.1 Matériel et équipements

La liste de verrerie, équipement et autres est donnée dans l'annexe.

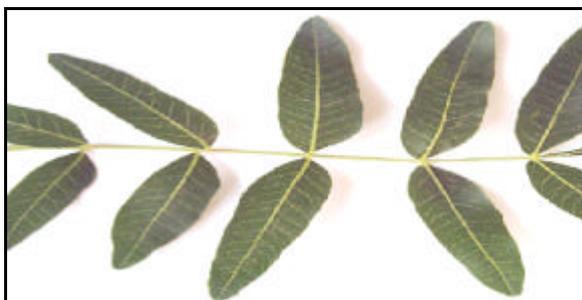
#### I.1.2 Matériel végétal

Le présent travail concernera le Pistachier d'Atlas (Anacardiaceae) de l'Algérie. L'arbre existe à l'état disséminé, il est associé au Jujubier (*Ziziphus lotus* ; *cedra* en arabe local), famille des Rhamnaceae, qui forme une brousse dégradée sous le pistachier de l'Atlas (Belhadj, 2003).

Le Pistachier d'Atlas est un arbuste de 3 à 5 m (voir figure n°13), à rameaux rougeâtres et à odeur résineuse, ses feuilles sont composées imparipennées, de 7 à 11 folioles ovales-lancéolées, glabres, à rachis finement ailé (figure n°14), il présente des inflorescences en grappes lâches. Le fruit de Pistachier d'Atlas est globuleux, petits rouge-brun et renferme une graine verte. Les fruits sont appelés *ElKhodiri* par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur verte foncée à maturité (figure n°15).



**Figure n°13:** Arbre du Pistachier d'Atlas.



**Figure n°14:** Feuilles du Pistachier de l'Atlas.



**Figure n°15:** Fruits du Pistachier de l'Atlas.

### **I.1.2.1 Lieu et climat de régions de la collecte des échantillons**

La récolte du matériel végétal a été effectuée au cours du mois d'août 2006 (le matin) au niveau de deux régions :

1- la région de Telghimt de la wilaya de Laghouat (100Km au sud de Laghouat) qui est caractérisée par un climat aride.

2- la région de Ain Oussera de la wilaya de Djelfa (100Km au nord de Djelfa) qui est caractérisée par un climat semi- aride.

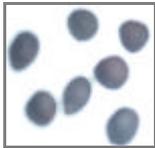
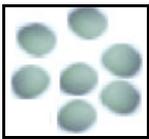
Il faut noter que les populations de pistachier d'Atlas à Ain Oussera sont naines par rapport à celle de Laghouat, et leurs feuilles ont une couleur verte plus foncée.

### **I.1.2.2 Echantillonnage**

Nous avons pris trois individus de chaque région dont deux sont des pieds femelles et le troisième est un pied mâle.

Nous nous intéressons dans notre étude à deux parties de l'arbre : les feuilles et les fruits. Le tableau III regroupe les caractéristiques de distinction entre les individus ainsi la description de leurs échantillons de feuilles et de fruits.

**Tableau III:** Caractéristiques de distinction les échantillons de *Pistacia atlantica Desf* étudiés

Individu	Age l'arbre	Description des échantillons étudiés	
		Echantillons de feuilles	Echantillons de graines
P <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	Moyen	Ovales acuminés glabres, épaisses. Couleur verte (vert marin) 	Fruit globuleux, mature noire prune (Ø : 0,6mm) 
P <sub>1</sub> F <sub>2</sub>	Moyen	Ovales acuminés glabres, épaisses. Couleur verte (vert marin) 	Fruit globuleux, mature vert (Ø : 0,5mm) 
P <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	Moyen	Ovales acuminés glabres, larges couleur verte (vert foncé) 	Fruit globuleux, mature vert (Ø : 0,5mm) 
P <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	Jeune	Ovales acuminés glabres, larges couleur verte (vert foncé) 	Fruit globuleux, mature (1) vert (Ø : 0,5mm)  Fruit globuleux, immature (2) Jaune (Ø : 0,5mm) 
P <sub>1</sub> M	Moyen	ovales acuminés glabres larges couleur verte (vert foncé) 	/
P <sub>2</sub> M	Moyen	ovales acuminés glabres larges couleur verte (vert foncé) 	/

**P 1** : pied de Laghouat (région1)

**P 2**: pied de Ain Oussera (région2)

**F1** : femelle N° 1

**F2** : femelle N° 2

**M** : mâle

Le code attribué aux fruits matures de P<sub>2</sub>F<sub>2</sub> est **P2F2-1** ; et **P2F2-2** pour le fruit immature.

On a codé les polyphénols des feuilles par **Pf** ainsi ceux des fruits (graines) par **pg** et les lipides par **L** (uniquement pour les graines).

### **I.1.3 Matériel Biologique**

-**Sang humain** : prélevé sur anticoagulant EDTA (pour le test d'hémolyse).

-**Parasites** : Les souches faisant l'objet de notre étude nous ont été fournies par l'unité leishmaniose, du service biologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie. Nous avons utilisé deux souches.

1) La LIPA114 :(MHOM/DZ/83/LIPA114), souche de référence du genre *Leishmania infantum* typée à Montpellier.

2) une souche de genre *Leishmania major* (souche non typée), isolée à partir d'un prélèvement positif de leishmaniose cutanée, par l'unité leishmaniose de l'institut Pasteur d'Algérie.

- **Milieux de cultures** : Pour notre étude deux milieux de culture ont été utilisés

-Milieu NNN (Nicolle Mac Neal Novy, 1904).

- Milieu **RPMI** (Roswell Park Memorial Park Institut).

### **I.2 Méthodes**

Notre étude a été surtout guidée par deux idées majeures:

1-La comparaison entre les différents échantillons de *Pistacia atlantica* (de deux régions différentes) selon deux paramètres :

- Teneur en : composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes), et en lipides (tocophérols totaux ; stérols totaux).

- Activité antioxydante des différents extraits

2- Etudie les propriétés biologiques des extraits, dans l'optique de découvrir de nouvelles molécules possédant une activité antileishmanienne.

Notre démarche expérimentale est résumée à travers le diagramme comme suit (figure n°16).

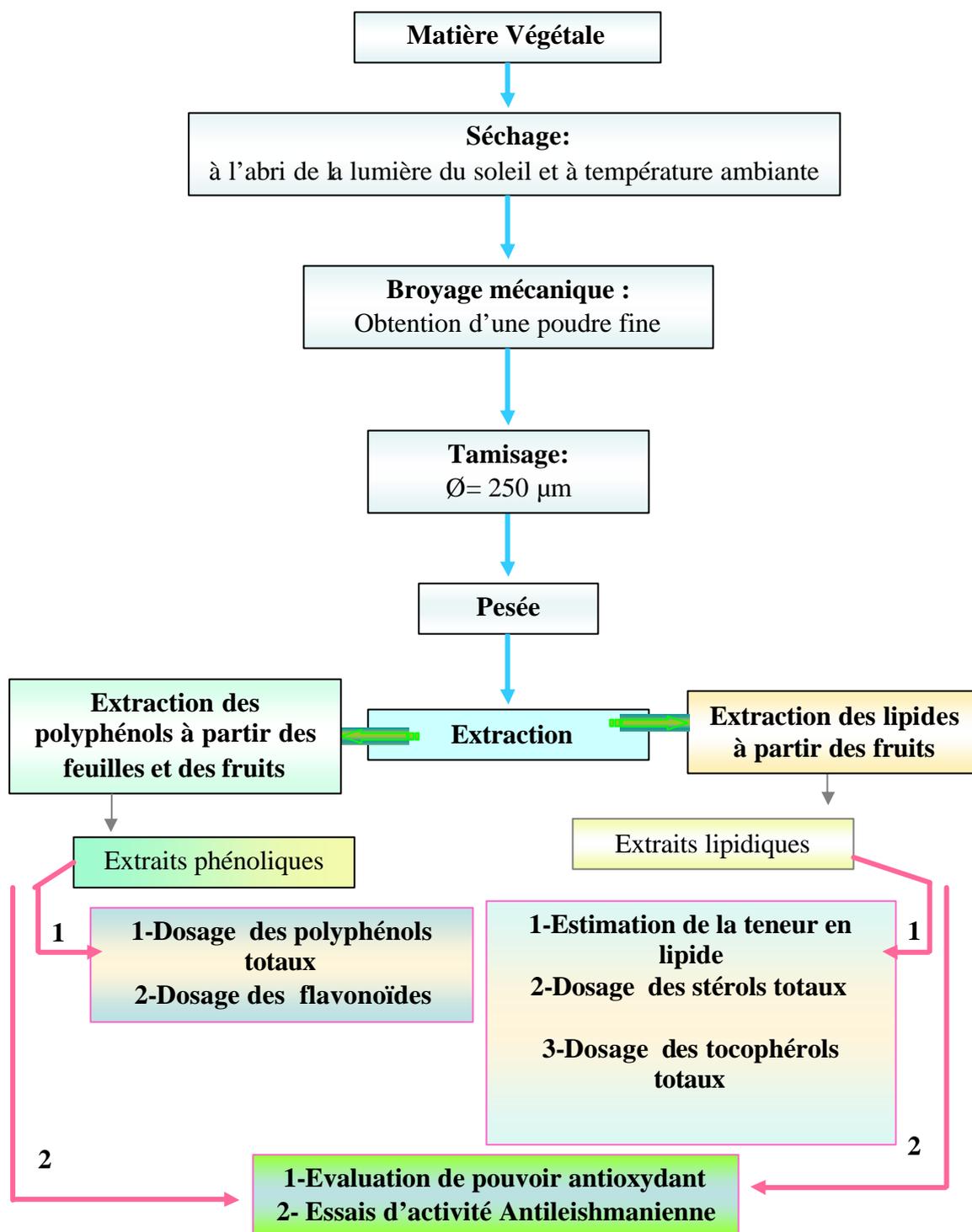


Figure n°16: Représentation schématique des étapes de l'étude réalisée.

## I.2 Extraction et analyse quantitative

### I .2.1 Extraction

#### I.2.1.1 Méthode d'extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction utilisée pour les composés phénoliques est celle de Amiot (Hertog et *al.*, 1992) modifiée (Djeridane et *al.*, 2006). L'objectif de l'étape de l'extraction est de séparer les substances phénoliques de la poudre solide et de les faire passer en solution. Elle est réalisée en trois étapes:

##### 1/Extraction des composés phénoliques

Les échantillons déjà séchés à l'abri de la lumière et à température ambiante, sont finement broyées et tamisée ( $\varnothing = 250 \mu\text{m}$ ). 5g de la poudre ainsi obtenue est ensuite macérée dans 100 ml d'un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau) (80/20 : V/V) pendant 48 heures à température ambiante. L'extrait est filtré, et le résidu obtenu est repris pour une deuxième fois avec un volume de 50 ml du même mélange hydro-alcoolique pendant 24 heures à température ambiante. On obtient donc l'extrait hydro-alcoolique brut.

##### 2/Dépigmentation

On évapore le méthanol sous pression réduite à 40°C. La phase aqueuse est lavée plusieurs fois avec demi volume d'éther de pétrole jusqu'à l'épuisement des pigments.

##### 3/Purification des composés phénoliques

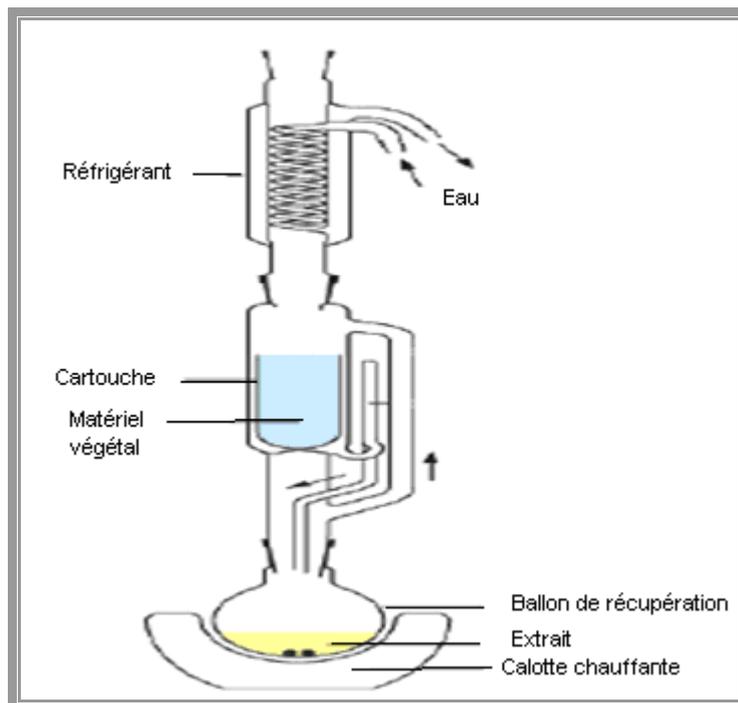
La phase aqueuse est ensuite extraite trois fois à l'acétate d'éthyle, après adjonction des solutions aqueuses de 20 % de sulfate d'ammonium et 2% d'acide ortho-phosphorique qui facilitent le passage des composés phénoliques dans la phase organique. Les extraits organiques sont regroupés et séchés en ajoutant une quantité suffisante du sulfate de sodium anhydre. L'extrait est alors évaporé sous pression réduite à 40°C. Le résidu est repris par 5 ml de méthanol et filtrer à travers un filtre de 0,22 $\mu\text{m}$  donnant ainsi l'extrait phénolique purifié qui est conservé à une température de 6°C jusqu'à utilisation.

**N B** : Il faut noter que pour les fruits l'opération est réalisée après l'extraction des lipides, sur les tourteaux delipidé.

### I.2.1.2 Méthode d'extraction des lipides

Afin d'extraire et de déterminer la teneur en matières grasses de nos échantillons, nous avons choisie la méthode tourteaux (NF ISO 734-1 NF ISO 734-2) (AFNOR, 1984) Cette méthode est basée sur l'extraction solide liquide par Soxhlet. En utilisant l'hexane comme phase liquide, pendant 8 heures.

L'extracteur de Soxhlet permet le traitement de solides (matériel végétal) avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (Figure n°17).



**Figure n°17** Système d'extraction au Soxhlet.

Les extraits sont desséchés par une quantité suffisante de sulfate de sodium anhydre. Après, filtration, Le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C. L'extrait obtenu est un extrait lipidique brut (huile).

Chaque extrait est pesé et nous avons calculé la teneur en huile de chaque échantillon à l'aide de la relation (1).

$$\text{Teneur en huiles} = \frac{\text{Masse de l'extrait} \times 100}{\text{Masse de la prise d'essai (matière végétale)}} \quad (1)$$

## I.2.2 Analyse Quantitative

### I.2.2.1 Analyse Quantitative des composés phénoliques

#### I.2.2.1.1 Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de folin –Ciocalteu (Marian et *al.*, 2004). Le réactif est formé d'acide phosphotungstique  $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_4$ , qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_3$ ), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm.

#### -Procédure expérimentale

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations. 100  $\mu\text{l}$  de chaque solution ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 $\mu\text{l}$  du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau distillée). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium à 20% ont été ajoutés, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc (même Solution précédente à l'exception de l'extrait phénolique : acide gallique) sur un spectrophotomètre.

Les lectures de la densité optique à 760 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée par la même procédure.

#### I.2.2.1.2 Dosage de flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen et al (Ki Won et *al.*, 1996) basée sur la complexation des flavonoïdes par l'Aluminium en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif dans cette méthode.

### **-Procédure expérimentale**

La rutine a été utilisée comme étalon. Pour tracer la courbe d'étalonnage, des solutions de la rutine à différentes concentrations ont été préparées. 1 ml de chaque solution ainsi préparée est mis dans une fiole de 10 ml qui contient 4ml d'H<sub>2</sub>O. A un temps 0 on ajoute 0,3 ml de NaNO<sub>2</sub> (5%) ; après 5 min on ajoute 0,3 ml de AlCl<sub>3</sub> (10%) en suite 2 mL de NaOH (1 M) est ajouté. al fin on complète le volume jusqu'a 10ml et on mélange. Le mélange donne une couleur rose déterminé à une longueur d'onde égale à 510 nm.

En utilisant les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues, on trace la courbe d'étalonnage de la rutine. La quantification des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée en suivant le même protocole décrit l'ors de la préparation de la courbe d'étalonnage de la rutine.

## **I.2.2.2 Analyse Quantitative des fractions minoritaires des lipides**

### **I.2.2.2.1 Dosage des stérols totaux**

Il s'agit d'un dosage spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard (Sonntag, 1979 ; Barreto et Carmo, 2005) basé sur une réaction colorée spécifique des 3 β-hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm.

### **-Procédure expérimentale**

A partir des solutions chloroformiques de cholestérol à différentes concentrations, nous avons tracé une courbe d'étalonnage du cholestérol. On prend 4ml de chaque solution et on ajoute 2 ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développe et se stabilise pendant 25 minutes à l'obscurité. En mesurant l'absorbance à 550 nm de chaque solution, nous obtenons la courbe liant la densité optique en fonction de la concentration.

Nous avons effectué le dosage sur l'huile brute. Les échantillons d'huiles sont traités de la même manière.

### **I.2.2.2 Dosage des tocophérols totaux**

Nous avons employé le dosage colorimétrique d'Emmerie-Engel (Emmerie-Engel, 1939). On utilise les propriétés réductrices des tocophérol qui, en solution alcoolique, réduisent le fer ferrique en fer ferreux; ces derniers sont complexé par l'onthrophénantroline, on donnent un complexe rouge -orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510nm est élevé.

### **-Procédure expérimentale**

Une droite étalon tracée à partir d'a-tocophérol commercial (vitamine E), permet de relier la densité optique et la concentration en tocophérols. A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans le benzène des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 2 ml de chaque solution plus 1 ml de réactif (phenantroline) et 0.5ml  $F_6C_3$ . Le mélange est complété à 10 ml par de l'éthanol. Après 3min on mesure l'absorbance à 510nm. Nous obtenons la courbe suivante.

Nous avons effectué le dosage sur l'huile brute. Les échantillons d'huiles sont traités de la même manière.

### **I.3 Evaluation de pouvoir antioxydant des extraits de *Pistacia atlantica***

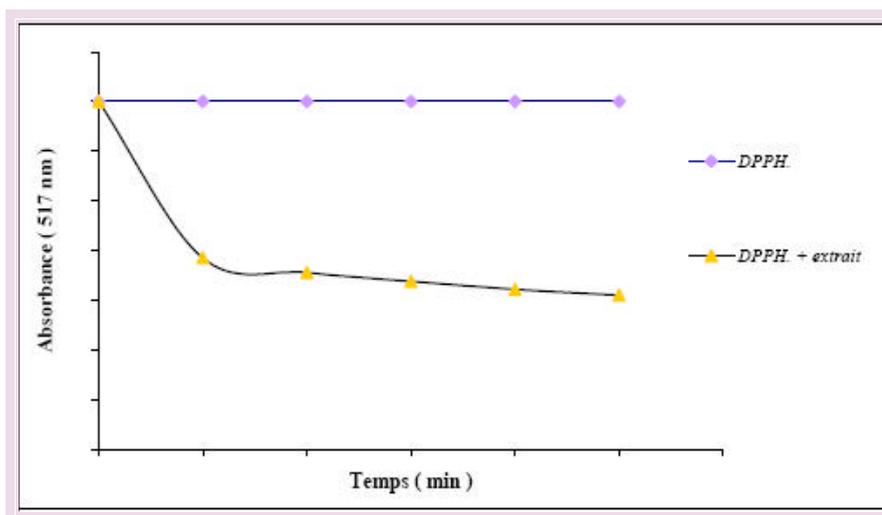
La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques, a été réalisé par deux tests in vitro, un test chimique et l'autre biologique. Dans le test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage d'un radical libre par les fractions antioxydantes en employant le 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Tandis que, dans le test biologique, nous avons adopté une technique d'évaluation de l'état de défense des substances phénoliques vis-à-vis de l'intégrité des cellules sanguines induit par un générateur des radicaux libres (AAPH).

N B : Dans le cas des lipides nous avons employé le test DPPH uniquement.

#### **I.3.1 Application du test chimique (Test du DPPH•)**

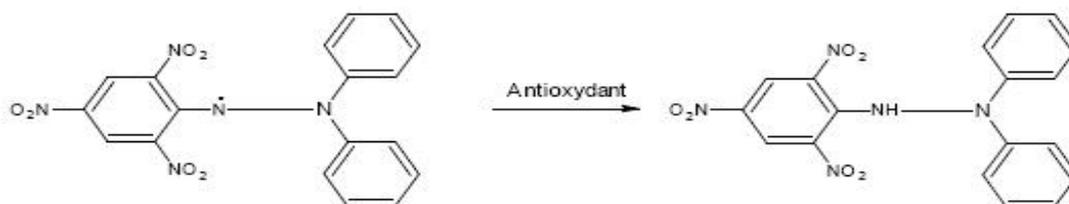
##### **-Principe**

La réduction du radical libre DPPH• par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits phénoliques (Figure n°18).



**Figure n°18:** Courbes représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH (Maamri et Djireb, 2005).

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure n°19). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques de nos extraits (Molyneux, 2004).



**Figure n°19:** Réduction du radical libre DPPH (Molyneux, 2004).

### -Procédure expérimentale

1ml de chaque extrait phénolique dilué dans le tampon Tris (100 mM, pH=7.4) est additionné à 1ml d'une solution de DPPH• (250µM) préparé dans le méthanol. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc.

Les mesures de la diminution de l'absorbance du DPPH provoquées par la présence des extraits après 30 minutes ont permis de déterminer le pouvoir antioxydant de différents extraits.

Le pouvoir d'inhibition (PI) a été exprimé en présence de différentes dilutions (PI% en fonction de la concentration après 30min d'incubation à température ambiante à l'obscurité). Les dilutions ont été effectuées de sorte que le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de ces tracés soit supérieur à 0,9. Le pouvoir d'inhibition est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$PI (\%) = [1 - (A_{\text{extrais}} / A_{\text{témoin}})] * 100$$

**PI (%)** : pouvoir d'inhibition en %.

**A<sub>extrais</sub>** : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait.

**A<sub>témoin</sub>** : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait.

N B : Dans le cas des extraits lipidiques, les dilutions d'huiles ont été effectuées dans le DMSO.

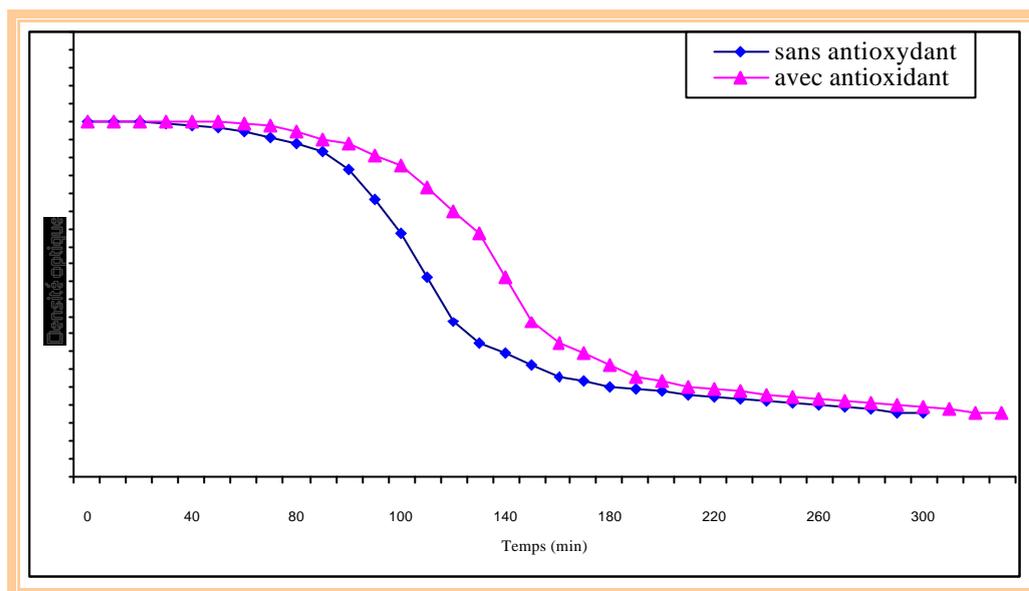
### **I.3.1 Application du Test biologique (test d'hémolyse)**

#### **Principe**

Ce test permet de suivre l'évolution positive ou négative d'une prescription, sur l'état de défense de l'individu vis-à-vis des radicaux libres. Le principe de ce test consiste à soumettre à une agression oxydante (production contrôlée des radicaux libres) un échantillon de sang ou une suspension d'hématies. Ainsi les érythrocytes mettent en jeu tout leur équipement enzymatique et moléculaire pour résister à cette agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu (Lesgard, 2000). Les cellules utilisées sont d'origine humaine.

La lyse des cellules sanguines est induite par un générateur des radicaux libres le dichlorate de 2,2' azobis (2-amidinopropane) (AAPH). Le AAPH se décompose thermiquement et unimoléculairement puis réagit rapidement avec l'oxygène pour emporter les radicaux peroxydes capables d'enlever l'hydrogène des lipides de membrane plasmique (Frei *et al.*, 1990).

Les lectures spectrophotométriques successives permettent de mesurer les variations de turbidité du milieu réactionnel au cours du temps (Figure n°20).



**Figure n°20:** Variation de la densité optique du milieu réactionnel en fonction du temps (Test d'hémolyse) (Lesgard, 2000).

### -Procédure expérimentale

Pour réaliser ce test, le sang est récupéré sur anticoagulant EDTA. Le sang est dilué 50 fois dans l'eau physiologique. La réaction a lieu dans des tubes à hémolyse où 1 ml de la solution de sang a été mélangé avec 0,85 ml d'une solution d'AAPH (20mg/ml), et 0,85 ml de l'extrait phénolique de concentration finale de  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  mol/l. Après homogénéisation, le milieu réactionnel est placé dans un bain marie à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  permettant au générateur de produire les radicaux libres à un temps précis. Après 3 heures d'incubation on évalue la variation de la densité optique due à l'hémoglobine relarguée dans le milieu. La longueur d'onde du spectrophotomètre est fixée à 450 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle.

Le test d'hémolyse a été réalisé pour les extraits phénoliques et pour l'acide ascorbique choisi comme antioxydant de référence.

Les résultats du test d'hémolyse sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la lyse des globules rouge après 3 heures. Le pouvoir d'inhibition a été calculé à partir de la relation suivante :

$$\text{PI (\%)} = [1 - (A_{\text{Extrait}}/A_{\text{AAPH}})] * 100$$

**PI (%) :** pouvoir d'inhibition en %

**A<sub>extrait</sub> :** absorbance de milieu réactionnelle en présence de l'extrait

**A<sub>AAPH</sub> :** absorbance de milieu réactionnelle en absence de l'extrait

## **I.4 Etude de l'activité antileishmanienne des extraits de *Pistacia atlantica***

### **I.4.1 Préparation des milieux de cultures**

#### **I.4.1.1 Milieu NNN**

Le milieu NNN est composé de 6g de NaCl et de 10 g de bacto-agar dissous dans 1000ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition jusqu'à dissolution, la gélose préparée est répartie dans des tubes stériles à raison de 7ml par tube. Après stérilisation à l'autoclave à 1,1 bar, 120°C pendant 20 minutes, le sang de lapin préalablement chauffé à 56°C pendant 30 minutes et additionnée d'antibiotique (la pénicilline 1000 UI/ml et la streptomycine 100µg/ml) est mélangée avec la gélose à raison de 1ml / tube. Les tubes sont laissés en position inclinée pendant 24 heures à température ambiante. Après formation d'exsudat, les tubes sont conservés à 4°C.

#### **I.4.1.2 Milieu RPMI**

Nous avons dissous 26,8g de milieu de base lyophilisée **RPMI 1640** dans l'eau distillé stérile (800ml) auquel, on ajoute le sérum de veau foetal 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 UI/ml et la streptomycine 100µg/ml). Le volume final est complété à 1 litre. On ajuste le pH de milieu à 7,2 (pH optimal pour la croissance de leishmanie), la stérilisation de milieu se fait par filtration sur un filtre de porosité 0,22µm.

### **I.4.2 Culture parasitaire**

#### **I.4.2.1 Culture sur milieu NNN**

La culture des leishmanies in vitro sur milieu NNN sert à l'entretien des souches étudiées, Le parasite se multiplie sous la forme flagellée promastigote. La prolifération sur NNN nécessite de 5 à 7 jours d'incubation à 25°C d'où la nécessité de les repiquer à nouveau sur NNN neuf après vérification des cultures chaque semaine.

#### **I.4.2.2 Evaluation de l'activité antileishmanienne in vitro (culture sur milieu RPMI)**

Elle se fait sur des leishmanies en culture sur milieu RPMI 1640.

On s'est limité aux extraits des échantillons de trois individus de l'ensemble de *Pistacia atlantica*, qui sont choisis en fonction du sexe et de la couleur du fruit pour les femelles. Nous avons testé l'activité antileishmanienne de 9 extraits dont 6 sont des extraits phénoliques et 3 sont des extraits lipidiques (Tableau IV):

**Tableau IV:** Les extraits testés sur les leishmanies

Individu	Extraits polyphénols		extraits lipides
	Echantillons de feuilles	Echantillons de fruit	Echantillons de fruits
P <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> F <sub>1pf</sub>	P <sub>1</sub> F <sub>1pg</sub>	P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub>
P <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>2pf</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>2-1pg</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>2-1L</sub>
		P <sub>2</sub> F <sub>2-2pg</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>2-2L</sub>
P <sub>2</sub> M	P <sub>2</sub> M <sub>pf</sub>		

L'inoculum primaire des deux souches est préparé dans des tubes Falcon à partir des souches conservées sur NNN. On ajuste l'inoculum à une concentration finale de]  $10^6$  à  $2,5 \cdot 10^6$  [leishmanie/ ml. L'inoculum est répartie dans les puits des plaques de cultures cellulaires (24 puits par plaque) à raison de 1 ml par puit, ou on a déjà introduit différentes concentrations des extraits phénoliques 2µg, 4µg, 10µg, 20µg et 50µg puis 100µg, 150µg et 200µg pour *L. infantum* ; 2µg, 4µg, 10µg, 20µg et 50µg puis 75µg 100µg pour *L. major*, et les extraits lipidiques aux concentrations de 50µg, 75µg, 100µg et 150µg pour les deux souches.

Les dilutions des extraits polyphénoliques ont été préparées dans l'eau distillée et celle des lipides dans le DMSO.

La culture des leishmanies est très sensible surtout dans le cas de contamination, pour cela les préparations du matériels, outils de culture, milieux de culture, et les dilutions des extraits, s'opèrent dans des conditions aseptiques, dans une hôte chimique propre désinfecté par rayon UV, dans une chambre fermée spéciale.

Les tests ont été réalisés en double pour chaque concentration et pour chaque souche, et refaits 3 fois pour évaluer la reproductibilité.

Les numérations des promastigotes ont été effectuées quotidiennement sur cellule de malassez après fixation des formes promastigotes par le formol.

# *Chapitre II*

## *Résultats et discussion*

## II Résultats et discussion

### II.1 Résultats de l'analyse quantitative

#### II.1.1 Analyse quantitative des composés phénoliques

Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect d'une poudre de couleur verte pour les extraits des feuilles, et un aspect pâteux de couleur miel pour les fruits à l'exception de l'extrait de fruits mature P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub> qui a une couleur rouge brique.

##### II.1.1.1 Taux des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (annexe I), et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.

Tableau V: Teneur en phénols totaux des différents échantillons

Extrait des échantillons des feuilles		Extrait des échantillons des Fruits	
échantillon	Teneur en phénols totaux mg/g	échantillon	Teneur en phénols totaux mg/g
P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> pf	48,92 ± 0.04	P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> pg	5,93 ± 0.08
P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> pf	54,27 ± 0.01	P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> pg	5,42 ± 0.02
P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> pf	104,46 ± 0.02	P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> pg	5,89 ± 0.04
P <sub>2</sub> F <sub>2</sub> pf	44,12 ± 0.03	P <sub>2</sub> F <sub>2-1</sub> pg	20,73 ± 0.02
P <sub>1</sub> M <sub>1</sub> pf	71,74 ± 0.05	P <sub>2</sub> F <sub>2-2</sub> pg	13,92 ± 0.03
P <sub>2</sub> M <sub>1</sub> pf	92,50 ± 0.05		

On remarque d'après les résultats du tableau ci dessus que la quantité des composés phénoliques dans les extraits des feuilles est importante par rapport à celle des extraits des fruits. Comparativement à d'autres travaux sur des plantes médicinales locales déjà étudiées, tel que la Sauge vervienne (7,2 ± 0.04 mg/g) et l'Astéroïde (2,77 ± 0.03) (Maamri et Djireb, 2005 ; Yousfi et *al.*, 2006), on peut dire que les extraits des feuilles de *Pistacia atlantica* constituent une source prometteuse en composés phénoliques.

Du point de vue comparative, les pieds de *Pistacia atlantica* de Ain Oussera sont plus riches en composés phénoliques que ceux de Laghouat surtout les feuilles à l'exception de l'échantillon P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>pf qui contient une quantité minimale de l'ordre de 44.12mg/g devant les deux autres échantillons de la même région. Cette différence importante est peut-être due à l'âge de ce pied qui est le plus jeune de la population.

D'autre part, la variation de la teneur en polyphénols totaux entre les différents individus est importante. Pour les extraits des feuilles des femelles cette variation présente un étendu de 60.34 mg/g (on remarque que la valeur maximale et la valeur minimale représentent deux individus de la même région<sup>2</sup>, mais l'étendu réel d'individus de la région 1 est 5.35 mg/g). Cependant cette dernière est moins importante pour les fruits, avec un étendu de 15.31 mg/g, mais on remarque que trois individus (femelles) présentent des valeurs très proches 5,.. mg/g à l'exception de la quatrième femelle P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, qui est représentée par deux types de fruits, matures et immatures dont les teneurs sont respectivement 20.73mg/g et 13.92mg/g.

Par ailleurs, en ce qui concerne les extraits des feuilles des pieds mâles, la variation est importante l'étendu est de 20.76 mg/g. En plus, la quantité de polyphénols est supérieure à celle des extraits des feuilles des pieds femelles à l'exception de celui de P<sub>2</sub>F<sub>1</sub>pf.

D'avantage, si on compare nos résultats par rapport aux travaux antérieurs (Yousfi et *al.*, 2008), on remarque que les teneurs d'extrait hydro-alcoolique (méthanol-eau ; 80/20) sont de même ordre de grandeur, notamment dans le cas des extraits des fruits (33 mg/g pour feuilles et 5,84 mg/g pour les fruits pour un pied récolté de Laghouat).

### II.1.1.2 Taux des flavonoïdes

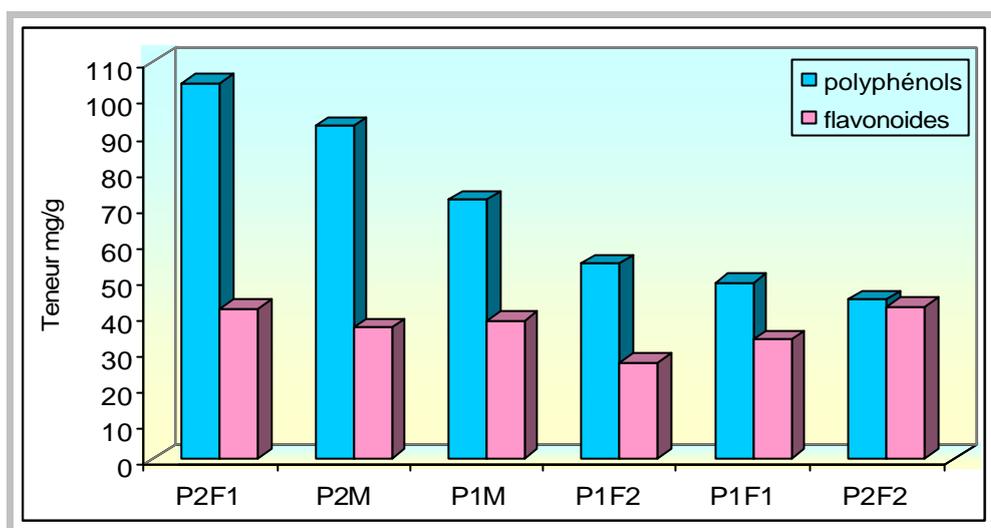
La quantité des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine (annexe I). Les résultats obtenus exprimés en milligrammes par gramme de la matière sèche en équivalent de la rutine, ainsi que le taux en flavonoïdes par rapport aux teneurs en phénols totaux, sont regroupés dans le tableau VI.

**Tableau VI:** Teneur en flavonoïdes totaux de différents échantillons

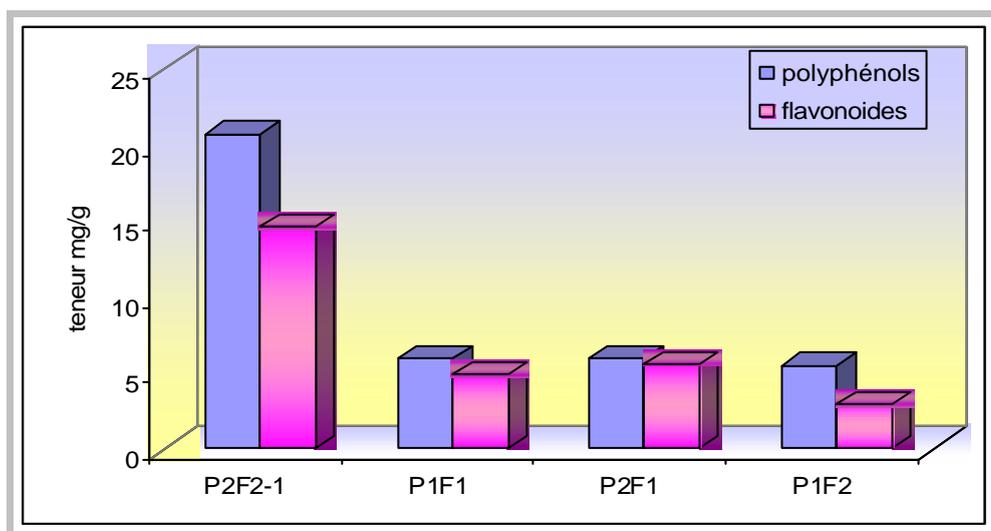
Extrait des échantillons des Feuilles			Extrait des échantillons des Fruits		
échantillon	Teneur en flavonoïdes mg/g	Taux des flavonoïdes %	échantillon	Teneur en flavonoïdes mg/g	Taux des flavonoïdes %
P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> pf	33,38 ± 0.01	68,22	P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> pg	4,85 ± 0.06	81,86
P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> pf	26,50 ± 0.04	48,83	P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> pg	2,94 ± 0.01	54,19
P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> pf	41,72 ± 0.02	39,94	P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> pg	5,57 ± 0.04	94,48
P <sub>2</sub> F <sub>2</sub> pf	42,05 ± 0.02	95,30	P <sub>2</sub> F <sub>2-1</sub> pg	14,57 ± 0.05	70,25
P <sub>1</sub> M <sub>1</sub> pf	38,29 ± 0.07	53,37	P <sub>2</sub> F <sub>2-2</sub> pg	10,02 ± 0.02	72,00
P <sub>2</sub> M <sub>1</sub> pf	36,49 ± 0.04	39,44			

Les pieds de *Pistacia atlantica* de Ain Oussera sont plus riches en flavonoïdes pour les deux parties de la plante (feuilles, fruits) que ceux de Laghouat dans le cas des femelles. Les feuilles des pieds males sont moins riches en flavonoïdes pour les deux régions et sont à la même concentration.

Dans un souci de simplifier, les différents individus ont été classés par ordre décroissant en teneur des composés phénoliques. Nous présentons alors, dans les histogrammes ci-dessous les différentes valeurs du contenu en phénols totaux, en flavonoïdes pour chaque individu. (Figure n°21, Figure n°22).



**Figure n°21:** Comparaison de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des feuilles de l'ensemble étudié de *Pistacia atlantica*.



**Figure n°22:** Comparaison de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des fruits de l'ensemble étudié de *Pistacia atlantica*.

A la lumière de ces résultats, on déduit que la variation de la teneur en flavonoïdes d'un individu à l'autre que se soit femelle ou mâle est moins importante par rapport à celle des phénols totaux pour les feuilles et présente un étendu de 15.55 mg/g. D'autre part, on note que l'étendu pour les feuilles des femelles de la région de Laghouat est de 6.88 mg/g, alors qu'ils est de 0.33 mg/g pour les feuilles des femelles de la région de Ain Oussera. Quant au pieds mâle cette valeur est de 1.8 mg/g.

Par ailleurs, pour les extrais des fruits, la variation de taux de flavonoïdes a comme étendu, 11.63 mg/g pour la série d'échantillons, 1.51 mg/g pour les échantillons de Laghouat et 9 mg/g pour les échantillons de Ain Oussera. La teneur maximale est toujours présentée par l'extrait du fruit P<sub>2</sub>F<sub>2pg</sub> (fruits matures du pied femelle P<sub>2</sub>F<sub>2</sub> de Ain Oussera).

Les extrais des feuilles sont riches en flavonoïdes par comparaison au fruits. En revanche, si on parle de taux de flavonoïdes par rapport aux teneurs en phénols totaux, la composition des extrais phénolique de fruits est flavonoïdique (presque la quasi-totalité de phénols totaux avec un taux compris entre 54,19 % à 94,48 %). Par contre pour les extrais phénoliques des feuilles, ce taux présente une variation d'un individu à un autre. L'étendu est de : 55.38 % pour les pieds femelles (on remarque que la valeur maximale et la valeur minimale représentent deux individus de la région 2, mais l'étendu réel d'individus de la région 1 est 19.39 %) et 13.93 % pour les pieds mâles. Alors que cette variation dans les extraits de fruits a un étendu de 27.67 % pour l'ensemble d'individu (on remarque que la valeur maximale et la valeur minimale représentent deux individus de la région 1 tandis que l'étendu réel d'individus de la région 2 est de 24.23 %).

Nos résultats sont en concordance avec les travaux phytochimiques décrits par Yousfi et *al.* 2008. Concernant les fruits, par contre pour les feuilles, la différence est notée pour le taux des flavonoïdes et plus précisément cette partie de la plante est plus riche en tanins. L'explication de cette différence concernant les tanins, réside dans le fait qu'ils sont synthétisés en abondance chez certaines plantes parasitées ou encore par l'attaque d'une plante voisine (Goffart, 2002). D'après les données des travaux antérieurs l'échantillon (individu) de *Pistacia atlantica* présente au niveau de tronc un genre de champignon symbiotique, et les feuilles sont atteinte de gale. Ainsi des études sur *Pistacia lentiscus* montre que les gales provoquent des mutations de l'information génétique au niveau des feuilles qui influent directement sur le métabolisme de la plante (Fabre, 1903).

D'après la synthèse des différents résultats de dosage des composés phénoliques, on peut constater que le classement décroissant de la quantité en polyphénols des échantillons

d'individus étudiés est différent à celui de la quantité en flavonoïdes surtout si on parle en pourcentage. Par conséquent, on peut conclure que la quantité de différents composés phénoliques est un caractère spécifique pour chaque individu.

## II.1.2 Analyse quantitative des lipides

### II.1.2.1 Teneur en lipides

Les huiles obtenues ont une couleur jaune-orange à l'exception de celui de fruit immature qui a une couleur jaune-verte. Ces huiles ont une odeur agréable et se solidifient partiellement à température ambiante et cela est due à la composition des huiles en acides gras saturés. Ces huiles contiennent une quantité importante en acides gras saturés (Yousfi et *al.*, 2003 ;Yousfi et *al.*, 2005).

**Tableau VII:** La teneur des échantillons des graines de *Pistacia atlantica* en huile

Poids / Echantillon	P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub>	P <sub>1</sub> F <sub>2L</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>1L</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>2-1L</sub>	P <sub>2</sub> F <sub>2-2L</sub>
Masse de la prise d'essai (g)	49.19	52.82	51.84	45.63	50.90
Masse de l'extrait (g)	16.41	16.64	18.83	12.55	12.72
Teneur (%)	33.36	31.50	36.30	27.52	25.00

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus (Tableau VII) montre clairement que les teneurs en huiles dans les échantillons étudiés de *Pistacia atlantica* présente une moyenne de 32.17 % et un étendu de 8.78 % pour l'ensemble des deux régions (on remarque que la valeur maximale et la valeur minimale représentent deux individus de la même région Ain Oussera cependant l'étendu des échantillons de la région de Laghouat est de 1.86 %). En parallèle dans les travaux antérieurs de Yousfi et *al.*, 2003, on remarque que cette valeur atteint 52 % mais pour un temps double d'extraction et une récolte effectuée durant le mois d'octobre donc un fruit plus mature. En effet, c'est clair que les graines sont relativement riches en matières grasses, et sont bien classées parmi les graines oléagineuses, comme les graines de tournesol, de soja et d'olive (20-42%) (Karleskind, 1992).

## II.1.2.2 Analyse Quantitative des fractions minoritaires des lipides

### II.1.2.2.1 Taux des stérols totaux

La teneur en stérols totaux dans les échantillons d'huiles a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de cholestérol (annexe I), et exprimée en milligrammes par gramme d'huile en équivalent de cholestérol.

**Tableau VIII :** Quantité des stérols totaux dans les huiles de *Pistacia atlantica*

Echantillon	Concentration (mg/g)
P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub>	1,64 ± 0.07
P <sub>1</sub> F <sub>2L</sub>	21,10 ± 0.05
P <sub>2</sub> F <sub>1L</sub>	12,01 ± 0.03
P <sub>2</sub> F <sub>2-1L</sub>	46,65 ± 0.06
P <sub>2</sub> F <sub>2-2L</sub>	27,20 ± 0.05

Les résultats de cette analyse ci dessus (Tableau VIII) montrent que les huiles étudiées contiennent des quantités importantes en stérols à l'exception de fruits noirs de Laghouat (P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>). La teneur en stérols est très variable et a un étendu de, 45.01 mg/g pour l'ensemble des échantillons, 19.46 mg/g pour l'échantillons de la région de Laghouat et de 34.64 mg/g pour l'échantillons de la région de Ain Oussera.

### II.1.2.2.2 Taux des tocophérols totaux

La teneur en tocophérols totaux dans les échantillons d'huiles a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (annexe I), et exprimée en milligrammes par 100 gramme d'huile en équivalent de vitamine E.

**Tableau IX :** Quantité des tocophérols totaux dans les huiles étudiées de *Pistacia atlantica*

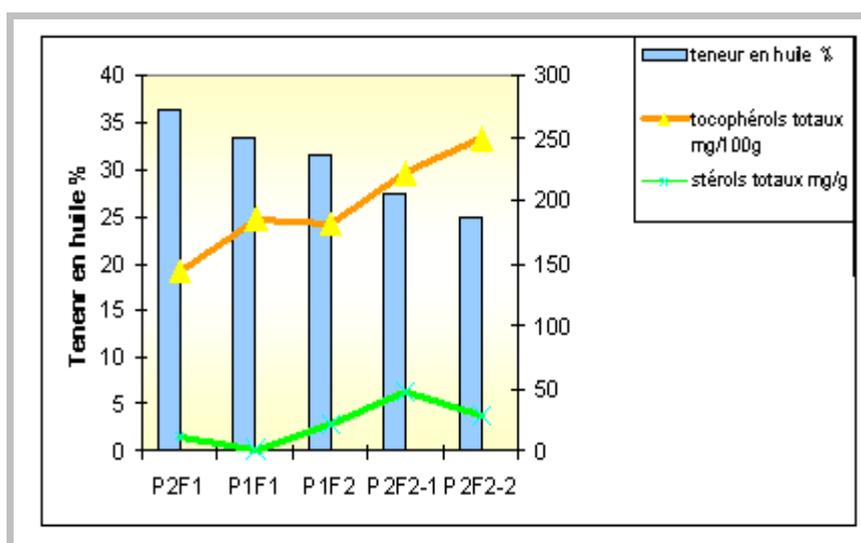
Echantillon	Concentration (mg/100g)
P <sub>1</sub> F <sub>1L</sub>	185,73 ± 0.05
P <sub>1</sub> F <sub>2L</sub>	181,34 ± 0.02
P <sub>2</sub> F <sub>1L</sub>	144,07 ± 0.03
P <sub>2</sub> F <sub>2-1L</sub>	221,43 ± 0.07
P <sub>2</sub> F <sub>2-2L</sub>	248,99 ± 0.03

Les résultats obtenus ci dessus (Tableau IX) montrent que la teneur de L'huile du fruit du Pistachier de l'Atlas en tocophérols totaux est importante (la moyenne= 183.146 mg/100g) surtout si en compare cette teneur par rapport aux teneurs d'autre huiles végétales alimentaires tels que l'huile de tournesol (67 mg/100g), et l'huile d'olive (20 mg/100g) (Karleskind, 1992).

La série d'échantillon étudiée présente un étendu de 104.92 mg/100g (on remarque que la valeur maximale et la valeur minimale représentent deux individus de la même région celle de Ain Oussera mais l'étendu des échantillons de la région de Laghouat est de 4 .385 mg/100g).

Il faut noter que le fruit immature de l'individu P<sub>2</sub>F<sub>2</sub> est plus riche en tocophérols totaux que le fruit mature.

La synthèse des différents résultats pour le dosage des lipides montre nettement que la teneur en lipides et celle des fractions insaponifiables (stérols et tocophérols) est un caractère spécifique pour chaque individu (Figure n°23).

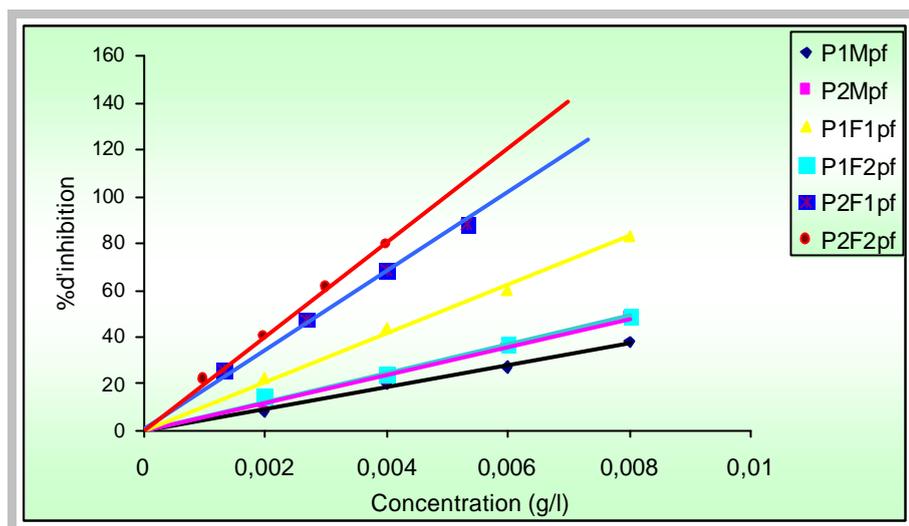


**Figure n°23:** Comparaison du contenu en lipide, en stérols totaux et en tocophérols totaux des fruits de l'ensemble étudié de *Pistacia atlantica*.

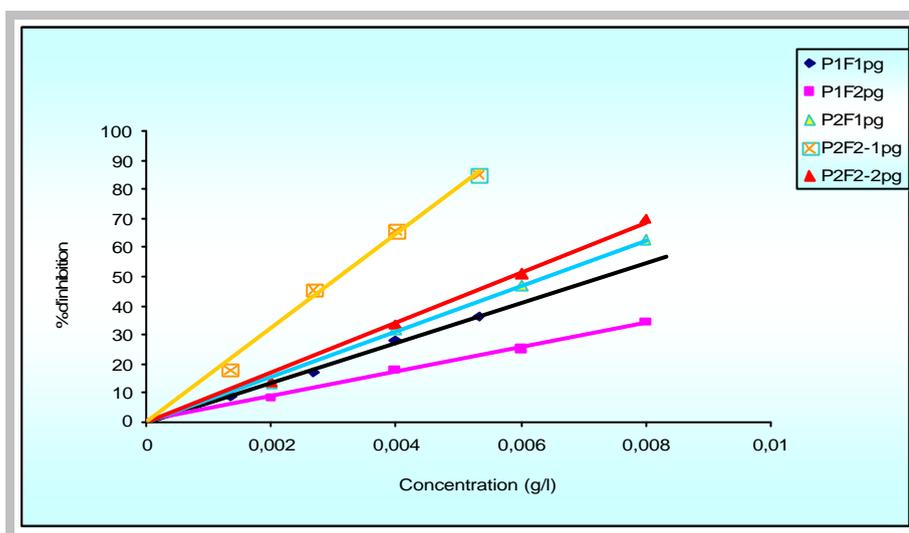
## II.2 Résultats de l'étude du pouvoir antioxydant

### II.2.1 Test chimique DPPH

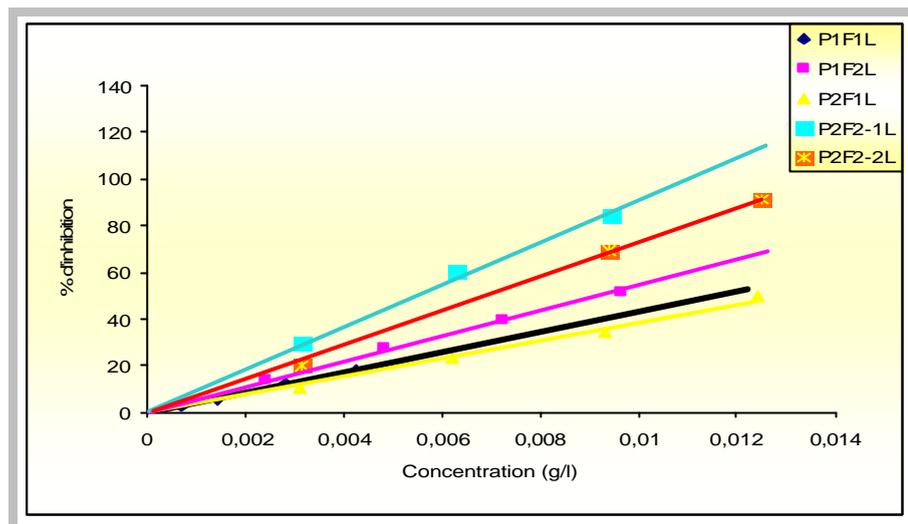
Les graphes ci-dessous représentent la variations du pouvoir antioxydant (PI) en fonction de la concentration de chaque extrait phénolique ou lipidique. (Figure n°24 ; Figure n°25 ; Figure n°26).



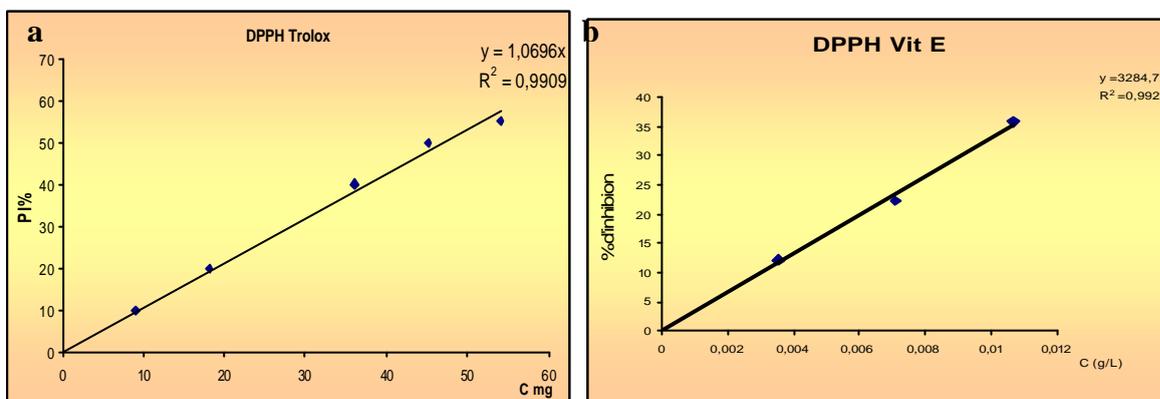
**Figure n°24:** Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles par le test du DPPH.



**Figure n°25:** Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques des fruits par le test du DPPH.



**Figure n°26** : Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits lipidiques des fruits par le test du DPPH.

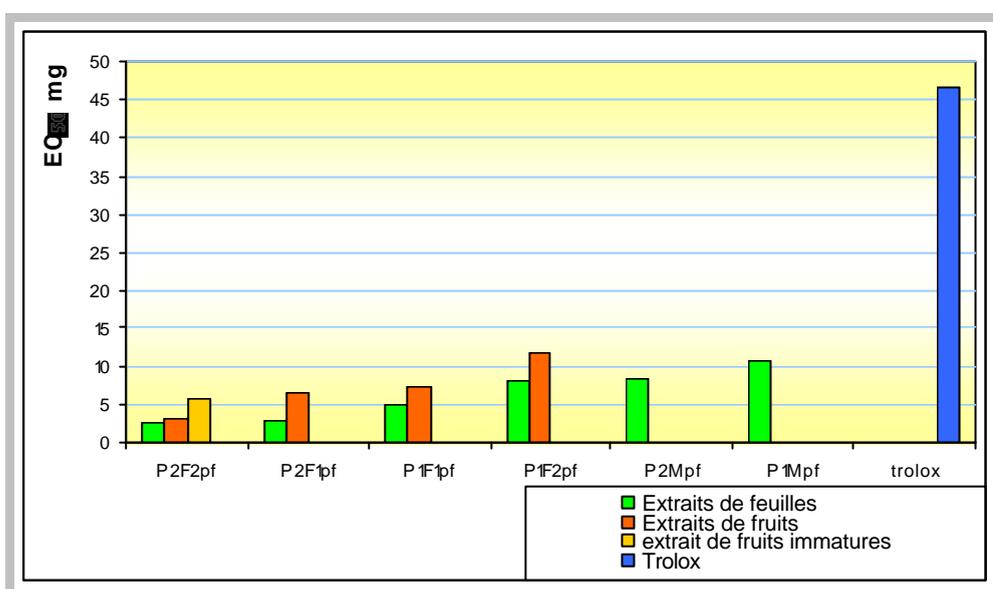


**Figure n°27** : Courbes représentant l'activité antioxydante des antioxydants de référence par le test du DPPH.

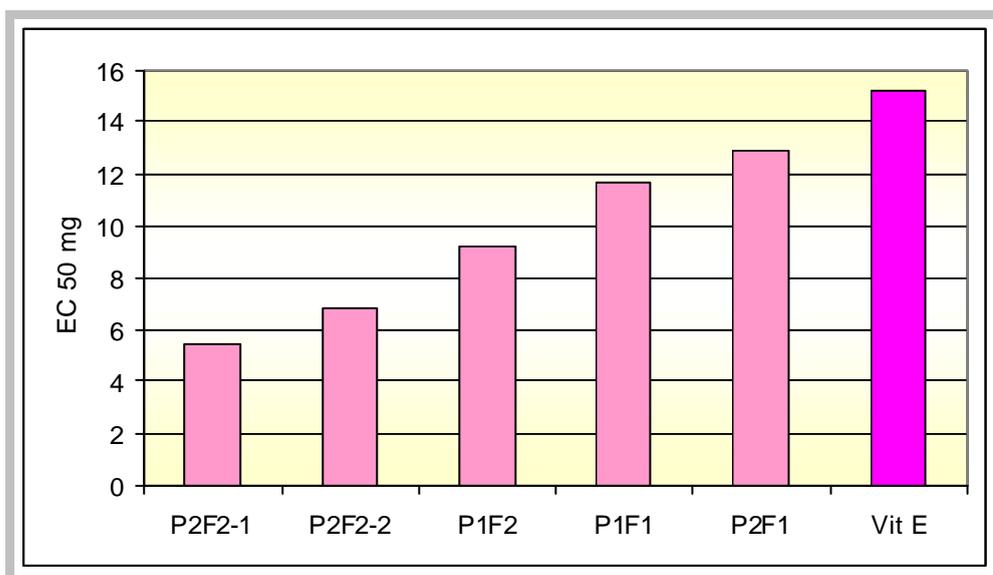
Les figures représentent la variations du pouvoir antioxydant (PI) en fonction de la concentration de chaque extrait phénolique, nous aident à calculer le paramètre  $EC_{50}$  ( $EC_{50}$  « efficient concentration » représente la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel) des antioxydants présents dans les extraits phénoliques exprimés en mg (en considérant une masse molaire moyenne des polyphénols de 500g). De même, nous avons calculé le  $EC_{50}$  du Trolox (Figure n°27/a), à fin de le comparer avec celui des extraits phénoliques et de la vitamine E (Figure n°27/b), pour le comparer avec celui des lipides exprimés en mg/ml Les résultats obtenus à partir de ce test sont regroupés dans le tableau X.

**Tableau X:** Le pouvoir d'inhibition EC<sub>50</sub> d'échantillons étudiés

Polyphénols				Lipides	
Extraits des feuilles	EC50 mg	Extraits des fruits	EC50 mg	Extraits des fruits	EC50mg
P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> pf	4,83± 0.04	P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> pg	7,37 ± 0.05	P <sub>1</sub> F <sub>1</sub> L	11,65 ±0.07
P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> pf	8,13±0.07	P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> pg	11,73 ± 0.04	P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> L	9,20 ± 0.10
P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> pf	2,94± 0.05	P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> pg	6,40 ± 0.07	P <sub>2</sub> F <sub>1</sub> L	12,90 ± 0.06
P <sub>2</sub> F <sub>2</sub> pf	2,48± 0.04	P <sub>2</sub> F <sub>2-1</sub> pg	3,09 ± 0.05	P <sub>2</sub> F <sub>2-1</sub> L	5,48 ± 0.07
P <sub>1</sub> M <sub>pf</sub>	10,8± 0.04	P <sub>2</sub> F <sub>2-2</sub> pg	5,845± 0.04	P <sub>2</sub> F <sub>2-2</sub> L	6,83 ± 0.07
P <sub>2</sub> M <sub>pf</sub>	8,44± 0.05	Trolox	46,74 ± 0.07	Vit E	15,22 ± 0.05



**Figure n°28:** Classement croissant des extraits phénoliques selon leurs EC<sub>50</sub>.

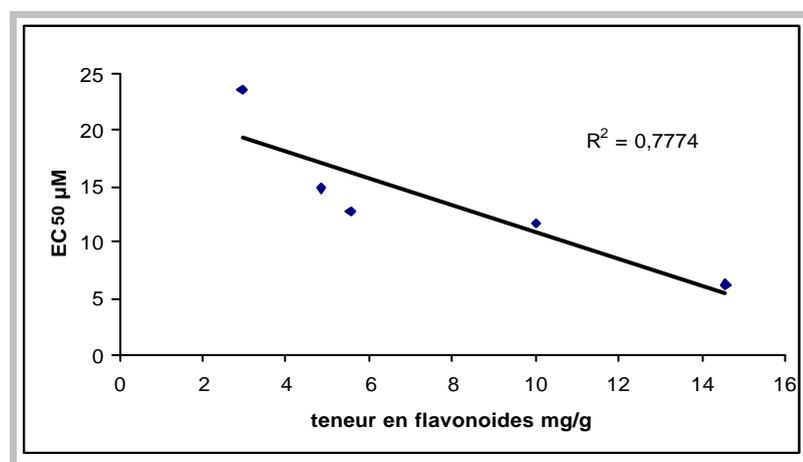


**Figure n°29:** Classement croissant des extraits lipidiques selon leurs EC<sub>50</sub>.

Puisque les valeurs d'EC<sub>50</sub> présentent les concentrations d'inhibiteurs nécessaires pour balayer 50 % des radicaux libres et qui sont inversement proportionnelle à l'activité antioxydante, d'après le classement croissant schématisé de la figure n°28, on remarque que l'ensemble des extraits phénoliques ont un pouvoir antioxydant supérieur au Trolox, de même les extraits lipides sont aussi caractérisés par un pouvoir antioxydant important comparativement la vitamine E (Figure n°29). En se basant sur les résultats obtenus, on peut conclure que la variation de la capacité antioxydante de ces extraits comparativement à celle du Trolox et la vitamine E pourrait principalement due à la présence de certaines molécules potentiellement actives.

D'après les résultats du classement croissant des extraits phénoliques des femelles selon leurs EC<sub>50</sub>, on remarque que ce classement varie dans le même sens dans les deux cas (extraits de feuilles, extraits de fruits), dont les extraits des feuilles sont toujours les plus puissants. Ce résultat peut être expliqué à la présence de composés ayant les mêmes structures chimiques dans les deux parties de chaque échantillon mais à forte abondance dans les feuilles. En outre, les feuilles des pieds femelles sont plus riches en espèces chimiques antioxydantes par rapport aux feuilles des pieds males. Pareillement les extraits des pieds de Ain Oussera sont classés premier c'est-à-dire les plus riches en antioxydants dans l'ensemble étudié de *Pistacia atlantica*.

Nous avons essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs d'EC<sub>50</sub> et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et le taux des flavonoïdes, mais on a trouvé un coefficient de corrélation très faible ( $R^2 < 0.25$ ) à l'exception d'EC<sub>50</sub> des d'extraits de fruits en fonction de la teneur en flavonoïdes ( $R^2 = 0.7774$ ) plus la pente chute rapidement plus l'activité de ces extraits est très importante (Figure n°30).



**Figure n°30:** Corrélation entre le pouvoir d'inhibition (EC<sub>50</sub>) d'extraits de fruits et la teneur en flavonoïdes.

La seule explication de l'indépendance de l'activité antioxydante des extraits de feuilles peut être interprété par l'existence de certaines molécules individuelles responsables de cette activité.

Pour attester cette hypothèse nous avons effectué le balayage de spectre UV –visible des différents extraits phénoliques dans les mêmes conditions. Les composés majoritaires ont été obtenus a faible concentration de la solution mère (extraits) par contre les fractions minoritaires ont été obtenues à une concentration plus élevée par rapport à la dernière (les dilutions sont préparées dans le méthanol)

Les résultats trouvés sont groupés ci dessous dans les tableaux : XI, et XII.

**Tableau XI:** Balayage de spectre de différents extraits phénoliques de feuilles de *Pistacia atlantica*

Echantillons	? Langueur d'onde existantes nm (A : absorption)	
	composés majoritaires	Composés minoritaires
<b>P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf</b>	218.3 (1.882 A) 276.0 (0.789 A)	355.3 (2.008 A) 356.0 (2.006 A) 657.0 (0.072 A)
<b>P<sub>1</sub>F<sub>2</sub>pf</b>	218.3 (1.107 A) 276.0 (0.443 A)	271.0 (3.00 A) 358.5 (1.609 A) 659.7 (0.082 A)
<b>P<sub>2</sub>F<sub>1</sub>pf</b>	218.7 (2.0411A) 221.7 (2.801A) 225.0 (2.811A) 226.7 (2.823 A) 276.0 (0.896 A)	435.0 (0.580 A). 608.8 ( 0.857 A) 658.0 ( 0.194 A) 729.3 (0.829 A)
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>pf</b>	218.0 (2.507 A) 276.0 ( 1.355 A)	354.0 (2.592 A) 657.0 (0.078 A) 727.0 (0.02 A)
<b>P<sub>1</sub>M<sub>pf</sub></b>	218.2 (1.664A) 276.0 (0.777 A)	357.9 (2.5481A) 658.8 (0.838 A)
<b>P<sub>2</sub>M<sub>pf</sub></b>	218.0 (1.844 A) 276.0 (0.690 A)	281.0 (1.162 A) 312.0 (1.547 A) 438.5 (0.390A) 359.2 (1.520A) 608.8 0.847 A) 659.3 (0.181A)

**Tableau XII:** Balayage de spectre de différents extraits phénoliques de fruits de *Pistacia atlantica*

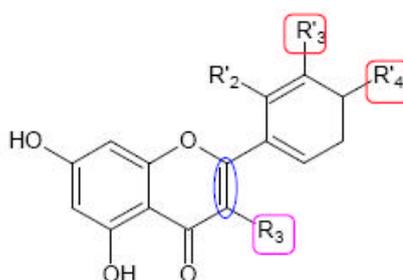
Echantillons	? Longueur d'onde existantes nm (A : absorbance)	
	composés majoritaires	composés minoritaires
<b>P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub></b>	220.4 (2.721 A) 223.7 (2.710 A) 231.6 (2.000 A) 275.6 (0.017 A)	/
<b>P<sub>1</sub>F<sub>2pg</sub></b>	213.0 (2.416 A) 268.6 (0.692 A) 353.0 (0.281 A)	309.8 (1.711 A) 420.7 (0.410 A) 444.7 (0.144 A) 472.7 (0.110 A) 626.0 (0.078 A) 667.0 (0.013 A)
<b>P<sub>2</sub>F<sub>1pg</sub></b>	213.6 (2.107 A) 218.0 (2.120 A) 269.6 (0.953 A) 352.8 (0.402 A)	282.0 (2.107A) 307.5 (0.710A) 423.0 (0.143A) 444.7 (0.136A)
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub></b>	217.8 (3.000 A) 218.8 (2.007 A) 227.5 (3.000 A) 270.7 (2.782 A) 353.0 (1.004 A)	311.8 (1.359A) 421.7 (0.159A) 445.0 (0.152A) 472.5 (0.114A) 626.0 (0.078A) 667.0 (0.013A)
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2-2pg</sub></b>	217.0 (2.792A) 218.7 (2.623A) 222.5 (2.794A) 273.8 (2.082A) 356.3 (0.223A)	412.0 (0.373A) 442.8 (0.301A) 472.2 (0.235A) 532.0 (0.049A) 667.8 (0.090A) 281.7 (1.961A) 307.2 (2.278A)

L'analyse spectrale UV reflète la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes ainsi que les fréquences de chaque fraction on peut prédire les techniques de dosages utilisés pour ces composés sont fiables.

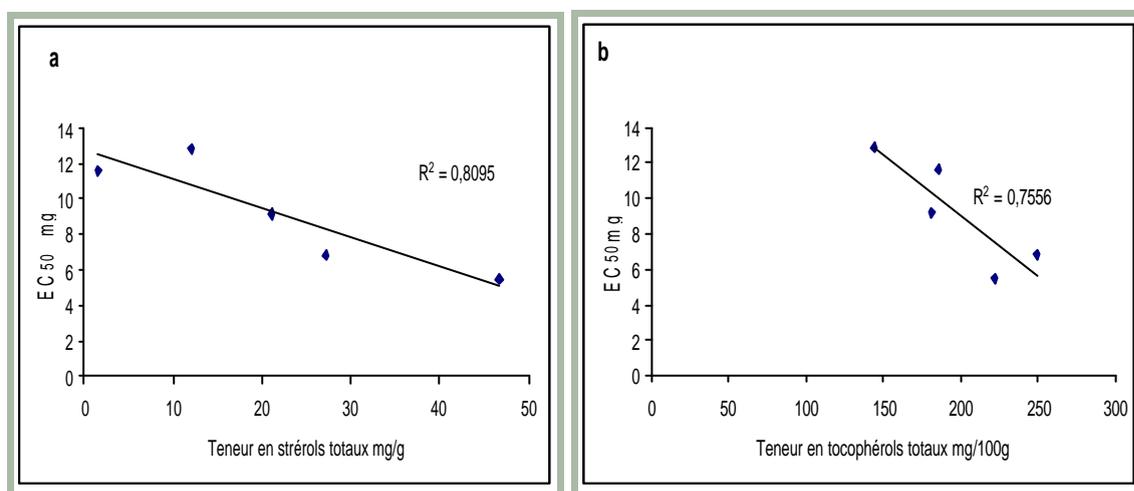
D'après cette analyse on peu conclure que le classement des extraits phénoliques selon leur EC<sub>50</sub> dépend principalement de leur fractions majoritaires communes (?= 218nm; ?= 276nm) dans le cas des extraits des feuilles. Nous renseigne sur le statut antioxydant de Chaque extraits : plus l'extrait est riche en ces composés plus leur EC<sub>50</sub> diminue, sans oublier les fractions minoritaires aussi.

Par contre pour les extraits de fruits leurs spectre d'absorption est largement varies de l'un a l'autre presque absence de spectres communs à l'exception de pic ( $\lambda=218$  nm) pour les échantillons de la région de Ain Oussera. Une explication simple de cette variation, c'est que l'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend essentiellement de leur structure individuelle et de leur taux dans l'extrait.

La position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles (OH), sont les éléments les plus importants pour expliquer l'augmentation ou la diminution de l'activité antiradicalaire de nos extraits phénoliques (Figure n°31) (Marfak, 2003).



**Figure n°31:** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Marfak, 2003).



**Figure n°32:** Corrélation entre le pouvoir d'inhibition (EC<sub>50</sub>) des lipides et la teneur en stérols totaux (a) et en tocophérols totaux (b).

Dans le cas des lipides, nous avons trouvé une corrélation linéaire entre les valeur d'EC<sub>50</sub> et la teneur en stérols totaux (R<sup>2</sup>=0.80) et en tocophérols totaux (R<sup>2</sup>=0.75) (Figure n°32). L'activité antioxydante des lipides dépend principalement de ces composés antioxydants et de

leurs concentrations, plus l'extrait lipidique est riche en ces dernier plus EC<sub>50</sub> diminue plus l'extrait est antioxydant.

### II.3.2 Test biologique (test d'hémolyse)

Les pourcentages d'inhibition du test d'hémolyse déduits de ces différentes mesures pour des concentrations de 10<sup>-6</sup>M et 10<sup>-5</sup>M sont présentés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII:** Le pourcentage d'inhibition des extraits phénoliques dans le test d'hémolyse

Extraits des feuilles	Inhibition d'hémolyse (%)		Extraits des fruits	Inhibition d'hémolyse (%)	
	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-5</sup> M		10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-5</sup> M
P <sub>1</sub> F <sub>1pf</sub>	57,02 ± 0.05	17,93 ± 0.07	P <sub>1</sub> F <sub>1pg</sub>	80,55 ± 0.06	13,70 ± 0.05
P <sub>1</sub> F <sub>2pf</sub>	44,11 ± 0.08	16,15 ± 0.05	P <sub>1</sub> F <sub>2pg</sub>	62,00 ± 0.04	17,93 ± 0.06
P <sub>2</sub> F <sub>1pf</sub>	79,13 ± 0.04	17,02 ± 0.10	P <sub>2</sub> F <sub>1pg</sub>	68,42 ± 0.07	15,29 ± 0.10
P <sub>2</sub> F <sub>2pf</sub>	66,84 ± 0.05	18,93 ± 0.07	P <sub>2</sub> F <sub>2-1pg</sub>	78,30 ± 0.10	15,29 ± 0.05
P <sub>1</sub> M <sub>pf</sub>	41,93 ± 0.10	17,93 ± 0.06	P <sub>2</sub> F <sub>2-2pg</sub>	82,70 ± 0.05	17,02 ± 0.07
P <sub>2</sub> M <sub>pf</sub>	36,70 ± 0.07	13,70 ± 0.04	vit C	28,70 ± 0.05	51,39 ± 0.07

Dans ce test biologique les hématies sont soumises à une agression oxydante (production contrôlée de radicaux libres). L'oxydation radicalaire des acides gras des membranes lipidiques (peroxydation lipidique) des globules rouges conduite finalement à l'hémolyse et à la libération d'hémoglobine dont l'absorbance est mesurée à 405 nm. Les composés possédants une activité antioxydante retardent l'hémolyse par rapport au témoin. Les interactions entre les espèces réactives et les antioxydants putatifs dépendent de plusieurs paramètres biologiques, physiques et chimiques tel que la structure, la taille, la solubilité et le potentiel oxydo-réducteur.

A fin d'étudier l'activité antioxydante des extraits phénoliques vis-à-vis de l'agression radicalaire, nous avons suivis l'influence de la concentration des extraits phénoliques sur le pouvoir d'inhibition. Généralement, un bon inhibiteur est un agent ayant une activité antioxydante qui varie proportionnellement avec sa concentration. Dans le cas où l'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration de l'extrait phénolique, l'inhibiteur joue le rôle d'un pro-oxydant.

Selon l'ensemble des résultats obtenus (Tableau XIII), la majorité de nos extraits ne reflètent pas une relation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition et la concentration de ces derniers par ce que l'extrait est très concentré à 10<sup>-5</sup>M ce qui a provoqué une action pro-

oxydante. On peut déduire alors, que tous les agents antioxydants présentant dans nos extraits se sont des bons inhibiteurs à faible concentration  $10^{-6}M$ .

Dans les conditions de ce test, les radicaux libres sont générés dans le milieu aqueux et réagissent avec les lipides membranaires des érythrocytes durant l'hémolyse. Néanmoins, les antioxydants lipophiles sont les plus efficaces, en effet les antioxydants hydrophiles agissent de façon significative mais ils ne peuvent pas protéger directement la membrane des hématies. En outre, les composés hydrophobes qui s'insèrent dans la double couche lipidique où indirectement régénèrent autres antioxydants et/ou entrent dans divers processus enzymatiques (Lesgards, 2000).

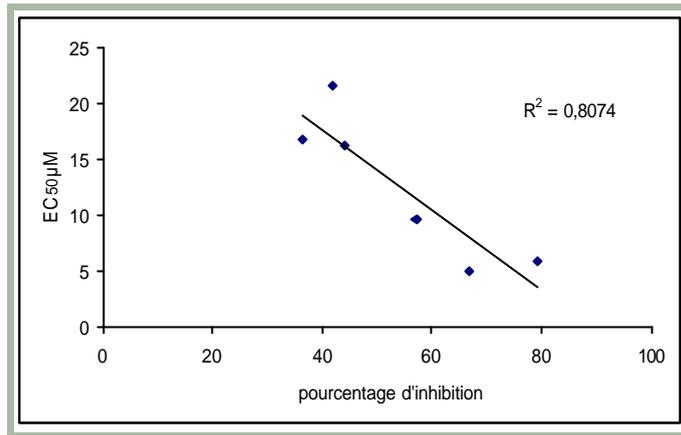
L'acide ascorbique s'est avéré l'antioxydant primaire dans le plasma (Frei, 1990) il est classé parmi les antioxydants les plus puissants connus, or si l'on se base sur la concentration utilisée ( $10^{-6}M$ ), on constate que tous les extraits sont plus efficace contre l'oxydation des lipides dans la membrane d'érythrocyte que la vitamine C. Cette différence d'activité pourra être due à l'effet de la solubilité des composés dans le milieu réactionnel.

Puisque l'acide ascorbique (vitamine C) est classé comme un composé hydrosoluble, il peut agir alors contre la propagation radicalaire dans la phase aqueuse. Or nos extraits phénoliques montrent des activités à l'encontre des radicaux libres plus efficaces que celle observée pour l'acide ascorbique, ce qui nous amène à déduire que ces substances peuvent s'insérer dans la membrane érythrocytaire pour se défendre contre l'agression radicalaire.

Les feuilles des pieds femelles de Ain Oussera sont toujours classés premier par rapport à celle de Laghouat, mais le classement cette fois ci dépend de la teneur en polyphénols totaux pour chaque région à l'opposé des feuilles des pieds males.

Par ailleurs le classement croissant des extraits phénoliques des femelles selon leurs PI à  $10^{-6}M$  est différent dans les deux cas (extraits de feuilles ; extraits de fruits) mais les extraits des fruits sont plus puissants.

Nous avons également, tracé la courbe représentant la relation entre les valeurs de  $EC_{50}$  et celle du taux d'inhibition d'hémolyse pour les différents extraits (Figure n°33).



**Figure n°33:** Variation des valeurs de EC<sub>50</sub> en fonction du pourcentage d'inhibition du test d'hémolyse.

Une corrélation significative a été observée ( $R^2 = 0.80$ ) pour les phénols des feuilles. Cette coordinence entre ces deux tests, peut être interpréter, soit que les composés phénoliques présents dans les extraits ayant le même effet sur le balayage des radicaux libres soit les milieu réactionnels comportent des radicaux libres analogues.

Par contre cette corrélation est faible dans le cas des extraits de fruits ( $R^2 < 0.4$ ) malgré que les extraits de fruits aient une activité plus importante que les extraits de feuilles pour les mêmes concentrations dans ce test, cela peut être due à la différence d'activité chimique des composés phénoliques individuels constituant les extraits, de même l'analyse spectrale montre que les structures présentes dans ces derniers est très variées bien qu'ils soient moins riches en polyphénols.

En effet, les paramètres qui peuvent agir sur les capacités antioxydantes des extraits dans les deux tests sont le pH, la solubilité, la concentration, la structure, la taille et le potentiel oxydo-réducteur. La présence de certains agents biologiques qui peuvent agir en synergie avec les composés phénoliques.

En conséquence le balayage de spectre UV des extraits phénoliques confirme l'existence d'une variabilité qualitative et quantitative selon les marqueurs bio-organiques choisis (les phénols totaux et les flavonoïdes).

L'activité antioxydante étudiée varie en fonction de la composition de chaque extrait et reflète toujours cette variabilité qui pourrait être due aux différents facteurs abiotiques:

- Le niveau et la qualité du spectre lumineux. La qualité de la lumière (dans le visible ou l'UV) intervient dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. C'est le cas des gènes qui codent pour des activités enzymatiques

comme la phénylalanine-ammonia lyase (PAL), ou la cinnamate 4-hydroxylase (C<sub>4</sub>H). Ainsi, les conditions de lumière appliquées (absence ou présence d'UV) pourraient jouer un rôle déterminant vis à vis de la teneur en polyphénols.

- La température. Elle détermine fortement le niveau d'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des polyphénols. En conséquence, les diverses conditions thermiques pourraient engendrer des modifications importantes dans la concentration finale en polyphénols.

- La nutrition azotée. La PAL (phénylalanine ammonia-lyase) est une étape enzymatique majeure dans la voie de synthèse des polyphénols. Cette enzyme transforme la phénylalanine en acide cinnamique, en libérant un ion ammonium. Ce mécanisme conduit au recyclage de l'azote de la phénylalanine, cet ammonium étant ensuite réabsorbé dans le métabolisme des acides aminés via la glutamine synthase. Plusieurs travaux indiquent que le métabolisme des polyphénols est inhibé par des apports importants en nitrate.

D'autres facteurs environnementaux pourraient probablement jouer un rôle dans la synthèse de polyphénols comme la teneur en CO<sub>2</sub> (interaction C/N), ou le niveau de stress oxydant (ozone notamment).

En particulier pour ce qui concerne le métabolisme des polyphénols et des terpènes/stérols, il se fait d'une manière accrue en réponse au stress oxydant. Ce stress oxydant pouvant lui même être déclenché par de multiples facteurs abiotiques (UV, O<sub>3</sub>, etc.) ou biotiques (espèces réactives de l'oxygène provenant de processus infectieux lors de l'attaque de phytopathogènes, etc.) (Benard *et al.*, 2008).

De même pour les lipides, en prenant le cas de *Thymus vulgaris*, les composantes chimiques du métabolite secondaire (l'huile essentielle) varient selon le climat et l'environnement. Cette variabilité a donc conduit les pharmaciens à donner un nom scientifique à chaque chémotype, annoté de façon à connaître les principaux constituants, qui auront des propriétés définies (Amiot, 2005).

Les variations génétiques (au niveau de gène) influent fortement sur la synthèse des protéines (surtout les enzymes des chaînes métaboliques), et cela est détecté à différents niveaux (la transcription, la traduction, produit finale).

Les flavonoïdes résultent de la combinaison de deux voies biogénétiques:

- voie1: voie shikimate conduisant à un acide cinnamique appelée aussi voie aromagenèse ou cyclogenèse
- voie2: voie acétate-malonate (Heller et Forkmann, 1993).

L'étude biogénétique de neufs échantillons d'huiles de graines de kéraf (*Hibiscus cannabinus*) permis de distinguer deux groupes d'huile selon leur teneur en acides gras libres par Chromatographie en Phase Gazeuse. Les principaux constituants de l'insaponifiable (Les tocophérols et stérols) ont été étudiés de façon quantitative et qualitative par HPLC (Magliozzi et Farines, 1996).

Donc les lipides et les flavonoïdes sont des bons marqueurs génétiques pour l'étude de variabilité biogénétique de *Pistacia atlantica* dans différents écotypes.

#### **II.4 Résultats de l'étude d'activité antileishmanienne**

Sachant que la variation de pH influe énormément sur les leishmanies, nous avons commencé par tester l'effet de nos extraits sur le milieu RPMI. Le résultat été que ces extraits quelques soit leur nature, ils ne font pas varier le pH et par conséquent pas d'action sur les leishmanies par ce biais là.

De même nous avons testé l'effet du méthanol à 20% sur la culture (par ce que nos extraits phénoliques sont conservés dans ce solvant) et on a pu constaté que ce dernier n'à aucun effet sur les leishmanies. Ces résultats nous encouragent à tester l'activité de ces extraits contre les leishmanies.

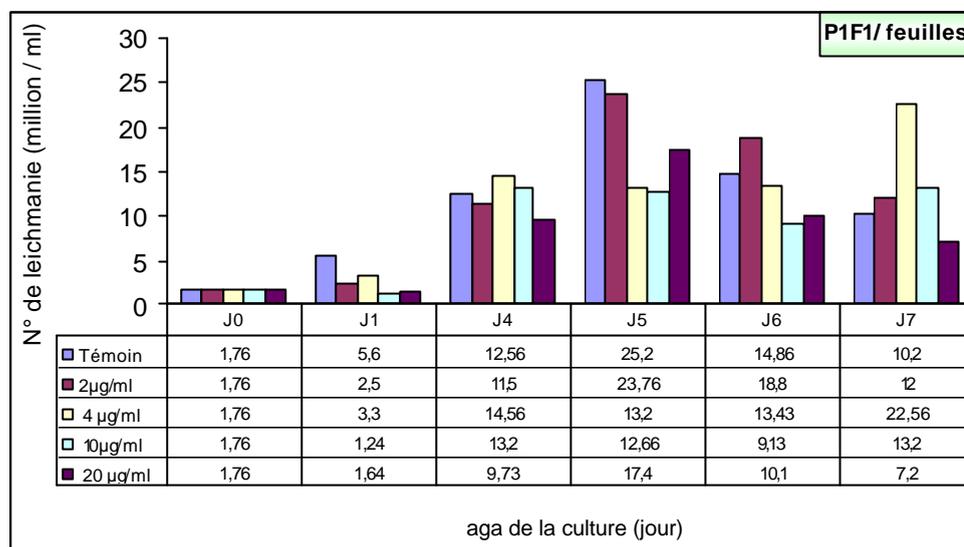
Nos résultats sont illustrés à travers les tableaux et les histogrammes ci-dessous.

## II.4.1 Activité antileishmanienne des extraits phénoliques

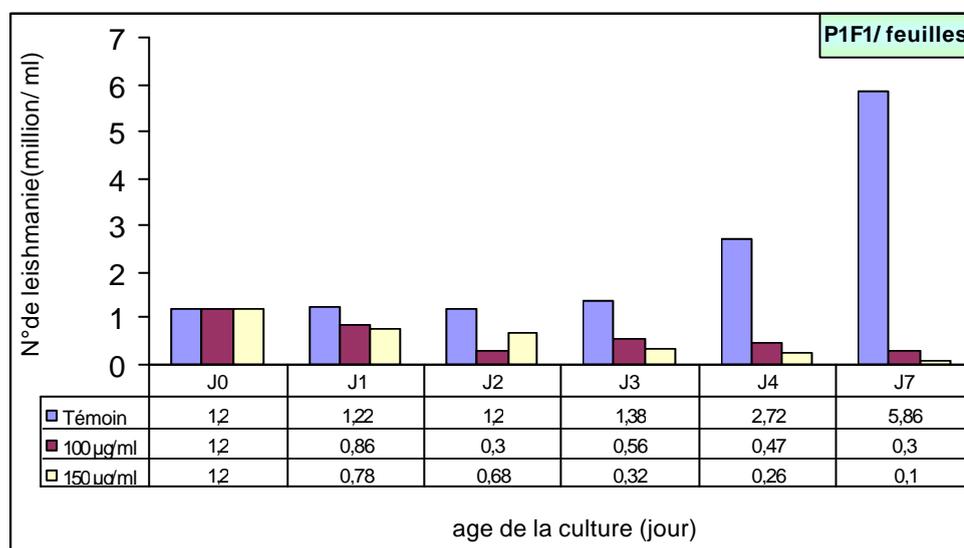
### II.4.1.1 Effets des extraits phénoliques sur *L. infantum*

#### A/ Extraits phénoliques des feuilles

##### 1-Extrait phénoliques P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf



**Figure n°34:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



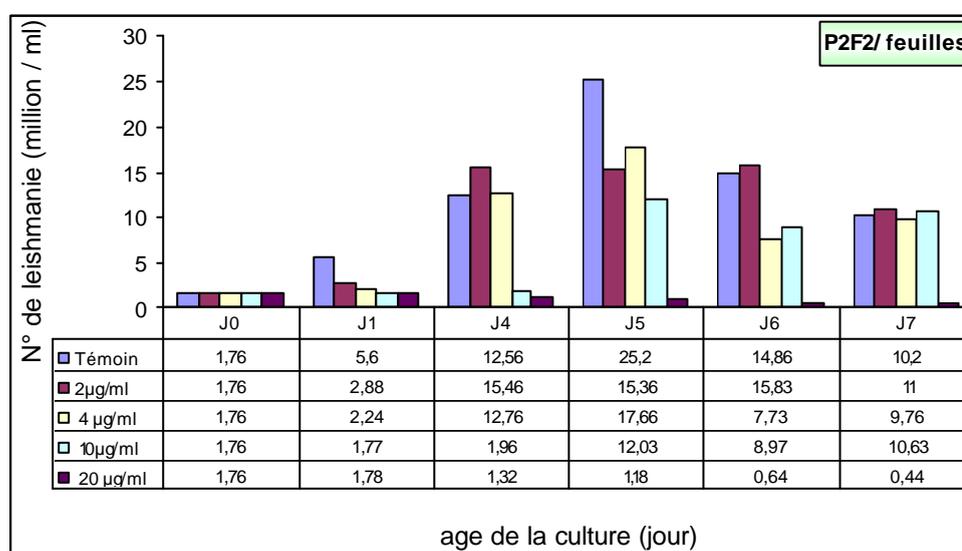
**Figure n°35:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Selon les représentations graphiques du comptage de promastigotes en présence de différents concentrations de l'extrait (2, 4, 10, 20µg/ml) (Figure n°34) et comparativement au témoin, on remarque que les leishmanies sont sensibles à ces doses de l'extrait au 1<sup>ier</sup> jour de cycle de vie c'est-à-dire qu'ils ont un pouvoir d'inhibition de la croissance, mais au bout du 4<sup>ème</sup> jour le parasite s'adapte et revient à la prolifération pour les concentrations 2, 4 et 10µg/ml .

L'explication que nous pouvant donner à ces résultats est que ces concentrations sont insuffisantes pour inhiber la croissance des leishmanies le long du cycle biologique malgré, une allure de courbe de croissance différente de celle du témoin. On retient par conséquent que la concentration minimale effectrice antiproliférative qui a un effet sable le long du cycle biologique de leishmanies est de 20 µg/ml.

Pour déterminer la concentration cytotoxique nous avons augmenté les concentrations de l'extrait jusqu'à 100 et 150µg/ml. Les résultats montrent clairement que ces doses sont toxiques ou leishmanicides (pas de croissance et altération des leishmanies), ceci étant proportionnel à la concentration de l'extrait (Figure n°35).

## 2-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>F<sub>2pf</sub>

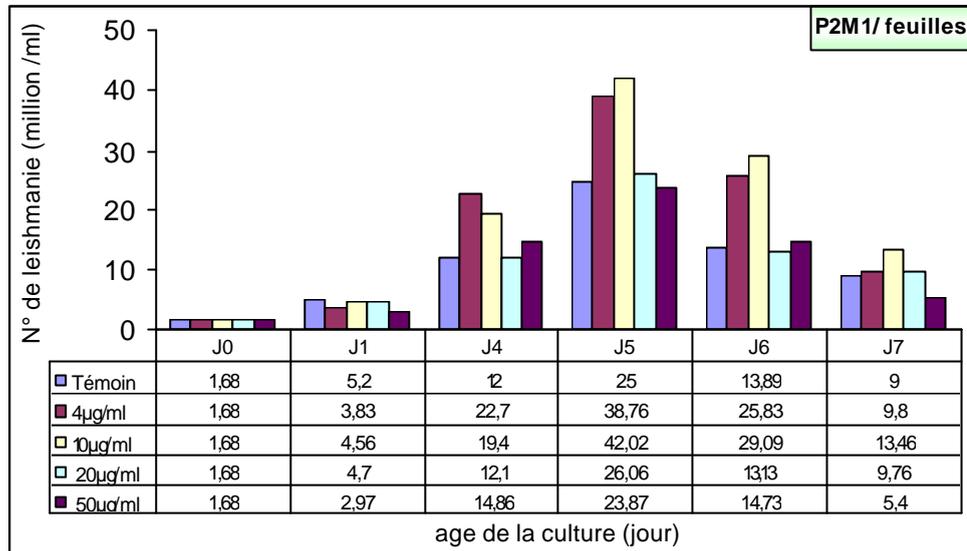


**Figure n°36:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2pf</sub> en fonction de l'âge de la culture.

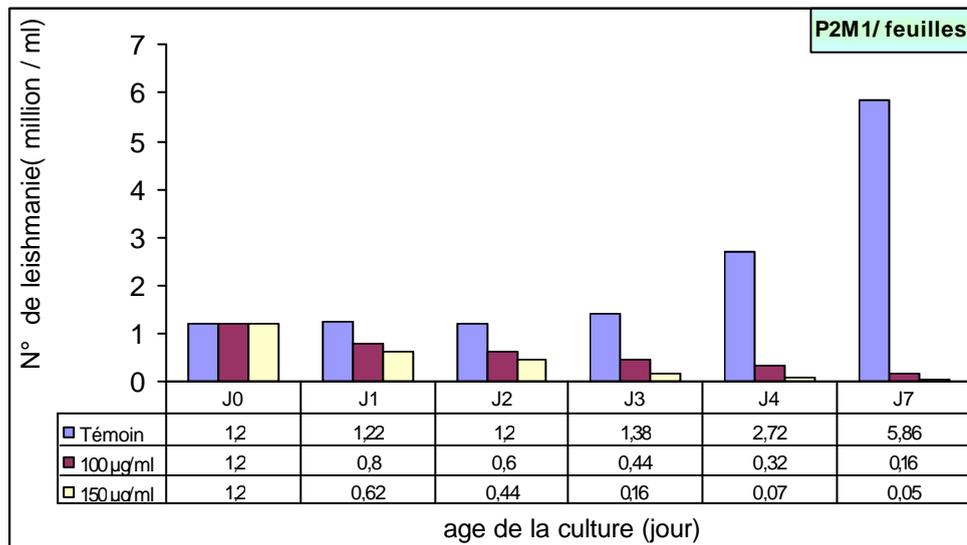
On remarque que les résultats obtenus avec les extraits phénoliques du 2<sup>ème</sup> pied femelle de Ain Oussera sont similaires de ceux de Laghouat à quelques exceptions. En effet après 24h d'incubation on note une diminution de la prolifération à toutes les doses suivie vers le 4<sup>ème</sup> jour, d'une adaptation et d'une multiplication importante à la dose de 2µg/ml. À l'opposé, pour cet

extrait la dose de 4 µg/ml s'avère la concentration minimale effectrice et 20µg/ml la dose cytotoxique (Figure n°36).

### 3-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>M<sub>pr</sub>



**Figure n°37:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>M<sub>pr</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



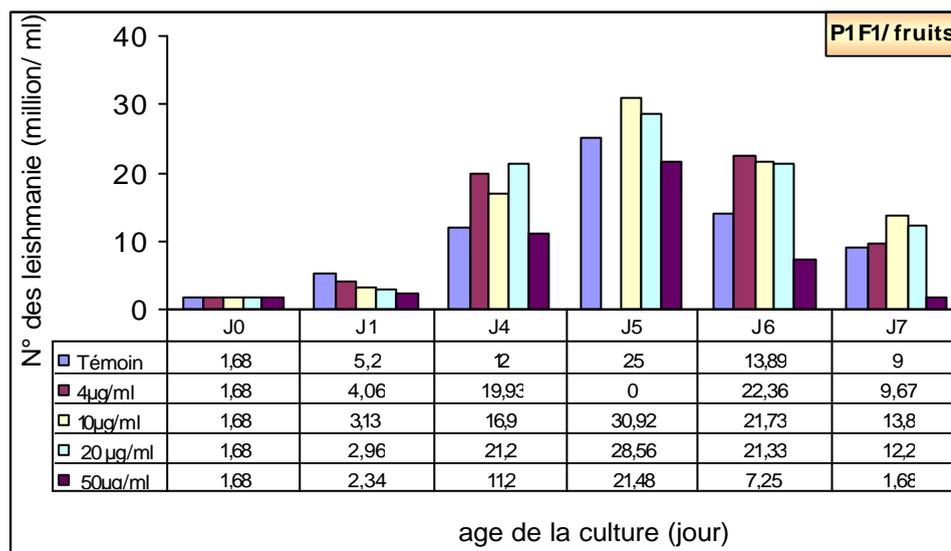
**Figure n°38:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>M<sub>pr</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

On remarque que les leishmanies sont peut sensible au extraits phénoliques du pied male de Ain Oussera et particulièrement à faible doses (4, 10, 20 $\mu$ g/ml) (Figure VII. 17). En effet l'allure de la courbe de croissance des leishmanies soumises à cet extrait est similaire à celle du témoin. Néanmoins à 50 $\mu$ g/ml d'extrait phénolique la prolifération est minimale, ce qui nous permet de déduire que la dose de 50 $\mu$ g/ml constitue la concentration minimale effectrice (antiproliférative).

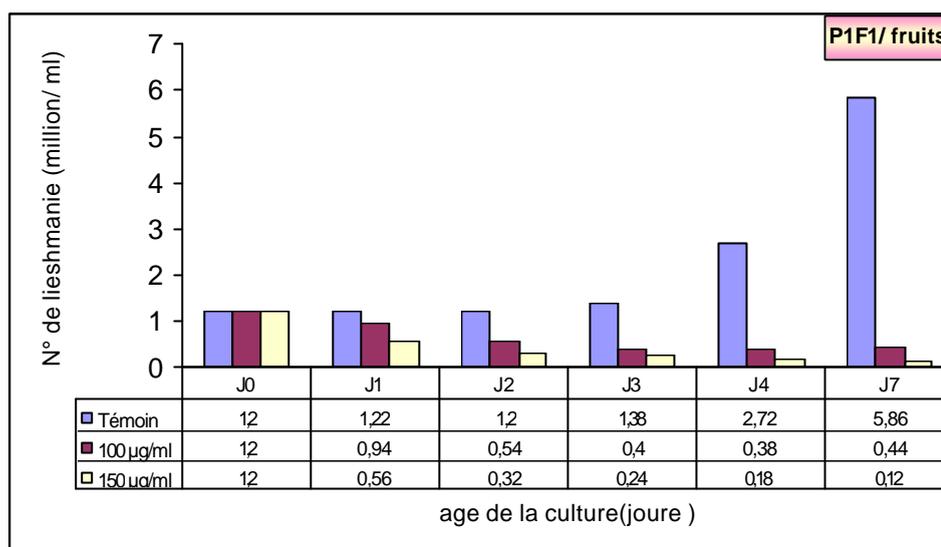
Pour déterminer la concentration cytotoxiques nous avons augmenté les doses à 100 et 150 $\mu$ g/ml. Les résultats montrent clairement que ces doses sont toxiques ou leishmanicides (pas de croissance et altération des leishmanies), ceci étant proportionnel à la concentration de l'extrait. (Figure n°38).

## B/ Extraits phénoliques des fruits

### 1-Extrait phénoliques P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub>



**Figure n°39 :** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

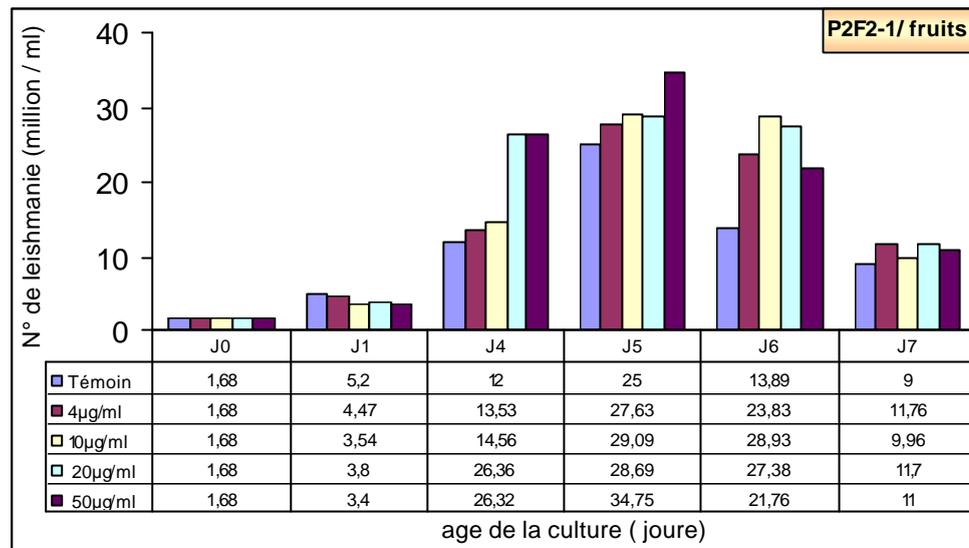


**Figure n°40 :** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

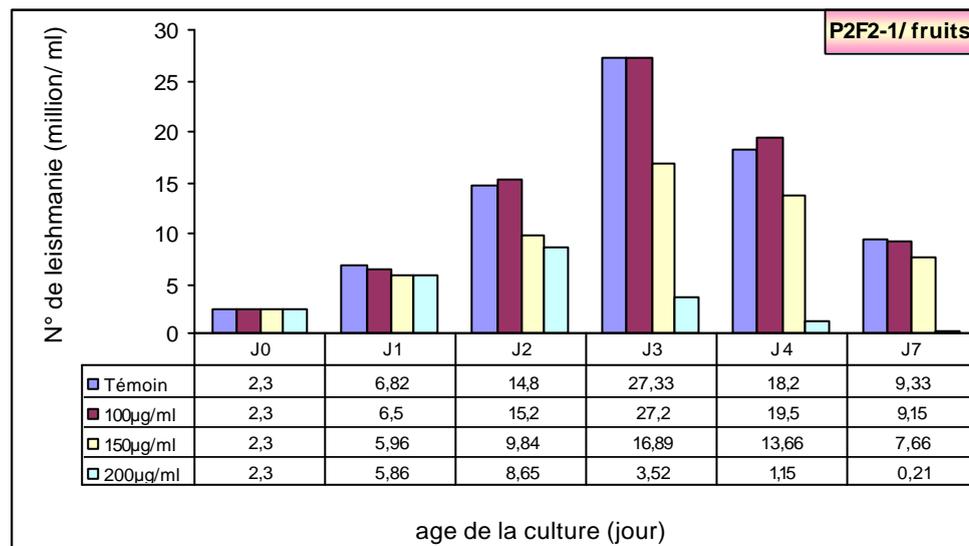
Concernant les phénols de fruits de Laghouat, ils ne sont actifs qu'à partir de la dose de 50 µg/ml. On effecte en présence de 4, 10 et 20 µg/ml d'extrait (Figure n°39), les leishmanies prolifèrent autant que le témoin, si ce n'est plus. À l'opposé, à 50 µg/ml on note par rapport au témoin, une multiplication moindre et une phase de déclin plus rapide et plus importante ce qui nous permet de déduire que 50 µg/ml représente la concentration minimale effectrice.

Pour déterminer la concentration cytotoxiques nous avons augmenté les concentrations de l'extrait jusqu'à 100 et 150 µg/ml. Les résultats montrent que ces doses sont toxiques ou leishmanicides (pas de croissance et altération des leishmanies), proportionnellement à la concentration de l'extrait (Figure n°40).

## 2-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub>



**Figure n°41 :** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

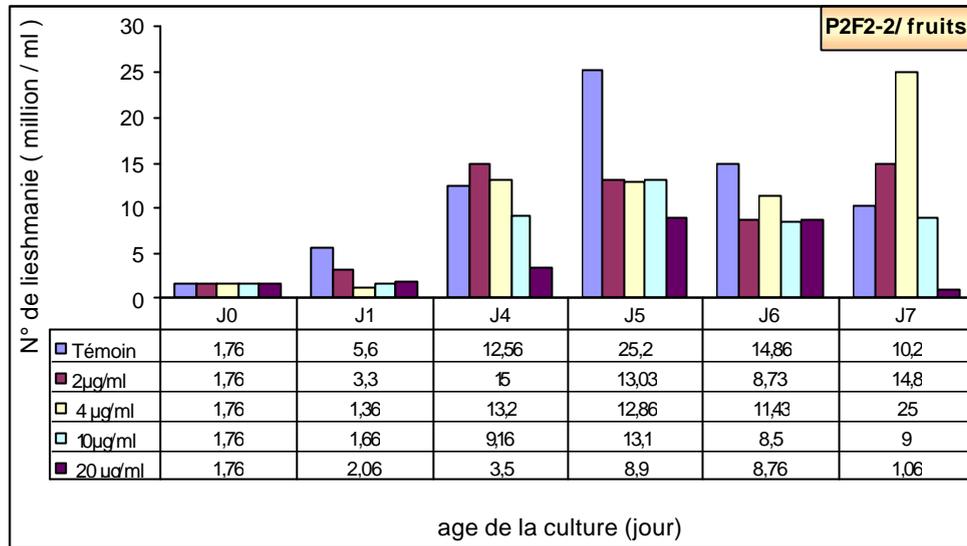


**Figure n°42:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

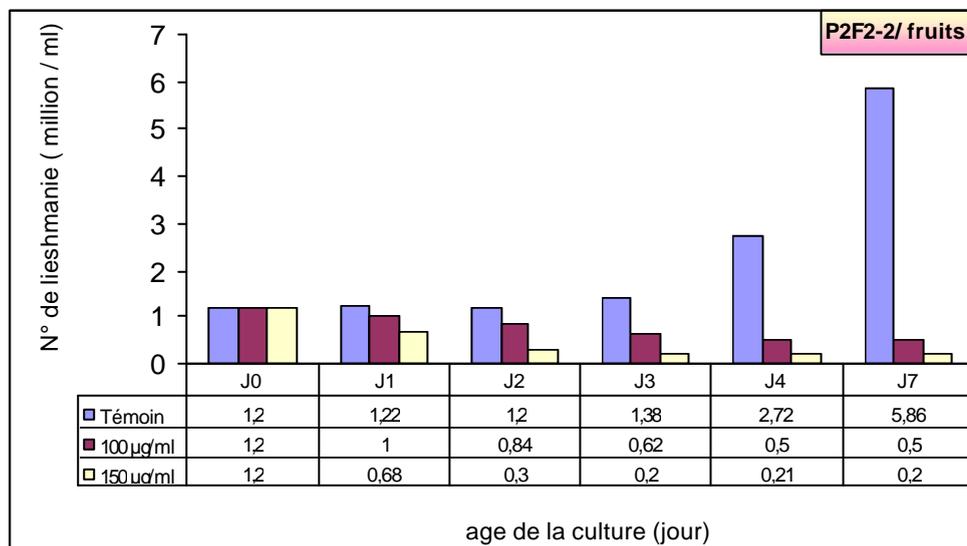
A travers l'histogrammes du figure n°41 on note que *L. infantum* est très peu sensible aux extraits phénoliques de fruits mature de Ain Oussera et aux concentrations 4, 10, 20 et 50µg/ml. Cette observation découle de l'allure de la courbe de croissance des leishmanies soumises aux différentes concentrations d'extraits phénoliques qui est superposable à celle du témoin et avec un effectif plus important. Ce ci nous a poussé à augmenter les doses à 100, 150 et 200µg/ml.

Ainsi nous avons définie la concentration minimale effectrice et qui est de 150µg/ml alors que la dose cytotoxique est supérieure à 200µg/ml (Figure n°42).

### 3-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>F<sub>2-2</sub>



**Figure n°43:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-2pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



**Figure n°44:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-2pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Les extraits phénoliques des fruits immatures semblent plus actifs que ceux des fruits matures du même pied femelle de Ain Oussera. En effet les leishmanies montrent une

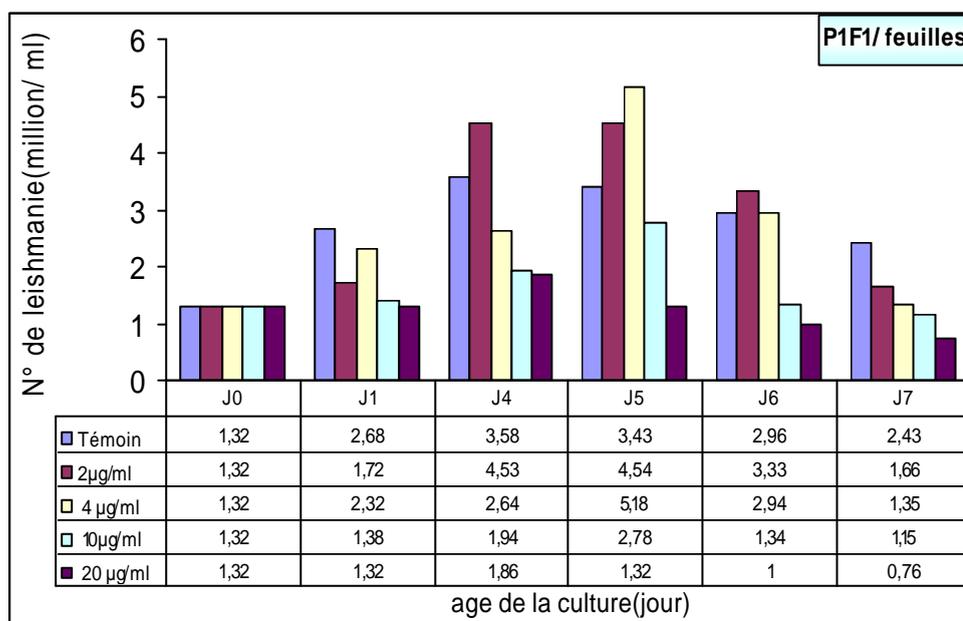
multiplication moindre par rapport à celle du témoin et même à des doses faibles telle que 2 et 4µg/ml (Figure n°43. Cependant à la dose de 10µg/ml le rendement antiprolifératif est constant (stable) et meilleur. Par conséquent la concentration minimale effectrice ou antiproliférative serait 10µg/ml.

De même pour déterminer la concentration cytotoxique on a augmenté les concentrations de l'extrait à 100 et 150µg/ml. Les résultats montrent que ces doses sont toxiques ou leishmanicides. Une action plus importante à 150µg/ml (Figure n°44).

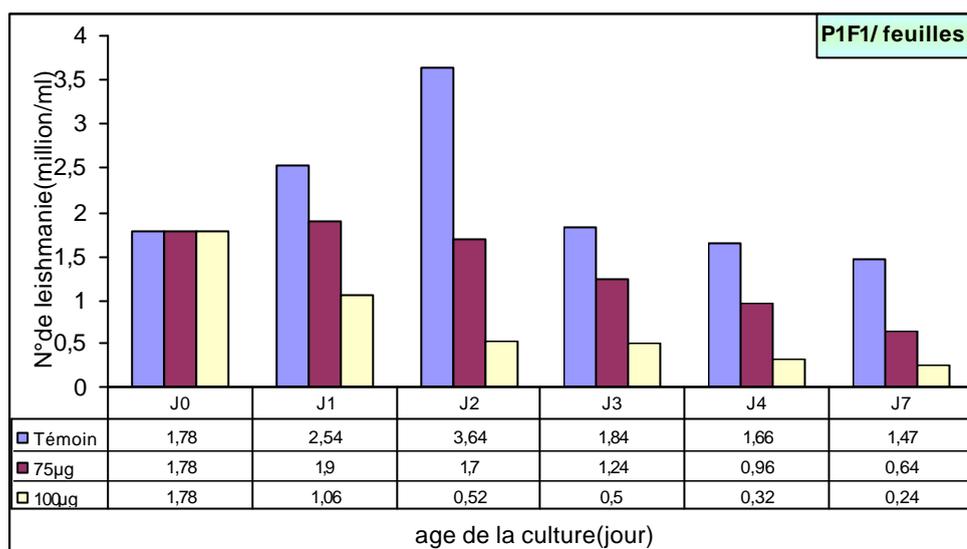
#### II.4.1.2 Effets des extraits phénoliques sur *L. major*

##### A/ Extraits phénoliques des feuilles

##### 1-Extrait phénoliques P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf



**Figure n°45:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



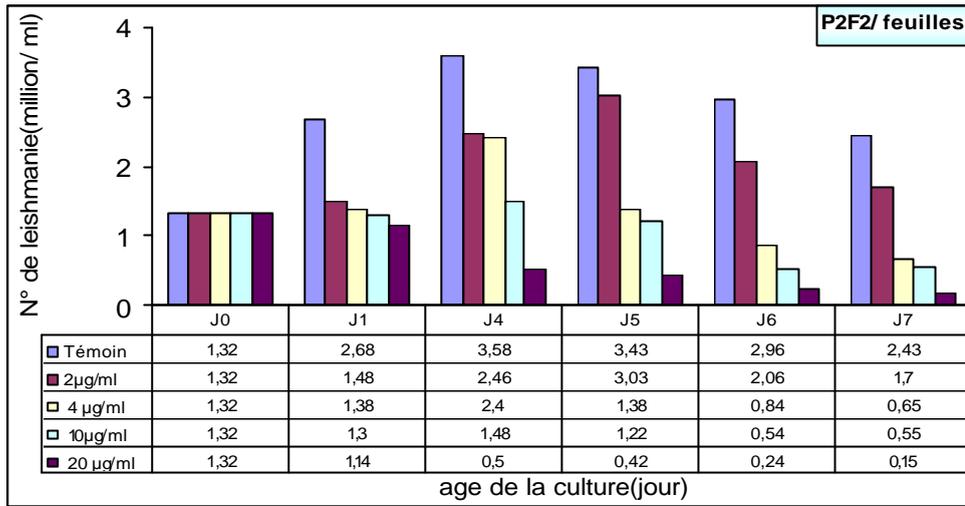
**Figure n°46:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Selon les représentations graphiques on note que les concentrations 2 et 4 µg/ml (Figure n°45) sont très insuffisantes et n'ont qu'une action très faibles comparativement au témoin.

Par contre à 10µg/ml l'action inhibitrice de la prolifération est évidente et encore plus importante à 20µg/ml. On déduit que la concentration minimale effectrice est de 10µg/ml.

Pour déterminer la concentration cytotoxiques nous avons augmenté les doses à 75 et 100µg/ml. Les résultats montrent clairement que ces doses sont toxiques ou leishmanicides (Figure n°46).

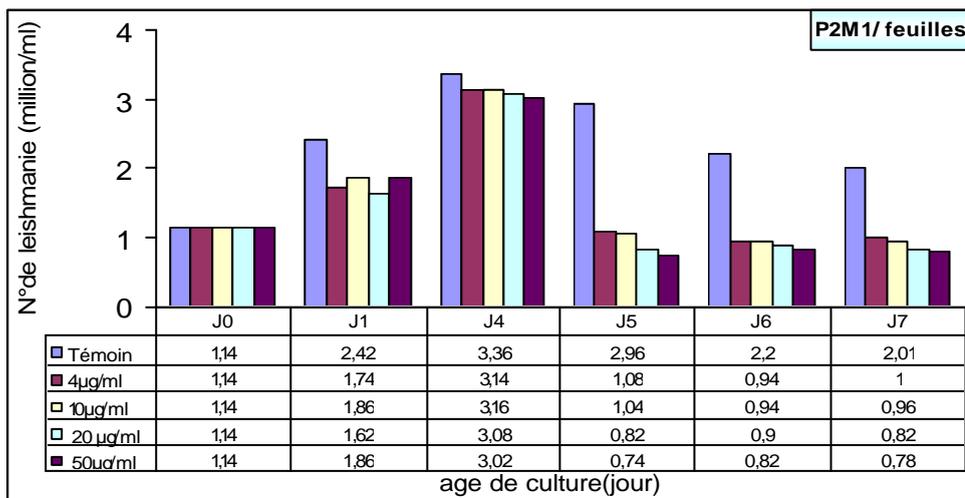
## 2-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>pf



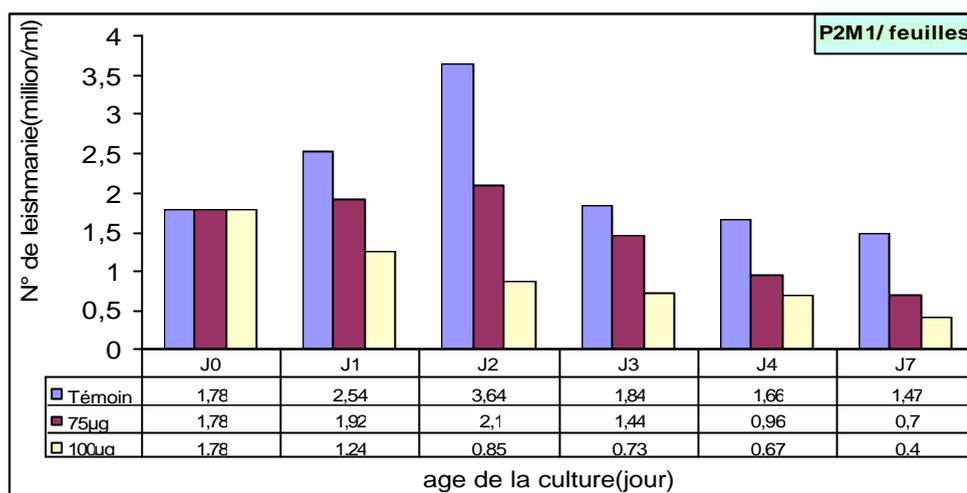
**Figure n°47:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>pf en fonction de l'âge de la culture.

Les composés phénoliques de feuilles du 2<sup>ème</sup> pied de Ain Oussera semble très actifs et à faibles concentrations 2, 4, 10 et 20 µg/ml (Figure n°47). En effet leur activité commence à la dose de 2 µg/ml et elle est plus marquée à 4 µg/ml. Cette activité se révèle proportionnelle à leur concentration. Ainsi la concentration de 2 µg/ml qui a un effet stable (constante) le long du cycle biologique par rapport au témoin, constitue la concentration minimale effectrice, alors que la dose cytotoxique est de 20 µg/ml.

## 3-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>M<sub>1</sub>pf



**Figure n°48:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>M<sub>1</sub>pf en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

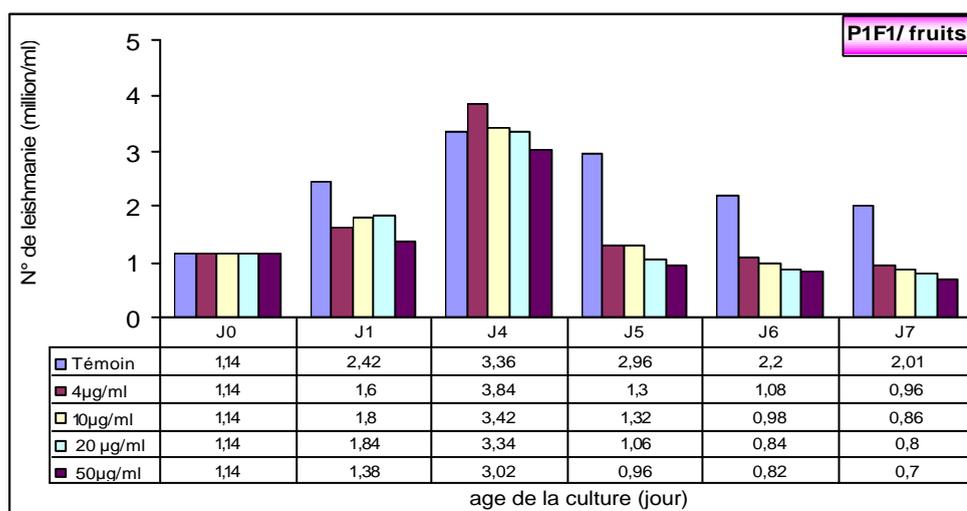


**Figure n°49:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>M<sub>1</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

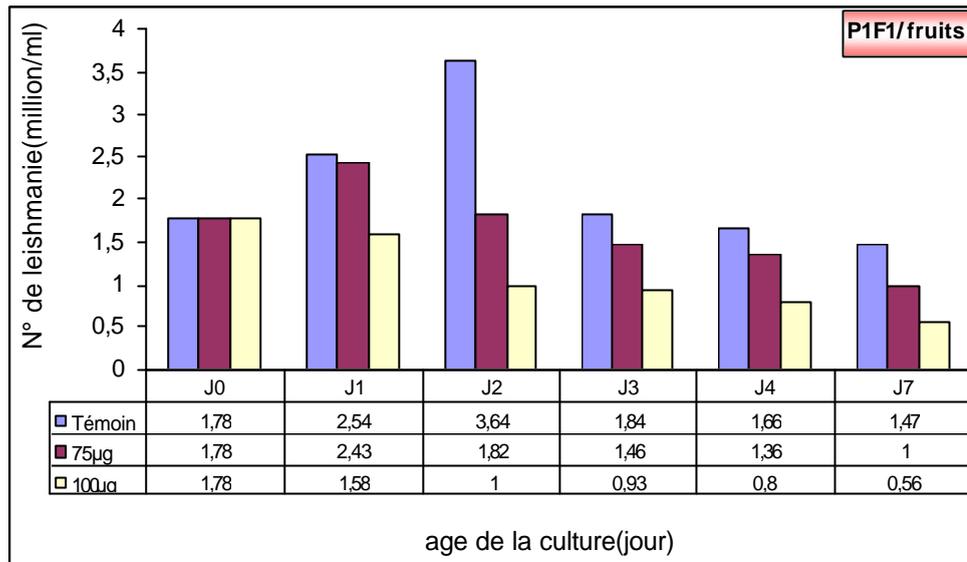
Un fait remarquable est illustré par les histogrammes ci-dessus. En effet l'ensemble des concentrations à savoir 4, 10, 20 et 50µg/ml, ne montre aucune activité au cours de la phase exponentielle du cycle biologique des leishmanies (Figure n°48), mais à l'opposé et à partir de 5<sup>ème</sup> jour le déclin est très important et rapides pour l'ensemble des concentrations et comparativement au témoin. Par conséquent la concentration minimale effectrice est de 50µg/ml. Le test a été refait avec des concentrations plus élevées à savoir 75 µg/ml et 100µg/ml pour définir la dose cytotoxique (Figure n°49). Les résultats montrent qu'elle est de 100µg/ml.

## B/ Extraits phénoliques des fruits

### 1-Extrait phénoliques P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub>



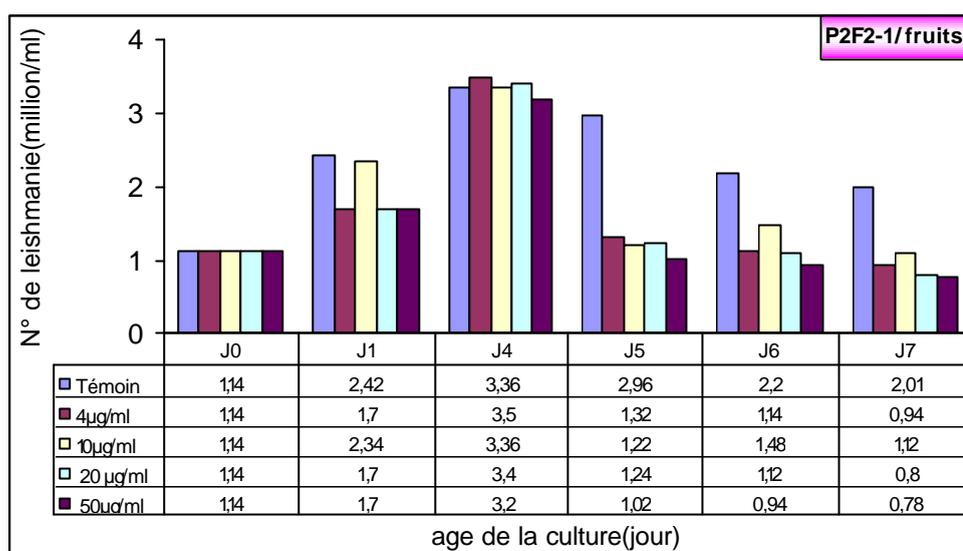
**Figure n°50:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



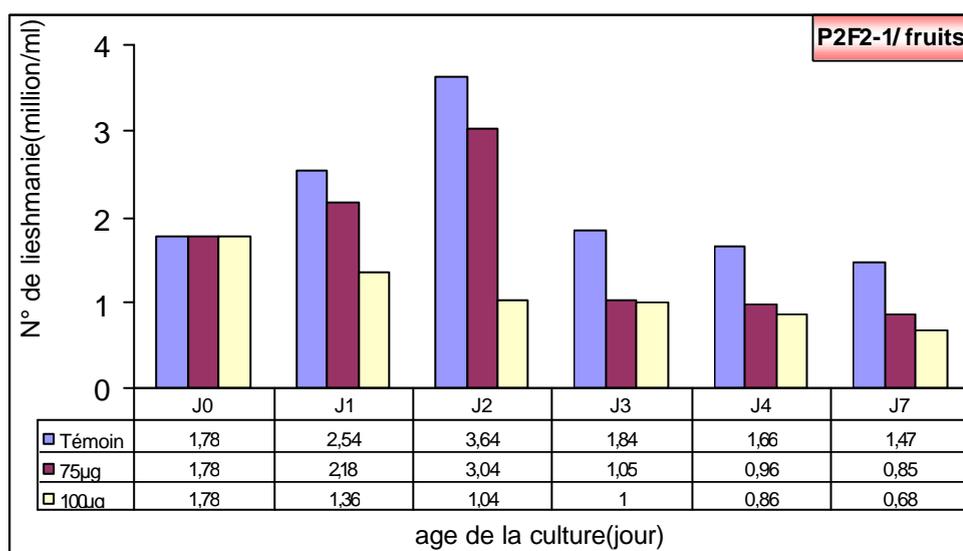
**Figure n°51:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Les résultats de l'extrait phénolique de fruits de Laghouat sont comparables à ceux des feuilles du pied male de Ain Oussera. En effet, les concentrations croissantes ne montrent pas d'activité au cours de la phase exponentielle du cycle biologique des leishmanies mais à partir du 5<sup>ème</sup> jour (la phase de déclin), l'activité des différentes concentrations s'avère plus efficace avec un meilleur rendement à la concentration de 50µg/ml (Figure n°50). Cette concentration représente la concentration minimale effectrice. Pour arriver à la dose cytotoxique, les concentrations ont été augmentées à 75 µg/ml et 100µg/ml. La concentration de 100µg/ml s'avère la dose cytotoxique (Figure n°51).

## 2-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub>



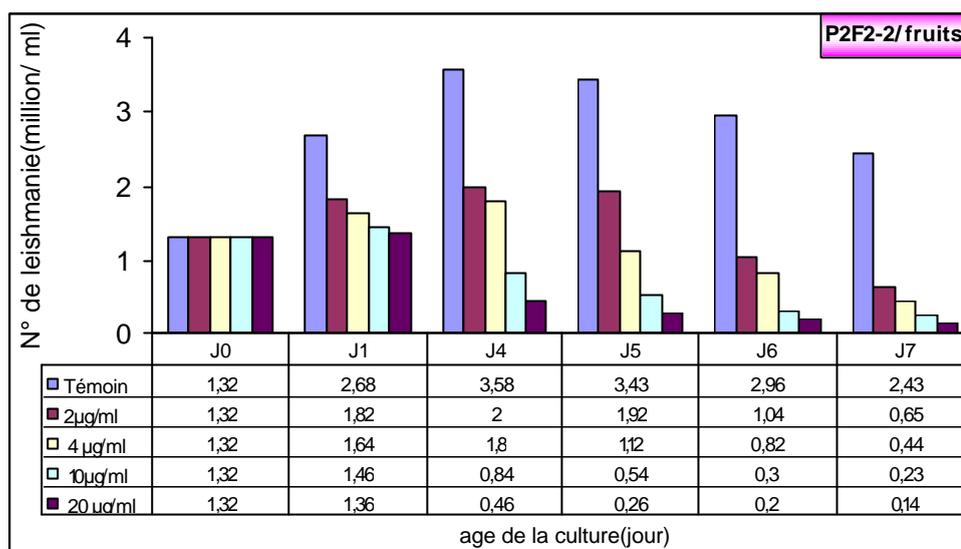
**Figure n°52:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



**Figure n°53:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1pg</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Encore une fois, les extraits phénoliques des fruits matures du pied de Ain Oussera (Figure n°52) donnent les mêmes résultats que ceux des feuilles du pied male de la même région et ceux des fruits mature du pied de Laghouat par conséquent une concentration minimale effectrice de 50µg/ml et une concentration cytotoxique de 100µg/ml. Selon l'allure d'histogramme une concentration de 150µg/ml donnerait les meilleurs résultats (Figure n°53).

### 3-Extrait phénoliques P<sub>2</sub>F<sub>2-2</sub>



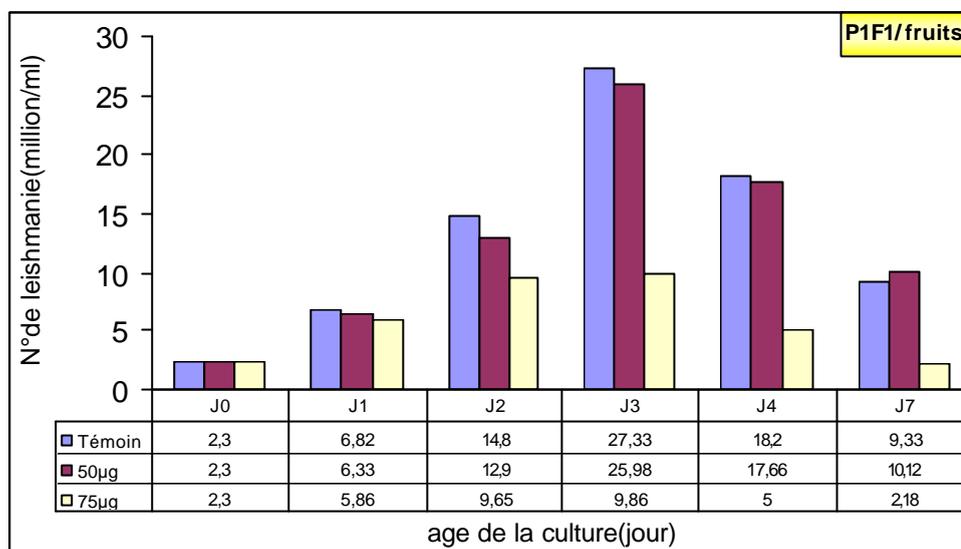
**Figure n°54:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-2pg</sub> en fonction de l'âge de la culture.

On note à travers cet histogramme, que les extraits phénoliques des fruits immatures donnent de meilleurs résultats par rapport à ceux des fruits matures. En effet, ils sont actifs à toutes les concentrations 2, 4, 10 et 20µg/ml et au cours des deux phases du cycle biologique (Figure n°54), mais cette action d'inhibition de la prolifération des leishmanies est proportionnelle à la concentration en extrait phénolique. Ainsi la concentration de 2µg/ml constitue la concentration minimale effectrice et 20µg/ml la dose cytotoxique.

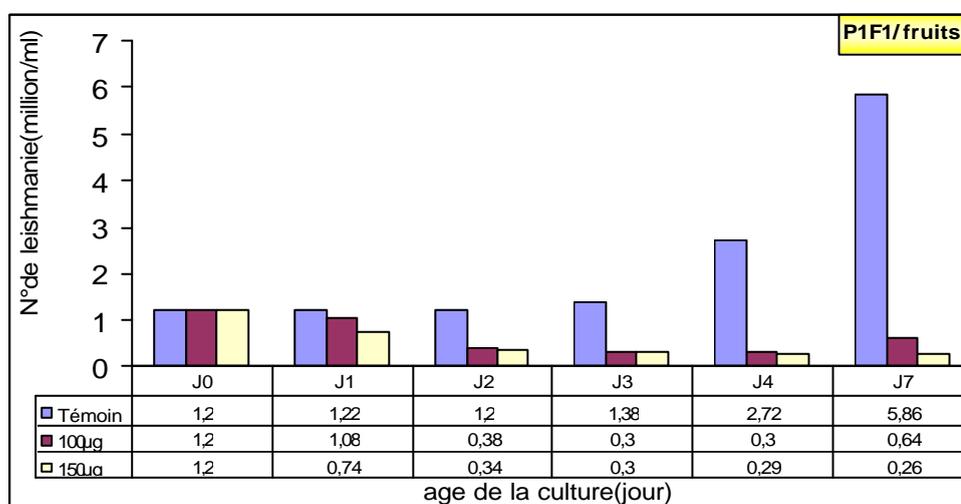
## II.4.2 Activité antileishmanienne des extraits lipidiques

### II.4.2.1 Effets des extraits lipidiques sur *L. infantum*

#### 1-Extrait lipidique P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub>



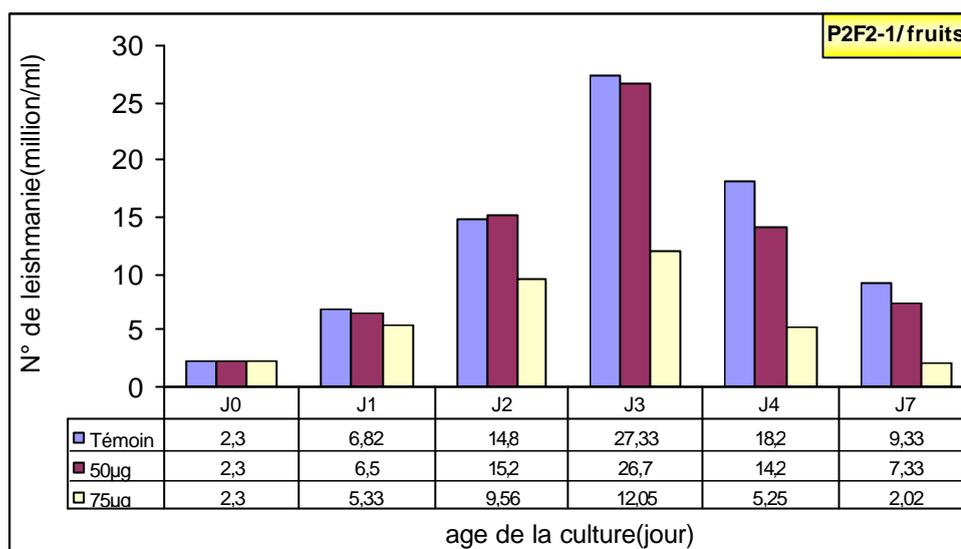
**Figure n°55:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



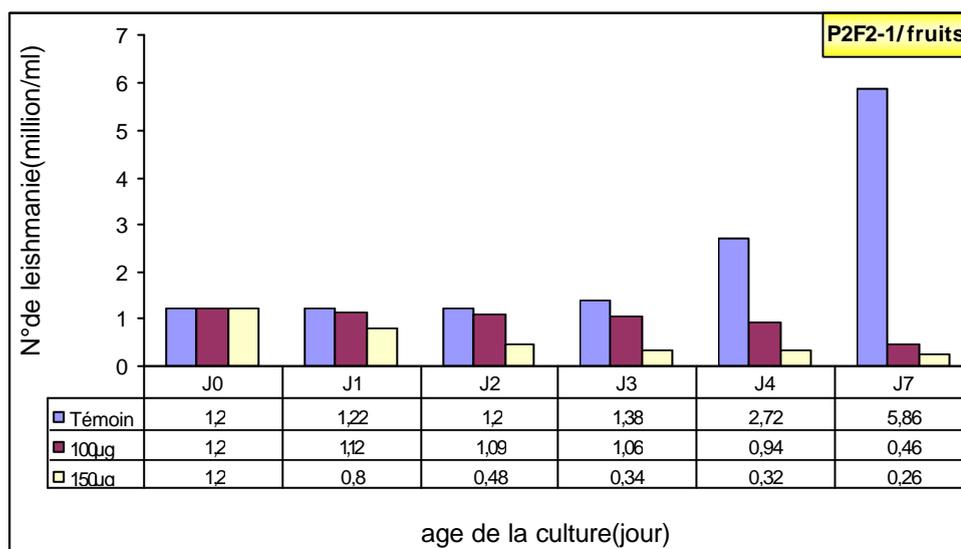
**Figure n°56:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Selon l'histogramme ci-dessus, les extraits lipidiques semblent moins actifs que les polyphénols en général. En effet, les extraits lipidiques ont une concentration minimale effectrice à 75µg/ml (Figure n°55). (4µg/ml pour les polyphénols) et une dose cytotoxique à 100µg/ml (Figure n°56) (20µg/ml pour les polyphénols).

## 2-Extrait lipidique P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub>



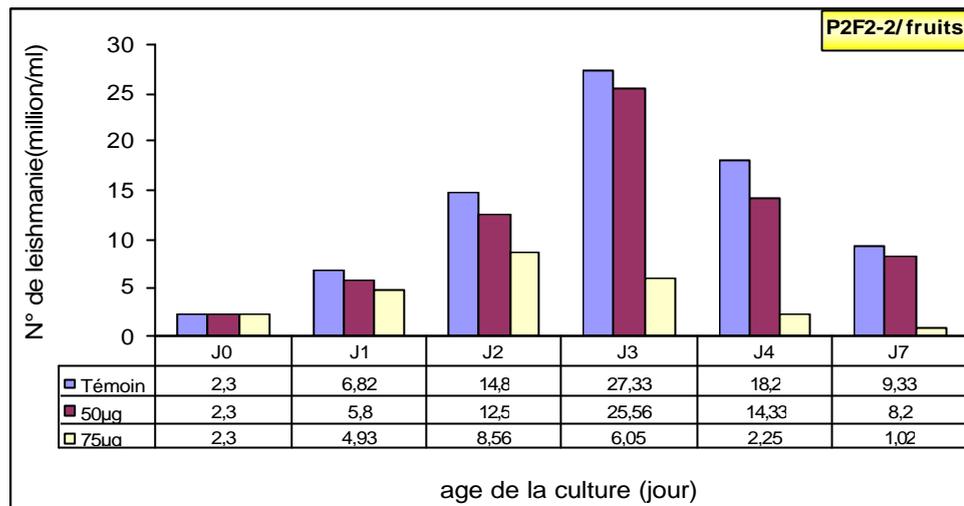
**Figure n°57:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).



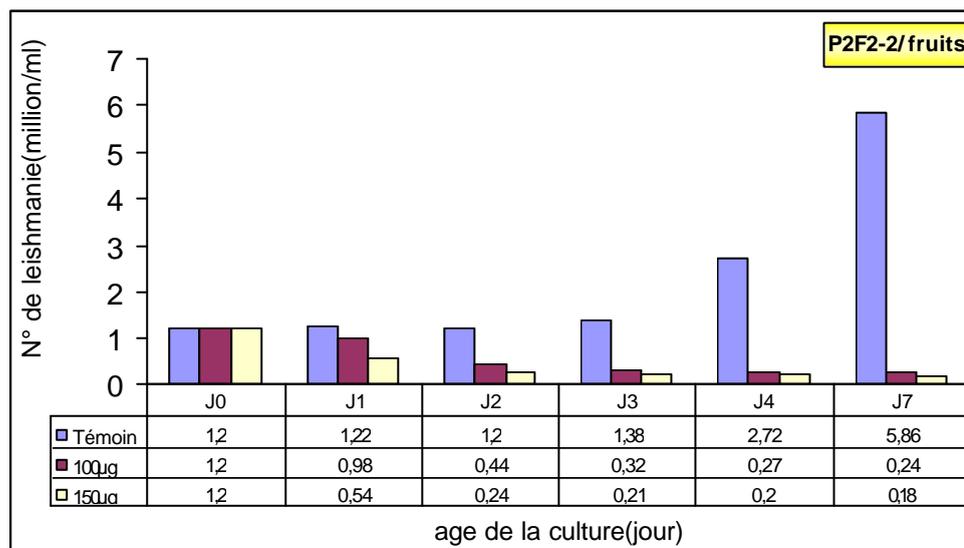
**Figure n°58:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Les résultats du deuxième essai, confortent ceux du premier. Les extraits lipidiques des fruits matures de Ain Oussera sont beaucoup moins actifs que les extraits phénoliques des feuilles. En effet les extraits lipidiques ne montrent une action inhibitrice efficace qu'à la concentration de 75µg/ml (Figure n°57), alors qu'elle est à 4µg/ml pour les phénols. C'est la seule concentration qui a montré une activité inhibitrice constante au cours des deux phases du cycle biologique de leishmania. Quant à la dose cytotoxique elle est de 100µg/ml (Figure n°58).

### 3-Extrait lipidique P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub>



**Figure n°59:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

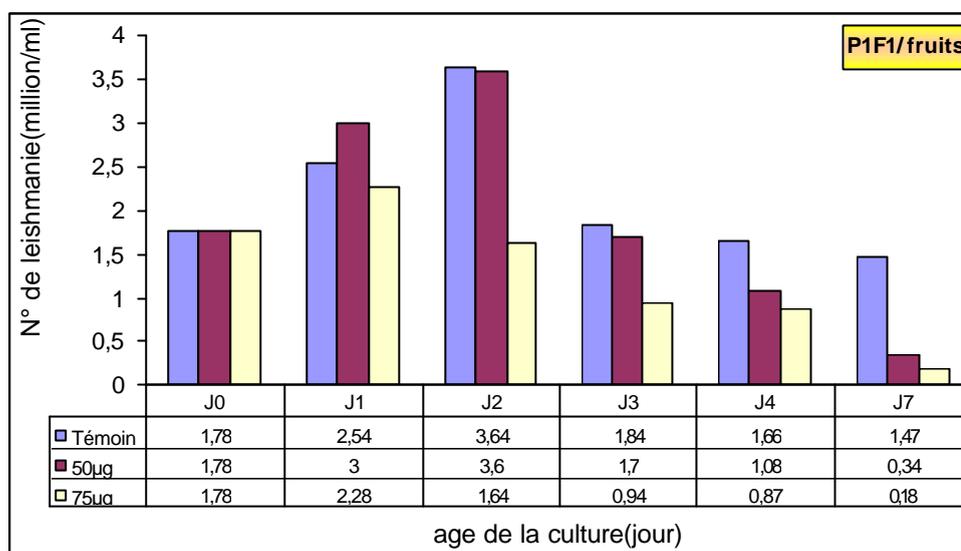


**Figure n°60:** Numération de *L. infantum* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

Les résultats des extraits lipidiques des fruits immatures de Ain Oussera sont similaires à ceux des fruits matures par conséquent la concentration minimale effectrice est de 75µg/ml (Figure n°50) et la dose cytotoxique est de 100µg/ml (Figure n°60).

## II.4.2.2 Effets des extraits lipidiques sur *L. major*

### 1-Extrait lipidique P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub>

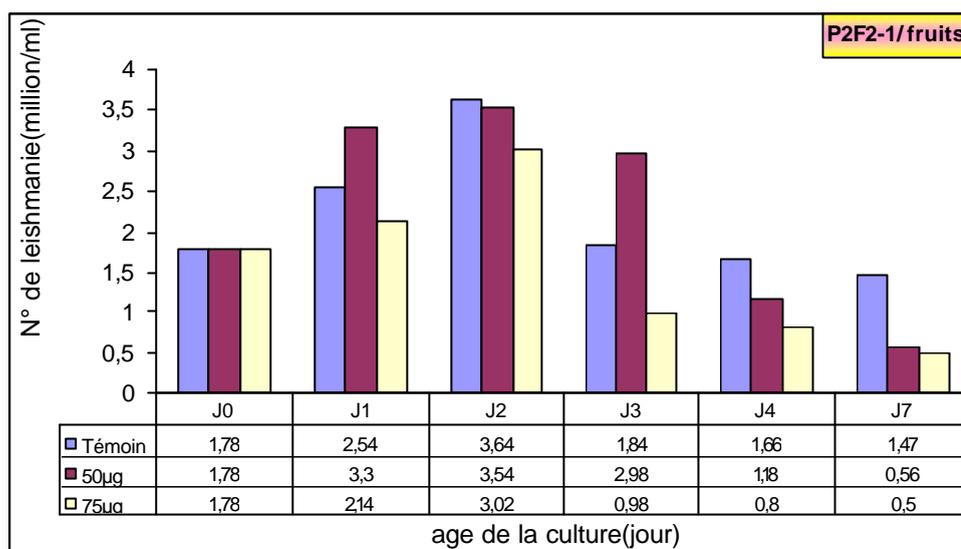


**Figure n°61:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

Les histogrammes ci-dessus (Figure n°61) montre bien que seule la concentration de 75µg/ml possède un effet inhibiteur de la croissance des leishmanies au cours des deux phases du cycle biologique. Par contre avec la concentration de 50µg/ml les leishmanies évoluent de la même façon que le témoin jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour de culture où on voit nettement l'inhibition de la croissance.

Nous avons retenu comme concentration minimale effectrice 75µg/ml qui a montré une activité antileishmanienne constante durant tout le cycle.

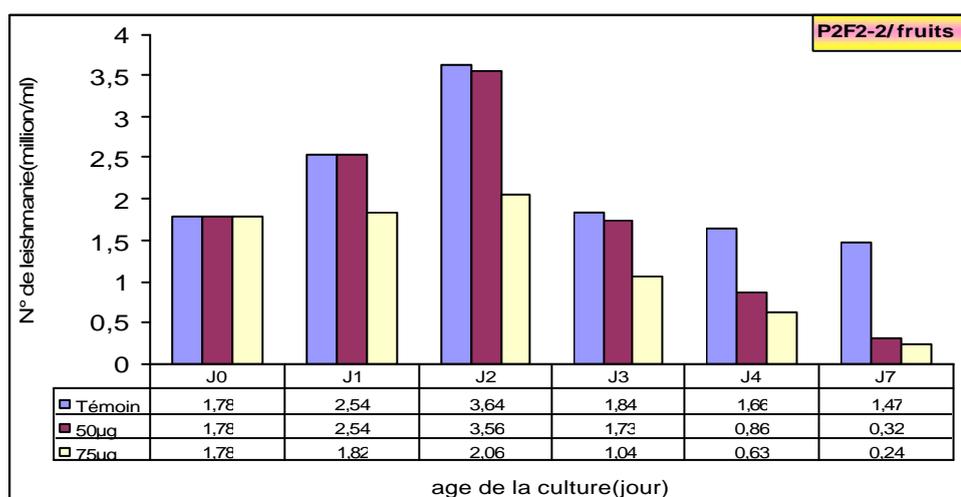
## 2-Extrait lipidique P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub>



**Figure n°62:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-1L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

Les extraits lipidiques des fruits matures de Ain Oussera donnent des résultats similaires aux extraits lipidiques de fruits matures de Laghouat. Par conséquent la concentration minimale effectrice est de 75 µg/ml (Figure n°62). Elle a assuré une inhibition de la prolifération durant les deux phases du cycle biologique des leishmanies et comparativement au témoin.

## 3-Extrait lipidique P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub>

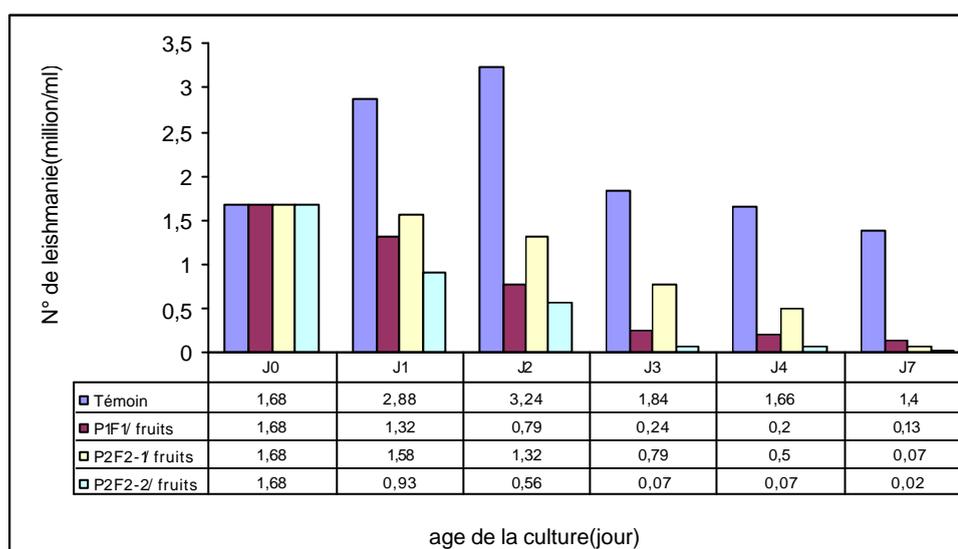


**Figure n°63:** Numération de *L. major* en présence de différentes concentrations de l'extrait lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub> en fonction de l'âge de la culture (Concentration minimale effectrice).

Concernant les lipides des fruits immatures de Ain Oussera, ils ont la même activité que ceux des fruits matures. Il en découle que la concentration minimale effectrice est de 75µg/ml (Figure n°63).

Ayant remarquer que pour l'ensemble des extraits lipidiques, la concentration minimale effectrice était la même, nous avons regroupé l'ensemble des extraits lipidiques des fruits (mature et immature) et nous les avons testé à une concentration qui est de 100µg/ml (Figure n°64).

Les résultats figurent dans l'histogramme ci-dessous. À cette concentration, l'ensemble des extraits montre une activité cytotoxique. Cette cytotoxicité est plus importante pour l'extrait de fruits immatures de Ain Oussera suivie de l'extrait de fruits matures de la même région et enfin l'extrait de fruits matures de Laghouat. Mais cette différence n'est pas significative.



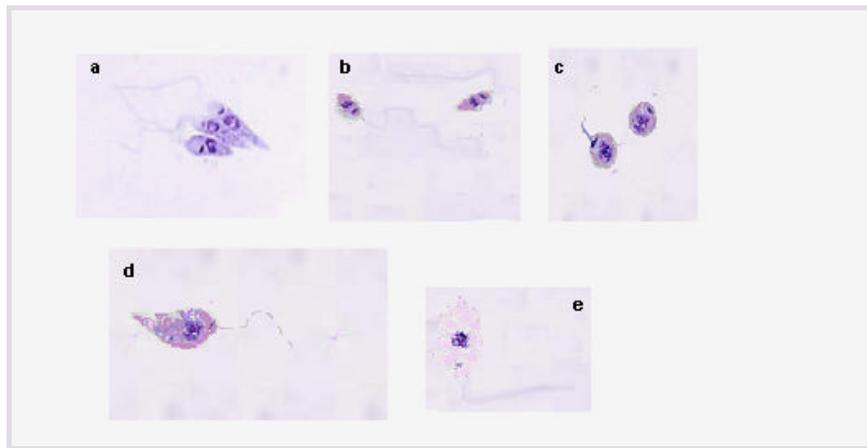
**Figure n°64:** Numération de *L. major* en présence de 100µg des extraits lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica* en fonction de l'âge de la culture (Concentration cytotoxique).

L'effet cytotoxique sur les leishmanies a été étudié par une observation microscopique, une goutte de la culture a été examinée entre lame et lamelle en microscope ordinaire, ainsi qu'un frottis coloré au Giemsa. Les éléments au quels nous avons accordé un intérêt sont :

- La mobilité de la leishmanie : signe de viabilité.
- La morphologie générale.

Aussi bien pour l'effet des phénols que les lipides sur, *L. infantum* et *L. major*, nous avons observés les anomalies suivantes par rapport au témoins (Figure n°65/a) :

- Taille réduite : un corps ramassé avec un flagelle long ou frisé (Figure n°65/b).
- Forme ovoïdes très granuleuse avec un flagelle court épais et parfois absent rappelant les formes amastigotes (Figure n°65/c).
- forme à contour irrégulier : on note une discontinuité de la membrane cytoplasmique et du flagelle et même de la membrane nucléaire et donc le noyau devient lâche (Figure n°65/d).
- forme dépourvue de la membrane cytoplasmique donnant l'aspect d'un cytoplasme en dispersion (Figure n°65/e).



**Figure n°65:** Morphologie des formes promastigote à des doses toxiques d'extraits comparativement au témoin (Lames colorées au Giemsa grossissement X 100).

Afin de synthétiser nos résultats nous avons dressé un tableau comparatif (Tableau XIII) entre les différents extraits et leurs activités sur les deux espèces de leishmania:

**Tableau XIII:** Intervalles de concentrations Effectrices des différents extraits de *Pistacia Atlantica* sur *L .Infantum* et *L .major*

Extraits	Intervalle de Concentrations Effectrices µg/ml	
	<i>L .Infantum</i>	<i>L .major</i>
<b>Polyphénols de feuilles</b>		
<b>P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pf</b>	[20, 100]	[10, 100]
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>pf</b>	[4, 20]	[2, 20]
<b>P<sub>2</sub>M<sub>pf</sub></b>	] 50, 100]	[50 , 100]
<b>Polyphénols de fruits</b>		
<b>P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>pg</b>	[50, 100]	[50 , 100]
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub>pg</b>	[150, 200[	[50 , 100]
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2-2</sub>pg</b>	[10, 100]	[2, 20]
<b>Les lipides</b>		
<b>P<sub>1</sub>F<sub>1</sub>L</b>	[75 , 100]	[75 , 100]
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub>L</b>	[75 , 100]	[75 , 100]
<b>P<sub>2</sub>F<sub>2-2</sub>L</b>	[75 , 100]	[75 , 100]

A partir des ces donnés on retient que tous les extraits testés montrent une activité antiproliférative mais à des doses différentes sur la forme promastigote des leishmanies (*L .infantum* et *L.major*). Ainsi la sensibilité des deux souches n'est pas la même pour le même extrait.

Les extraits phénoliques (extrait de feuilles et extraits de fruits) de la femelle de Ain Oussera **P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>** donnent les meilleurs résultats d'inhibition de la prolifération. Cette inhibition est plus importante avec les feuilles (**P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>pf**) qu'avec les fruits et encore plus importante avec les fruits immatures (**P<sub>2</sub>F<sub>2-2</sub>pg**) par rapport aux fruits matures (**P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub>pg**).

De même pour les extraits phénoliques de l'individu de Laghouat, l'activité d'inhibition est plus marquée pour les feuilles que pour les fruits.

On comparant les résultats d'inhibition de la croissance en présence de l'extrait phénolique de feuilles du pied male, on note qu'ils ont la même activité sur les deux souches de leishmania, mais qui est moindre comparativement aux extraits phénoliques des pieds femelles.

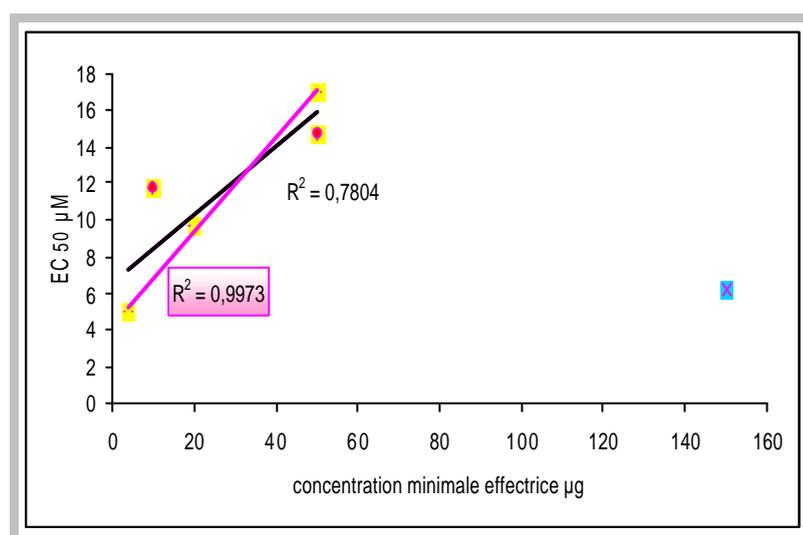
Concernant les pieds femelles, celui de Ain Oussera, a une activité antiproliférative plus importante, 5 fois plus importante que celui de Laghouat sur chaque souche).

Quant aux lipides, ils ont une activité moindre sur les deux souches comparativement aux extraits phénoliques. Bien que la concentration minimale effectrice soit la même pour les même pour l'ensemble des lipides, l'action antiproliférative différent d'un extrait à l'autre au regard des histogrammes.

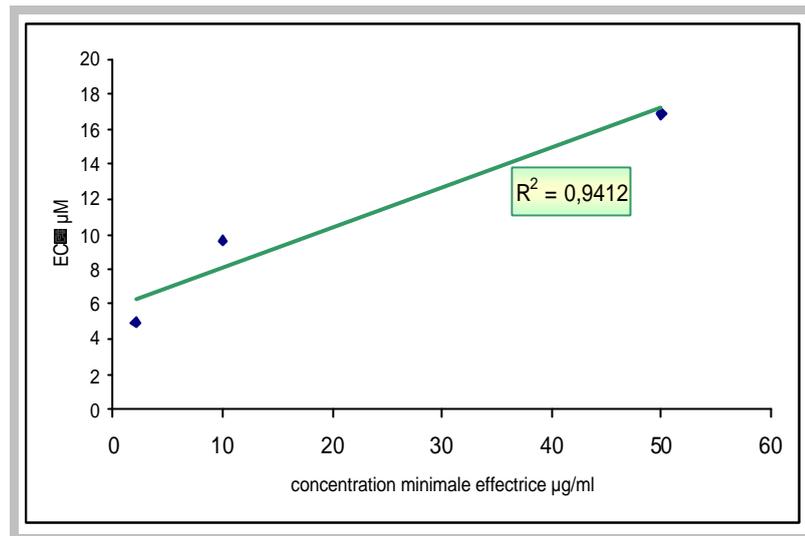
Nous avons ainsi retenu que l'extrait lipidique **P<sub>2</sub>F<sub>2-2L</sub>** est plus actif que **P<sub>2</sub>F<sub>2-1L</sub>** et de **P<sub>1</sub>F<sub>1L</sub>**.

On comparant l'activité des extraits phénoliques sur les deux souches, on se rend compte que la concentration minimale effectrice sur *L .major* est deux fois plus faible que sur *L .infantum*. Par conséquent *L .major* serait plus sensible.

D'après les résultats fournis dans l'analyse du pouvoir antioxydant on a pu constate que l'activité antioxydante varie en fonction de la composition de chaque extrait. A cet effet, nous avons tenté de trouver une corrélation entre l'activité antioxydante et l'activité antileishmanienne. Les figures n°66 et if67 représentent la variation des valeurs d'EC<sub>50</sub> des composés phénoliques en fonction de leur Concentrations effectrices minimales.



**Figure n°66:** Variation des valeurs de EC<sub>50</sub> des composés phénoliques en fonction des concentrations effectrices minimales sur *L .infantum*.



**Figure n°67:** Variation des valeurs de EC<sub>50</sub> des composés phénoliques de feuilles en fonction des concentrations effectrices minimales sur *L. major*.

A partir des tracés figurés dans le schéma précédent, on distingue deux corrélations positives entre les deux types d'activités (pour *L. infantum*) l'une entre l'ensemble des extraits phénoliques étudiés à l'exception de l'extrait de fruits **P<sub>2</sub>F<sub>2-1</sub>** (avec un  $R^2 = 0,78$ ) et l'autre entre les extraits des feuilles uniquement mais avec un coefficient de corrélation plus important ( $R^2 = 0,9973$ ) (Figure n°66). Par contre on trouve une seule corrélation pour *L. major* ce, dans les extraits phénoliques des feuilles avec coefficient corrélation aussi important ( $R^2 = 0,9412$ ) (Figure n°67).

De ce fait, on peut avancer l'hypothèse que l'activité antileishmanienne est due aux mêmes molécules antioxydantes présentes dans les extraits et que la structure la plus répandue ( $\lambda = 218\text{nm}$ ;  $\lambda = 276\text{nm}$ ) est la responsable de cette activité, surtout pour les feuilles. En outre l'activité antileishmanienne des flavonoïdes dépend des mêmes facteurs qui influent sur l'activité antioxydante. À savoir la position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles (OH) (Tasdemir et al., 2006).

Dans le cas des lipides cette corrélation est absente. L'activité des lipides dépend des structures minoritaires communes ou individuelles (stérols, d'autres isoprène tels que l'huile essentielle présente dans l'huile brute).

L'étude comparative de la teneur en polyphénols totaux et en thiocyanates du *L. pieper betle*, montre que la différence de pigmentation des feuilles influence sur la teneur des composés étudiés et sur l'activité antifilarienne et antileishmanienne des extraits (Shweta et al., 2006).

C'est le cas pareil de *Pistacia atlantica* de Ain Oussera, où on observe la forte pigmentation de leurs échantillons de feuilles et de fruits, en effet ils possèdent la forte activité antioxydante et antileishmanienne aussi.

À notre connaissance, il s'agit de la première mention de l'activité antileishmanienne *in vitro* des composés phénoliques et lipidiques de *Pistacia atlantica*. En effet, des extraits organiques (éther de pétrole, chloroforme) d'Evanta ou *Galipea longiflora* (Rutacées) se sont montrés actifs sur trois espèces de Leishmania (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. donovani*) à des concentrations allant de 25 à 100 µg/ml (Fournet et al., 1992). Ces concentrations paraissent nettement supérieures à celle que nous avons trouvés leishmanicide (surtout si on parle de polyphénols de feuilles **P<sub>2</sub>F<sub>2</sub>**), ce qui montre l'intérêt de cette plante. De même, des extraits aqueux et de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*, se sont montrés actifs vis-à-vis des formes promastigotes de Leishmania (*L. major* *L. tropica*) à des concentrations comparables aux nôtres, allant de 4 à 20 µg/ml (Hatimi et al., 2000).

*Conclusion*

La présente étude a pour objectif l'étude de *Pistacia atlantica* provenant de deux régions de sud algérien (Laghouat et Ain ouassera) à travers leurs teneurs en composés phénoliques, et en lipides puis à l'étude de l'activité antioxydante et antileishmanienne de ces composés.

Les résultats obtenus dans l'analyse quantitative des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes), nous laissent à constater que cette plante est une source prometteuse de polyphénols surtout les feuilles. La variation de la teneur en polyphénols totaux entre les différents individus est importante pour les échantillons de feuilles, au contraire cette variation pour les échantillons des fruits est moins importante. En parallèle cette variation pour la teneur en flavonoïdes d'un individu à l'autre que se soit femelle ou male est moins importante par rapport à celle des phénols totaux. En conséquence la quantité de différents composés phénoliques existants dans les feuilles et les fruits constitue un caractère spécifique pour chaque individu étudié de *Pistacia atlantica*.

Le fruit est relativement riche en matières grasses. La variation de la quantité de ces composés est minime, quoique l'analyse quantitative des fractions insaponifiables (stérols totaux et tocophérols totaux), montre que ces derniers ont une variabilité importante. Aucune corrélation positive n'a été détectée entre la teneur en huile et ses fractions étudiées donc la teneur en lipides ainsi ses fractions constitue un caractère spécifique pour chaque individu étudié *Pistacia atlantica*.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test du DPPH comme test chimique et le test de l'AAPH comme test biologique, a révélé une réponse antioxydante variable d'un échantillon à un autre.

Le balayage de spectre UV des extraits phénoliques reflète une variabilité qualitative et quantitative selon les marqueurs bio-organiques choisis (polyphénols totaux et flavonoïdes), donc on peut prédire les techniques de dosage utilisés pour ces composés sont fiables, et montre que le classement des extraits phénoliques en fonction de leur pouvoir antioxydant dépend principalement de leurs fractions majoritaires communes pour les extraits de feuilles ( $\lambda = 218\text{nm}$ ;  $\lambda = 276\text{nm}$ ).

Dans le cas des lipides, nous avons trouvé une corrélation linéaire entre la valeur d' $EC_{50}$  et la teneur en stérols totaux ( $R^2=0.80$ ) et en tocophérols totaux donc l'activité

antioxydante des lipides dépend principalement de ces composés antioxydants et de leurs concentrations.

De point de vue comparative les pieds de *Pistacia atlantica* de Ain Oussera sont plus riches en composés phénoliques surtout les feuilles

Les lipides et les flavonoïdes sont des bons marqueurs génétiques pour l'étude de variabilité biogénétique de *Pistacia atlantica* dans différents écotypes.

Enfin, l'étude de l'activité antileishmanienne *in vitro* montre que tous les extraits testés montrent une activité inhibitrice importante et à des doses différentes sur la forme promastigote des leishmanies (*L. infantum* et *L. major*).

La contribution des molécules antioxydantes dans l'activité antileishmanienne est probable par la forte corrélation surtout pour les extraits des feuilles ( $R^2 = 0,99$  pour *L. infantum*, et  $R^2 = 0,94$  pour *L. major*).

À notre connaissance, il s'agit de la première mention de l'activité antileishmanienne *in vitro* des composés phénoliques et lipidiques de *Pistacia atlantica*, donc ces résultats importants nous encouragent de sélectionner cette plante comme une source prometteuse pour des études chimiques approfondies afin de caractériser les molécules naturelles responsables à cette activité. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

-Il reste encore beaucoup de plantes locales utiles qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leur potentialité dans les domaines étudiés.

-La multiplication du nombre d'essais *in vitro* vis-à-vis d'autres espèces de *Leishmania*,

- L'étude de la cytotoxicité des extraits, car de très nombreuses substances naturelles montrent une activité antileishmanienne résultant d'une forte toxicité et sont donc inutilisables en pratique,

- La réalisation d'essais *in vitro* sur le modèle amastigotes macrophages, plus proches de la forme des parasites retrouvée chez l'hôte vertébré et l'homme en occurrence.

*Références  
Bibliographiques*

## *Références bibliographiques*

- 1- Amstad P., A. Peskin, G. Shah, M.E. Mirault, R. Moret, I. Zbinden et P. Cerutti (1991). The balance between Cu-Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry*, **30**: 9305.
- 2- Arevalo I., B. Ward, R. Miller, T.C. Meng, E. Najjar, E. Alvarez, G. Matlashewski et A. Llanos-Cuentas (2001). Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases*, **33**: 1847-1851.
- 3- Association Française de Normalisation (AFNOR) (1984). Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérivés, 3<sup>ème</sup> Ed : AFNOR, 60.
- 4- ANOFEL (2005). C@mpus National de Parasitologie-Mycologie TICEM – UMVF.
- 5- Baba Aissa F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed : EDAS., 217.
- 6- Bachi F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. **21**(n°1) : 9-15
- 7- Bahorun T. (1996). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice.
- 8- Barreto B. et M. Carmo (2005). Lipid Extraction and Cholesterol Quantification: A Simple Protocol. *J. Chem and JCE Online Educ.*, **82**: 103-104;
- 9- Belhadj S (2003). Les Pistacheraies Algériennes : Etat actuel et dégradation. Centre Universitaire de Djelfa., 107-109.
- 10- Belhadj S., A. Derridj , T. Aigouy , C. Gers , T. Gauquelin et JP. Mevy (2007). Comparative morphology of leaf epidermis in eight populations of Atlas Pistachio (*Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae). *Microsc Res Tech.* Oct; **70**(10):837-46.
- 11- Belkaid Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro et D.L. Sacks (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of Experimental Medicine*, **188**: 1941-1953.
- 12- Benard C., H. Gautier, M. Génard , J. Le bot, JL Poëssel, INRA Avignon, S. Lanteri, Univ. Turin (IT) et L Urban (2007-2008). INRA Corse. Equipe Métabolites Secondaires Projet innovant INRA.

- 13- Blois E. (1958). Déterminations antioxydantes de Ms. par l'utilisation d'un radical libre stable, *Nature*, **181** : 1199-2000.
- 14- Blond J.P. (1993), *Corps .Gras, Rev .Fr.* **40**(3-4):113-20.
- 15- Brasseur L., P. Théron et Legrand. A (1995). Pouvoir antioxydant total du plasma, *Act Pharm Biol Clin*, **8** : 239-244.
- 16- Bracke M., B. Vyncke, G. Opdenakker, J.M. Foidart, G. De Pestel et Mareel M. (1991). Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis*, **9**:13- 25.
- 17- Bronner W.E. et G.R. Beecher (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, **705**: 247-256.
- 18- Brunton J. (1987). *Elément de phytochimie et de pharmacologie*, Ed : Lavoisier 156-407.
- 19- Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie, Photochimie, Plantes Médicinales*, Tec et Doc, Ed : Lavoisier, Paris, 915.
- 20- Brunton J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.*, Paris: Editions médicales internationales (3ème éd.), Ed : Tec & Doc Lavoisier, 1120.
- 21- Buates S. et G. Matlashewski (2001). General Suppression of Macrophage Gene Expression during *Leishmania donovani* Infection. *Journal of Immunology*, **166**: 3416-3422.
- 22- Cao G.H., H.M. Alessio, et R.G. Cutler (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants, *Free Radic. Biol. Med*, **14**: 303-311.
- 23- Carillon E. (2000). *La phytothérapie face à l'évolution médicale*, Ed : phyto., 10-15.
- 24- Chappuis F., S. Rijal , A. Soto, J. Menten et M.B. Boelaert (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis , *Méd. Vét.*, **145**: 315-324.
- 25- Chen Lui K.C.S., S.S. Lee, J.F. Chiou et E. Ren (1999). *Science et Lien*, E.J, **65** : 43- 46.
- 26- Chu S.C., Y.S. Hsieh et Lin J.Y (1992). Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod.*, **55**: 179-183.
- 27- Chaudhry P.S., J.Cabrera, H.R. Juliani et S.D. Varma (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol*, **32**:1995.
- 28- Cos P., L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B. Van-Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck Vanden et D. Berghe (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*, **61**: 71-76.
- 29- Crozier A., E. Jense, M.E.J. Lean et M.S. McDonald (1997). Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatography A*, **761**: 315-321.

- 30- Cuendet M. (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie: "Fagraea blumei" (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude: "Bartsia alpina" (Scrophulariaceae), "Loiseleuria procumbens" (Ericaceae) et "Camp, Thèse de doctorat, 24.
- 31- Cuvelier C., O. Dotreppe et L. Istasse (2003). Chimie, Sources alimentaires et dosage de la vitamine E, Méd. Vét., **147**: 315-324.
- 32- Daneshrad A et Y. aynehchi (1980). Chemical Studies of the Oil Pistacia Nuts Growing Wild in Iran. Oil Chem. Soc., **57** : 248-249.
- 33- Decaux I. (2002) Phytothérapie: mode d'emploi, Ed : Le Bien Public, 6-7.
- 34- Di Carlo G., N. Mascolo, A.A. Izzo et F. Capasso (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. Life Sci, **65**: 337-53.
- 35- Djeridane A., M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker et N. Vidal (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, **97**(4): 654-660.
- 36- Duthie G.G., B.M. Gonzalez, P.C. Morrice. et J.R. Arthur. (1991). Free Rad. Res. Comms, **15**, 35-40.
- 37- Dymock P. (2000). La quinzième conférence internationale sur le tournesol, Oléagineux. Corps grAs. Lipides, **3** :237-242.
- 38- El Atyqy M. (2007). Chimie alimentaire/ Mozilla Firefox : [www.azaquar.com](http://www.azaquar.com).
- 39- Emmerie A., Engel (1939), C., Rec. Trav. Chim, **58**: 283-289.
- 40- Ernster L et K. Nordenbrand (1967). Microsomal lipid peroxidation, Methods enzymol, **5**: 574-580.
- 41- Fabre Jean (1993). souvenirs entomologiques, Pucerons du térébinthe - Galles, VIII<sup>ème</sup> Série, Chapitre 10 : « [http://fr.wikipedia.org/wiki/Pistachier\\_lentisque](http://fr.wikipedia.org/wiki/Pistachier_lentisque) ».
- 42- Fahy E., S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Jr. Merrill, R.C. Murphy, C.R. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum et E.A. Dennis (2005). A comprehensive classification system for lipids, J Lipid Res., **46**(5):839-861.
- 43- Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, **17**:501-512.
- 44- Fouché J.G., A. Marquet et Hambuckers A (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament, Exposition temporaire du 19.09. au 30.06.2000.

- 45- Fournet A., R. Hocquemiller, F. Roblot, A. Cave, P. Richomme et J. Bruneton (1992). Les chimanines, nouvelles quinoléines substituées en 2, isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire : *Galipea longiflora*. *J Nat Prod*, **65** :1547-1552.
- 46- Fournet et Muñoz A.V. (2002). Natural Products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**:1213-1235.
- 47- Ganguly N.K. (2002). Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis: The potential impact of miltefosine on visceral leishmaniasis in India. *TDRnews* , **68** :2.
- 48- Goffart Alain., Remacle Marie-Sylvie et Scoubeau Olivier (2002). La nature nous en fait voir de toutes les couleurs ; Université Catholique de Louvain Festival des Sciences – UCL, LLN.
- 49- Graham T.L. (1998). Flavonoid and flavonal glycoside metabolism in arabidopsis. *Plant physiol and biochem*, **36**(1-2): 135-144.
- 50- Greenblatt C.L. (1980). The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. *Progress in Clinical and Biological Research*, **47**:259-285.
- 51- Groggl M., T.N. Thomason, et ED. Franke (1992). Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and muco-cutaneous disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **47**:117–126.
- 52- Guerin P.J, P. Olliaro, S. Sundar, M. Boelaert, S.L. Croft, P. Desjeux, M.K. Wasunna et A.D.M. Bryceson (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Diseases*, **2**: 494-501.
- 53- Guignard J.L., L. Cosson et M. Henry (1985). *Abrégé de Phytochimie*. Ed:Masson, Paris, 121-150.
- 54- Guignard .J.L. (1996). *Biochimie Végétale*, Ed :Masson, Paris, 255.
- 55- Hadj-hassan et M. Kardouch (1995). Status of Pistachio nut cultivation in Syria. Dans : First International Symposium on Pistachio nut, ISHS, Adana, Turquie. Kaska,N., Küden, A. B., Ferguson, L. et Michailides, T. (éds). *Acta Horticulturae*, **419** :221-227.
- 56- Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, **52**: 253-265.
- 57- Handman E., R.E. Hocking, G.F. Mitchell et T.W. Spithill (1983). Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica* .*Molecular and Biochemical Parasitology*, **7**: 111–126.
- 58- Handman E. (2001). Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews* **14**: 229.

- 59- Harborne J.B. (1975). *The Flavonoids*, Mabry, T.M., Mabry H. Eds: Chapman et Hall, London.
- 60- Haslam E. (1989). *Plant Polyphenols: Vegetables Tannins Revisited*, Cambridge University Press, Cambridge, **32**:1-13.
- 61- Hatimi S., M. Boudouma , M. Bichichi , Chaib et N. Guessous Idrissi (2000). Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. Manuscrit n° **2162**. "Thérapeutique".
- 62- Heller W et G. Forkmann (1993). *The Flavonoids, Advances in research since 1986*, Éd; J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, 499-535.
- 63- Hertog M.G.L., E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan et D. Kromhout (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. **342**:1007-1011.
- 64- Hertog M.G.L et P.C.H. Hollman (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **40**:1591-1598.
- 65- Hollman P.C.H., Hertog M.G.L et M.B. Katan (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, **57**:43-46.
- 66- Iserin Paul (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*, Ed. Larousse-Bordas Paris, 14
- 67- Izzo A. (1996). PAF and the digestive tract. A review. *J Pharm Pharmacol.*, **48**: 1103-11.
- 68- Amiot J. (2005). *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de Doctorat en Biologie des Populations et Ecologie. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, 136.
- 69- Kamhawi S., Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton. et D. Sacks (2000). Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*, **290**: 1351 - 1354.
- 70- Karleskind A. (1992). *manuel des corps gras*, Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 116-226.
- 71- Kaska N., S. Caglar , et S. Kafkas (1996). Genetic diversity and germplasm conservation of pistacia species in Turkey. Dans: Workshop 'Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources', Palermo, Italie. Padulosi, S., Caruso, T. et Barone, S. (éds). IPGRI, ROMA, **2** :46-50.
- 72- Kellal A. (1980). Possibilité de culture et délimitation des zones à vocation de pistachier en Algérie. *Fruits*, **35**:177-185.

- 73- Kellina O.I. (1981). Problems and current lines in investigations on the epidemiology of leishmaniasis and its control in the USSR. *Bulletin of the Society for Pathological and Exotic Filiales* , **74**: 306–318.
- 74- Khaldi A et Mk. khouja (1996). Atlas pistachio (*Pistacia atlantica* desf.). North Africa taxonomy, geographical distribution, utilisation and conservation. Dans: Workshop‘Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources’,Palermo, Italie. Padulosi, S., Caruso, T. et Barone, S. Ed :IPGRI, ROMA, 57-62.
- 75- KI Won Lee, Young Jun Kim, Hyong Joo Lee et Chang Yong Lee (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, **51**: 7292-7295.
- 76- Killick-Kendrick R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 1-24.
- 77- Kooter I.M., R.A. Steiner, B.W. Dijkstra, P.I. van Noort, M.R. Egmond et M.Epr. Huber (2002). Characterization of the mononuclear Cu-containing *Aspergillus japonicus* quercetin 2,3-dioxygenase reveals dramatic changes upon anaerobic binding of substrates. *Eur. J.Biochem.* **269** :2971-2979.
- 78- Landolfi R., R.L. Mower et M. Steiner (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol.* **33**:1525-1530.
- 79- Larocca L.M., M. Giustacchini, N. Maggiano, F.O. Ranelletti, M. Piantelli, E. Alcini. et A. Capelli (1994), Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *J Urol.* **152**: 1029-1033.
- 80- Lesgards .J.F. (2000). Contribution à l’étude du statut antioxydant de l’homme ; aspect chimiques et biochimiques .Thèse de doctorat, 19-20.
- 81- Li C., C.D. Oldham et S.W.N. May (1994).N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine ? -amidating mono-oxygenase catalysis, *Biochem. J.*, **300**: 31–36.
- 82- Li Peiwu, Anu Hopia, Jari S, Teijo Yrjönenand et Heikki Vuorela (1999). TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology, *Chemistry and Nutrition*, **10**: 123-187.
- 83- Lisu Wang, Jui-Hung Yen, Hsiao-Ling Liang et Ming-Juan Wu1 (2003). Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.) .*Journal of Food and Drug Analysis*, **11**(1): 60-66.?

- 84- Lovelace J.K et M. Gottlieb (1986). Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **35**:45-47.
- 85- Lovelace J.K., D.M. Dwyer et M. Gottlieb (1986). Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. Molecular and Biochemical Parasitology, **20**: 243-251.
- 86- Loup Jean Lemesre (2006). Mise au point d'un vaccin canin contre la leishmaniose viscérale : Chercheur IRD – UR 08 « Pathogénie des Trypanosomatidés » Jean-Loup Lemesre : J-Loup.Lemesre@mpl.ird.fr.
- 87- Maamri S., F. Djireb(2005). Effet des extraits phénoliques de quelques plantes médicinales locales sur la carboxylesterase. Mémoire de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie Option : Génie Biologique.
- 88- Magin D.V., G. Lewin, I.N. Popov, D. Izmailov Yu et A. Vladimirov Yu (2000). Photochemiluminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems, Mathematic modeling, **46**: 419.
- 89- Makimura M., M. Hirasawa, K. Kobayashi, J. Indo, S. Sakanaka, T. Taguchi et S. Otake (1993). Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. J Periodontol. **64**:630-636.
- 90- Marfak A. (2002). Radiolyse gamma des flavonoides. etude de leur reactivite avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides Sánchez-moreno.C, Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, Food Science and Technology International, **3**:80.
- 91- Marian Naczka et Fereidoon Shahidi (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, **1054**:95–111.
- 92- Marlène Frènot et Elisabeth Vierling (2001). biochimie des aliments diététique du sujet bien portant 2<sup>e</sup> édition doin éliteur cndp centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine.
- 93- Maurice Nicole (1997). De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI<sup>e</sup> siècle, Ed : Lavoisier, Paris, 12-14.
- 94- Mazza G et E Miniati (1993) “Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains”, C.Press, Boca Raton, **362**.12-18.
- 95- McConville M.J., L.F. Schnur, C. Jaffe et P. Schneider (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. Biochemical Journal, **310**: 807-818.

- 96- McConville MJ et J.E. Ralton (1997). Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Institute Mitt.* , **99**: 34-43.
- 97- McMaster W.R., C.J. Morrison, M.H. MacDonald et P.B. Joshi (1994). Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology*. **108**:29-36.
- 98- Modabber F. (1995). Vaccines against leishmaniasis. *Annals in Tropical and Medical Parasitology* , **89** : 83–88.
- 99- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, **26**(2): 211-219.
- 100- Monastra F, M. Rovira , F.J. Vargas, M.A. Romero, I. Battle, D. Rouskas et A. Mendes Gaspar (2000). Caractérisation isoenzymatique de diverses espèces du genre pistacia et leurs hybrides : Etude de leur comportement comme portegreffe du pistachier pistacia vera L. Ed : CIHEAM-Options Méditerranéennes; 135.
- 101- Monjauze A. (1980). Connaissance du bétoum Pistacia atlantica Desf. *Biologie et forêt. Revue Forestière Française*, **4** :357-363. 9313.
- 102- Naït Said Nadia (2007). Etude phytochimique des l'extraits chloroformiques des plantes *Pituranthos chlorantus* et *Marrubium vulgare*, *Memoir de magister en chimie organique*, 85-86.
- 103- Naudet M. (1992) .Manuel des corps gras, Tome1. Ed : Technique et Documentation Lavoisier, Paris.43-45.
- 104- Oka T., F.J. Simpson, J.J. Child et C. Mills (1972). Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Purification of the dioxygenase quercetinase. *Can. J. Microbiol.*, **17**: 11-118.
- 105- Ong K.C et H.E. Khoo (1997). Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol* **29**:121-126.
- 106- Ong K.C et H.E. Khoo (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci* **67**: 1695-1705.
- 107- Quideau S et K.S. Feldman (1996). *Chemical Reviews*, **96**: 475-503.
- 108- Paquot C., J. Mercier, A. Mathieu, D. Lefort et Perron R (1962) .Méthodes analytiques des Lipides Naturels, Ed. CNRS, paris.
- 109- Papadopoulou B., G. Roy, M. Breton, C. Kundig, C. Dumas, I. Fillion, AK. Singh, M. Olivier. et M. Ouellette (2002). Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* biopterin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infection and Immunity*, **70**: 62-68.
- 110- Paris M et M. Hurabeille (1981). *Abrégé de matière médicale*, Ed : Masson, 82-101.

- 111- Pimenta P.F.P., E.B.B. Saraiva et Sacks DL (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, **72** : 191-204.
- 112- Pinto M.C., D.H. Campbell-Lendrum, A.L. Lozovei, U .Teodoro et C.R. Davies (2001). Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 132-139.
- 113- Polnoveski M., P. Boulanger, J. Polonovski, F. Tâyeau, P. Mandel, et G. Biserte (1977). *Biochimie médicale* tome1 édition Masson, 133-165.
- 114- Proudfoot L.S et M.J. Onville (1995). Biosynthesis of the glycolipid anchor of lipophosphoglycan and the structurally related glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. *Biochemical Journal*, **308**:45-55.
- 115- Puentes SM., R.P. Da Silva, D.L. Sacks, C.H. Hammer. et K.A. Joiner (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology*, **145**, 4311-4316.
- 116- Rakipov N. (1987). *Biochimie des cultures tropicales*, Ed: Mir, 151-165.
- 117- Richter G. (1993). *Métabolisme des végétaux. Composés phénoliques*, Ed: ISBN.317-337.
- 118- RivierD., P. Bovay, R. Shah, S. Didisheim et J. Mauel (1999). Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. *Parasite Immunology*, **21**:461-473.
- 119- RivierD., R. Shah, P. Bovay et J. Mauel (1993). Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioat-tenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunology*, **15**: 75-84.
- 120- Roberts L.S., J.J. Janovy, D. Gerald, Schmidt et S. Larry Roberts (2000). *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Higher Education, Boston.
- 121- Russo D.M., J.M.J. Burns, E.M. Carvalho, R.J. Armitage, K.H. Grabstein, L.L. Button, W.R. McMaster et S.G. Reed (1991). Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. *Journal of Immunology*, **147**.333-389.
- 122- Sacks D. et S. Kamhawi. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Reviews in Microbiology*, **55**:453-483.
- 123- Scalbert Augustin (2004). *Fruits et légumes, polyphénols et santé*. Laboratoire des maladies métaboliques et micronutriments, INRA, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand.
- 124- Schneider P., J.P. Rosat, J. Bouvier, J. Louis et C. Bordier (1992). *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Experimental Parasitology*, **75** :196-206.

- 125- Scutt A., S. Meghji, J.P. Canniff. et W. Harvey (1987). Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia*. **43**: 391-393.
- 126- Seaman J., A.J. Mercer, H.E. Sondorp et B.L. Herwaldt (1996). Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Annals of Internal Medicine*, **124**: 664–672.
- 127- Serebryakov V.A., S.K.H. Karakhodznaeva et M.D. Dzhumayev (1972). Effect of leishmanial vaccinations on the dynamics of immunity to diphtheria in conditions of secondary revaccination with adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccine. *Med. Parasit. Mosk.* , **124**: 664–672.
- 128- Sheibani A. (1994). Pistachio Production in Iran. Ministry of Agriculture. AREEO. Pistachio Research Institute, Iran, Publication, **73**:245.
- 129- Sheibani A. (1996). Distribution, use and conservation of pistachio in Iran. Dans: Workshop 'Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources', Palermo, Italie. Padulosi, S., Caruso, T. et S. Barone, Éd: IPGRI, ROMA, 51-56.
- 130- Schuler P. (1990). Naturel antioxidants exploited commercially. Food antioxidants, hudson B.J.F (Ed), Elsevier. Amsterdam, **12**:99-170.
- 131- Shweta Tripathi., Nasib Singh, Shilpy Shakya, Anil Dangi, Shailja Misra-Bhattacharya, Anuradha Dube et Nikhil Kumar (2006). Landrace/gender-based differences in phenol and thiocyanate contents and biological activity in *Piper betle* L. *Current science*, **91**:746-749.
- 132- Smadi Abla (2007). Etude de l'extrait chloroformique d'*Oudneya africana*», Memoir de magister en chimie organique, 54-55.
- 133- Sonntag N.O.V. (1979). Structure and Composition of Fats and Oils in Bailey's Industrial Oil and Fat Products", Ed. Diel Swern, New-York, **1**:45.
- 134- Sherwood J.A., G.S. Gachihi et R.K. Muigai (1994). Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, **19**:1034–1039.
- 135- Sundar S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health* **6**: 849–854.
- 136- Takechi M., Y. Tanaka, M. Takehara, G.I. Nonaka et I. Nishioka (1985). *Phytochemistry* , **24**, (10), 2245-2250.
- 137- Thakur C.P., T.P. Kanyok, A.K. Pandey, G.P. Sinha, C. Messick et P. Olliaro (2000). Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine): an open-label randomized phase-II clinical study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**:432–433.

- 138- Thakur C.P., G.P. Sinha et A.K. Pandey (1996). Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar. *Indian Journal of Medicine Research*, **103**: 259–263.
- 139- Titus R.G., F.J. Gueiros-Filho, L.A. De Freitas et S.M. Beverley (1995). Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **92**:10267–10271.
- 140- Tasdemir Deniz, Marcel Kaiser, Reto Brun, Vanessa Yardley, Thomas J. Schmidt, Fatma osun et Peter Ru'edi (2006). Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies; Antimicrobial Agents And Chemotherapy, **50**(4):1352-1364.
- 141- Uchiyama M., Y. Suzuki, et F. Fukuzawa (1968). Etudes biochimiques de la fonction physiologique du tocopheronolactone, *Yakugaku Zasshi* **88** :678-683.
- 142- Van Acker S.A.B.E., D.J. van den Berg, M.N.J.L; Tromp, D.H. Griffioen, W.P. van Bennekom, W.J.F. van der Vijgh et A. Bast (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, **20**: 331-342.
- 143- Veroffa L, M. Dell'agli, A. Giolito, M. Guerini, P. Cabalion et E. Basisio (2001). *Journal of NaturalProduct*, **64**: 603-607.
- 144- Vlietinck A.J., T. De Bruyne, S. Apers et L.A. Pieters (1997). *Planta. Medica.*, **64** :79-109.
- 145- WHO, W.H.O.-. 2000 <http://www.who.int/inf-fs/en/fact116.html>.
- 146- Yousfi M., B. Nedjemi , R. Belal et D. Ben Bertal (2003). étude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien .*OCL*, **10** :1-3.
- 147- Yousfi M., B. Nedjemi , D. Ben Bertal et R. Belal (2005). triacylglycerol composition of *Pistacia atlantica* fruit oil growing in Algeria ,*JAOCS*. **82**:1-5.
- 148- Yousfi M., A. Djeridane, I. Bombarda, C.Hamia, A. Duhem et E.M. Gaydou (Accepted: Feb 8:2008 In press). Isolation and Characterization of a New Hispolone Derivative From Antioxidant Extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytotherapy Research*
- 149- Yousfi M., A. Djeridane, B. Nadjemi, S. Maamri, F. Djireb et P. Stocker. (2006). Phenolic Extracts from various Algerian plants as Strong inhibitors of porcine liver Carboxylesterase. *Journal of Inhibitor Enzyme and Medicinal Chemistry*, **21**(6):719-726.

# *Annexe*

# Annexe I

## Courbe d'étalonnage

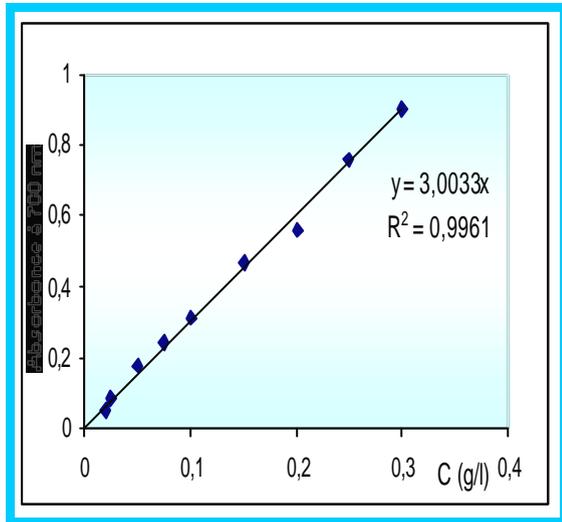


Figure n°: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

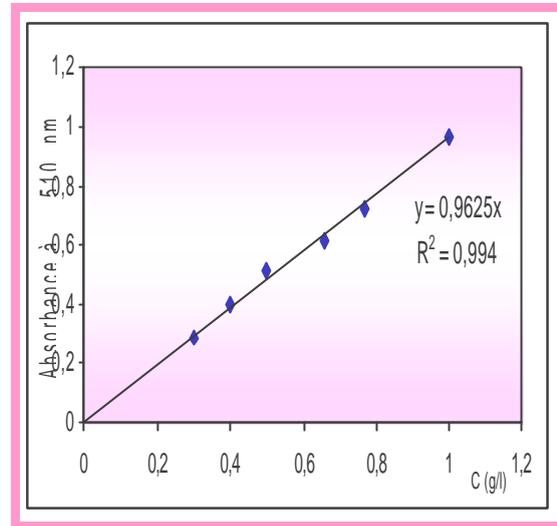


Figure n°: Courbe d'étalonnage de la rutine.

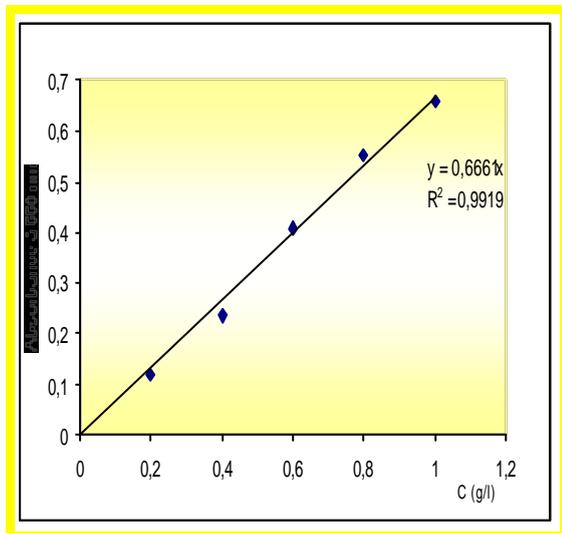


Figure n°: Courbe d'étalonnage du cholestérol

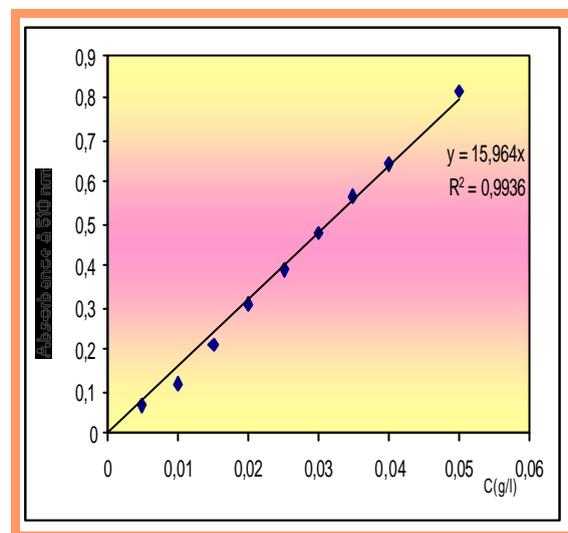


Figure n°: Courbe d'étalonnage de la vitamine E

## **Annexe II**

### **Matériels utilisés**

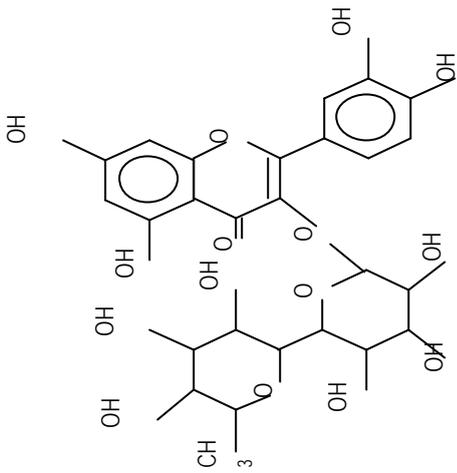
#### **➤ Equipements**

- 1- Chauffe ballon
- 2- Rotavapor
- 3 -Spectrophotomètre UV / visible (SHIMADZU)
- 4 - Etuve
- 5- Hote chimique
- 6 - Autoclave (SANA CLAV)
- 7 - pH mètre (HANNA instruments)
- 8 - Microscope photonique à contraste de phase (Ortholux)
- 9 - Balance (SCALTEC)
- 10 - Bec Bunsen (Fisher)
- 11 - Four Pasteur (SELECTA)
- 12- Réfrigérateur.

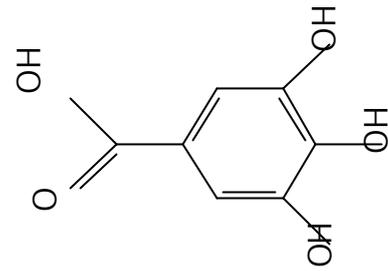
#### **➤ Verreries et matériel en plastique**

Erlenmeyer de 100 ml, 1000 ml,  
Fiole de 10ml, 20ml, 50ml, 100 ml,  
Bêcher de 50 ml, 100 ml,  
Plaques de culture cellulaire à 24puits,  
Pipettes Pasteur,  
Tubes à essai,  
Lames et lamelles,  
Seringues,  
Filtre en plastique de 0,22µm,  
Cellule de malassez,  
Parafilm,  
Micropipettes,  
Cuvettes de spectrophotomètre,  
Ependorf

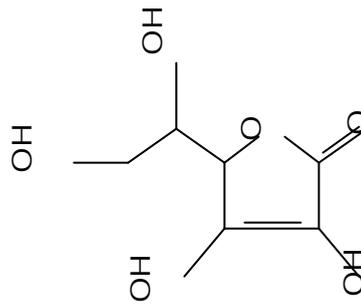
## Annexe III



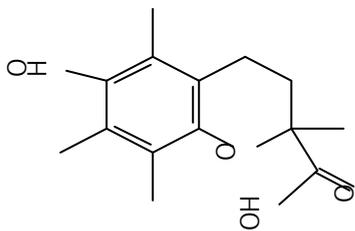
**Rutine**



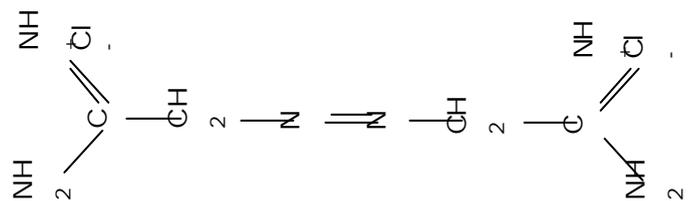
**Acide gallique**



**Acide ascorbique**



**Trolox**  
(Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetraméthylchromane-2-carboxylique)



**AAPH** : Dichlorate de 2,2'-azobis (amidinopropane)