

ACTIVITÉ ANTILEISHMANIENNE ET COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES DE PLANTES MÉDICINALES ALGÉRIENNES

BENELMOUFFOK Amina-Bouchra^{1*}, BOUABID Cyrine^{2,3}, GUIZANI-TABBANE Lamia^{2,3} et SELAMI Mahdi¹

1. Département de Zoologie Agricole et Forestière - Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) 16200 El Harrach Alger-Algérie.
2. Département de Parasitologie Médicale, Biotechnologie et Biomolécules - Institut Pasteur de Tunis. Place Pasteur 1002 Belvédère, Tunis – Tunisie.
3. Université de Tunis El Manar. Tunisie.

Reçu le 21/05/2021, Révisé le 11/10/2021, Accepté le 27/11/2021

Résumé

Description du sujet : Recherche d'espèces végétales endémiques antileishmaniennes.

Objectifs : Evaluer l'activité antileishmanienne et cytotoxique de cinq huiles essentielles (HEs) extraites de plantes médicinales d'Algérie.

Méthodes : L'extraction des HEs a été réalisée par hydro-distillation, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'activité antileishmanienne et cytotoxique des HEs ont été réalisées *in vitro* par le test colorimétrique MTT.

Résultats : Les HEs de *Thymus palleescens* avec 59,15% de carvacrol et de *Thymus vulgaris* avec 56,80% de thymol ont montré une activité contre les promastigotes de *Leishmania major* mais une cytotoxicité contre les cellules macrophagiques Raw 264,7. L'HE d'*Artemisia campestris* riche en monoterpènes hydrocarbonés et l'HE d'*Anethum graveolens* renfermant 23,86% de myristicine ont montré une bonne activité contre *Leishmania major* avec respectivement une CI50 de 14,02±0,18 µg/ml et 13,83±0,30 µg/ml. Elles ont exprimées une faible cytotoxicité avec des CC50 de 183±0,18 µg/ml et CC50 de 158,1±0,22 µg/ml et des indices de sélectivité (IS) de 13,05 et 11,43 respectivement.

Conclusion : *Artemisia campestris* et *Anethum graveolens* peuvent être considérées comme une initiation aux traitements naturels des leishmanioses. *Anethum graveolens* mérite plus d'attention puisque c'est la première mention de l'activité antileishmanienne que nous rapportons.

Mots clés: Activité antileishmanienne ; Cytotoxicité ; Plantes médicinales ; Huiles essentielles ; Algérie.

ANTILEISHMANIAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM ALGERIAN MEDICINAL PLANTS

Abstract

Description of the subject: Research of endemic antileishmanial plant species.

Objective : Evaluate the antileishmanial and cytotoxic activity of five essential oils (EOs) extracted from Algerian medicinal plants.

Methods : The extraction of the EOs was performed out by hydro-distillation and then analyzed by gas chromatography - mass spectrometry (GC/MS). The antileishmanial and cytotoxic activities of the EOs were performed *in vitro* by the MTT.

Results : The EO of *Thymus palleescens* with 59.15 % of carvacrol and *Thymus vulgaris* with 56.80% of thymol showed activity against the promastigotes of *Leishmania major* but a cytotoxicity against macrophages cells Raw 264.7. The EO of *Artemisia campestris* rich in monoterpenes hydrocarbons and EO of *Anethum graveolens* with 23.86% of myristicin showed a good activity against *Leishmania major* with respectively IC50 of 14.02±0.18 µg/ml and 13,83±0,30 µg/ml and also a low cytotoxicity with CC50 of 183±0,18 µg/ml and 158.1±0.22 µg/ml and selectivity indices (SI) of 13.05 and 11.43 respectively.

Conclusion : *Artemisia campestris* and *Anethum graveolens* can be considered as potential candidates for naturel treatments. *Anethum graveolens* deserves more attention since it is the first mention of antileishmanial activity that we report.

Keywords : Antileishmanial activity; Cytotoxicity; Medicinal plant; Essentials oils; Algeria.

* Auteur correspondant: BENELMOUFFOK Amina-Bouchra, E-mail : aminabenelmouffok@yahoo.fr

INTRODUCTION

Les leishmanioses représentent un véritable problème de santé publique en Algérie et occupent la première place des maladies parasitaires à déclaration obligatoire [1]. Deux formes cliniques sévissent à l'état endémique : La leishmaniose viscérale (LV) et la leishmaniose cutanée (LC).

La (LC), plus fréquente et plus extensive que la (LV) est représentée par trois entités cliniques et trois parasites différents. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) du sud à *Leishmania major* inféodé aux régions steppique et saharienne [2 et 3], la leishmaniose cutanée chronique à *Leishmania killicki* proche de *Leishmania tropica* limité pour le moment à Ghardaïa au sud du pays [4] et La leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) à *Leishmania infantum* dans la région du Tell [2 et 3].

Longtemps confinée au Sahara, la (LCZ) à *Leishmania major* connaît une extension géographique en dehors des foyers naturels de la maladie ceux de Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest vers les Hauts Plateaux avec une survenue d'épidémie, en 1982 à M'sila [5] suivie d'une autre en 1985 à Ksar Chellala (Tiaret) [6]. Ces dernières années, la barrière géographique formée par l'Atlas tellien, qui séparait la forme cutanée du nord et la forme cutanée du sud a été franchie avec une avancée rapide de cette dernière vers le nord du pays [7]. Le réservoir de la (LCZ) est représenté essentiellement par deux rongeurs gerbillidés. Le premier étant *Psammomys obesus* (le Rat des sables), [8 et 9] et le second *Meriones shawi* (la Merione de Shaw) [6 et 10]. Dans ces régions cohabitent le principal vecteur *Phlebotomus papatasi* [11 et 12].

Selon l'Institut National de la Santé Publique (INSP) le taux d'incidence de la (LC) a augmenté, il est passé de 11,62 en 2014 à 28,19 en 2017 cas pour 100.000 habitants. Cette recrudescence et la propagation de la maladie à de nouveaux foyers font de la leishmaniose cutanée un problème épineux. Malgré cette alerte, la lutte contre cette maladie n'a jamais réussi à établir une stratégie efficace et durable. Celle adoptée par le comité technique national mis en place en 2006 par le Ministère de la Santé Publique et la Réforme Hospitalière (MSPRH), repose essentiellement sur la lutte anti-vectorielle par des aspersion intra domiciliaires et extra domiciliaires d'insecticides rémanents avec pour objectifs de réduire de 50% l'incidence annuelle.

Malheureusement, celle ci continue d'augmenter et s'explique par l'absence d'action ciblant efficacement le réservoir du parasite. Cependant, *Psammomys obesus* est une espèce protégée dans notre pays (Loi du 20 août 1983) et le deuxième réservoir est péri domestique représenté par *Meriones shawi* est l'une des espèces arvicoles les plus dévastatrices en Algérie, elle cause d'importants dégâts dans nos parcelles agricoles notamment sur céréales. Une campagne de lutte est décrétée tous les ans par l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) à partir du mois d'octobre à fin mars, correspondant à la période de disette du rongeur qui se pratique uniquement au niveau des zones agricoles, ce qui ne permettra guère l'éradication définitive de ce fléau, notamment avec le développement de l'agriculture steppique. L'absence d'une stratégie adéquate de lutte dans les zones non agricoles permet à ces mammifères d'envahir de nouveaux espaces et d'élargir leur zone de reproduction.

En général, le traitement des leishmanioses est dominé, par les dérivés antimoniés pentavalents qui demeurent encore de nos jours les médicaments de première intention dans plusieurs pays endémiques [3]. La toxicité et le coût élevé des médicaments antileishmaniens habituels ainsi que l'émergence grandissante des souches parasitaires résistantes ont fait que la recherche d'espèces végétales endémiques antileishmaniennes efficaces et peu toxiques continue de s'imposer.

L'Algérie par sa position géographique présente une grande diversité végétale, les chances de trouver des plantes actives contre cette maladie sont importantes. Cette richesse végétale est due à une grande variété de biotopes liée à des différences d'altitude ainsi qu'à des facteurs climatiques.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité antileishmanienne de cinq huiles essentielles (HEs) extraites de la partie aérienne de diverses plantes médicinales sur des cultures promastigotes de *Leishmania major* et leur effet cytotoxique sur les cellules macrophagiques Raw 264.7.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Nous avons utilisé cinq plantes médicinales récoltées dans les régions steppiques d'Algérie, milieux peuplés par les deux réservoirs de la leishmaniose cutanée.

Leur identification a été réalisée à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) El-Harrach-Alger. Les parties aériennes de ces plantes ont été retenues en raison de leurs

informations ethnobotaniques (Tableau 1). Les feuilles et les tiges récoltées ont été séchées pendant 20 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à l'extraction.

Tableau 1: Les plantes étudiées et leurs propriétés médicinales

Familles	Noms des plantes	Lieu de récolte (wilaya)	Propriétés médicinales
<i>Asteraceae</i>	<i>Artemisia campestris</i>	M'Sila	Antioxydantes, antifongiques, antibactériennes
<i>Apiaceae</i>	<i>Anethum graveolens</i>	Tablat	Antispasmodiques, anti inflammatoire
<i>Rutaceae</i>	<i>Ruta montana</i>	Tablat	Anti rhumatismale, vermifuge
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus palleescens</i>	SourEl Ghozlane	Maladies infectieuses, parasites intestinales
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Bouira	Maladies respiratoires

1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs a été réalisée par hydro distillation dans un appareil de type « Clevenger » selon la Pharmacopée Européenne [13]. 100g de matière végétale a été hydro distillée dans 01 litre d'eau pendant 03 heures. L'huile obtenue a été transférée dans des flacons en verre ambré et conservée à 4°C jusqu'aux analyses.

1.2. Analyse des huiles essentielles

Les HEs ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) (système informatisé Hewlett-Packard, comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A), équipé d'une colonne capillaire en silice fondue HP5MS™ (30 m × 0,25 mm de diamètre interne ; épaisseur de film de 0,25 µm). Les spectres CG-MS ont été obtenus dans les conditions suivantes : gaz porteur, hélium ; débit, 0,5 ml/min ; mode, fractionné (50:1) ; volume d'injection, 1 µL ; température d'injection, 250°C ; programme de température du four, 60°C pendant 8 min, puis augmentation à 2°C/min jusqu'à 250°C et maintien à 250°C pendant 15 min ; mode d'ionisation, impact électronique à 70 eV. Les pourcentages des composants ont été calculés à partir des surfaces des pics CG/FID. L'indice de rétention (IR) de tous les composants a été déterminé par la méthode de Kovats par co-injection des échantillons avec une solution contenant la série homologue de n- alcanes (C8-C28) sur la colonne HP 5MS™. L'identification a été faite en comparant les indices de rétention et les spectres de masse avec les données publiées dans la littérature [14] et en faisant correspondre leurs spectres de masse enregistrés avec des spectres de référence dans la bibliothèque de l'ordinateur [National Institute of Standards and Technology (NIST) et les bibliothèques Wiley].

2. Matériel biologique

Nous avons utilisé des promastigotes de *Leishmania major* fournis par l'Institut Pasteur de Tunis : PGLC 94 pour l'activité antileishmanienne et une lignée cellulaire de macrophages murins Raw 264.7 pour le test de cytotoxicité

2.1. Activité antileishmanienne des huiles essentielles

La viabilité de *Leishmania major* a été évaluée à l'aide du test colorimétrique au bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium (MTT) basé sur la réduction du sel de tétrazolium en cristaux de formazan par les déshydrogénases mitochondriales [15].

Les promastigotes de *Leishmania major* ont été cultivés dans les conditions suivantes (26°C et 5% de CO₂) dans un milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA), supplémenté avec 100 U/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA) et enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco). Les promastigotes ont été répartis dans des plaques de 96 puits à une densité cellulaire de 2,10⁶ parasites par puits et incubés à 26°C pendant 72h en présence d'HE solubilisées dans RPMI+DMSO (Sigma-Aldrich, USA) 0,05 % [16] à des concentrations de ½ allant de (100µg/ml à 0,78µg/ml).

L'amphotéricine B (Sigma- Aldrich, USA) a été utilisée comme contrôle positif à des concentrations allant de (07,8 µg/ml à 0,06 µg/ml) et les parasites non traités (RPMI+DMSO 0,05%) ont été considérés comme contrôle négatif. Après 72h d'incubation à 26°C des plaques de culture cellulaire, 10 µl de MTT (Sigma Aldrich, USA) à une concentration finale de 0,5 mg/ml ont été ajoutés par puits et l'incubation a été poursuivie dans l'obscurité pendant 4h supplémentaires. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100µl d'une solution d'isopropanol acidifiée [15].

La lecture a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Synergy HT, Bio-Tek) où les densités optiques (DO) sont lues à 540 nm, ce qui permet de calculer le pourcentage (%) d'inhibition avec l'équation suivante : % d'inhibition = [(DO contrôle négatif-DO échantillon) / DO contrôle négatif] × 100 [15].

En utilisant le programme Graph Pad Prism 5, une étude statistique a été réalisée en utilisant l'analyse de régression non linéaire dose-réponse, la concentration d'inhibition qui inhibe 50% de la population cellulaire (CI50) a été déterminée. Selon Osório *et al.* et de Lima *et al.* [17 et 18] les composés ont été classés comme suit : CI50 < 10 µg/ml très actif ; 10 µg/ml < CI50 > 50 µg/ml actif ; 50 µg/ml < CI50 > 100 µg/ml modérément actif et CI50 > 100 µg/ml non actif.

2.2. Test de cytotoxicité et indice de sélectivité

La cytotoxicité des HES a été évaluée à l'aide de la lignée cellulaire de macrophages Raw 264.7, maintenues en culture dans du RPMI-1640, supplémenté de 2 mM de L-glutamine et d'antibiotique : 100 U/ml de streptomycine (Sigma), enrichi de 10% de sérum veau fœtal (SVF). La viabilité cellulaire a été évaluée après incubation avec du bleu trypan à 0,1% en comptant les cellules colorées au microscope optique.

Les macrophages ont été répartis dans des plaques de 96 puits à une densité cellulaire de $2 \cdot 10^4$ cellules par puits, on les a laissés adhérer pendant une nuit à 37°C et 5% de CO₂ ; puis remplacé le milieu par un frais contenant 100 µl de dilution en série d'HE allant de (100 µg/ml à 0,78 µg/ml). L'amphotéricine B a été utilisée comme contrôle positif et les cellules non traitées ont été considérées comme contrôle négatif. Les cellules ont été incubées pendant 72h à 37°C et leur viabilité a été estimée par le test MTT dont l'expression des résultats a été décrite précédemment [15], ainsi la concentration cytotoxique de 50% (CC50) a été déterminée. L'indice de sélectivité (IS) est un paramètre définissant l'équilibre entre la cytotoxicité et l'activité biologique du composé (huile) correspondant à la concentration active la plus élevée sans toxicité et exprimé par le rapport CC50 macrophages/ CI50 parasites [19]. Pour une valeur de (IS) supérieure à 10, l'huile est considérée comme efficace contre les parasites et sans danger pour les macrophages [20 et 21].

3. Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± Erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs des concentrations d'inhibition à 50% (CI50) et des concentrations cytotoxiques à 50 % (CC50) pour chaque HE ont été déterminées par une analyse de régression non linéaire en utilisant le logiciel (Graph Pad Prism 5 San Diego USA). Le test de Tukey (Graph Pad Prism5) pour de multiples comparaisons et permet de distinguer les groupes avec un niveau de confiance de 95%. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p \leq 0,05$.

RÉSULTATS

1. Composition chimique des huiles essentielles (HES)

La composition chimique de nos HES est représentée dans le (Tableau 2) dont les composants ont été classés selon leurs indices de rétention (IR). La composition chimique de nos HES a été caractérisée par la présence de deux à trois composants majoritaires à des concentrations assez élevées par rapport aux autres composants présents en faibles quantité. En effet, cette composition est dominée par des monoterpènes hydrocarbonés (23,54%) de β-pinène, (16,35%) de α-pinène et (11,23%) de limonène pour *Artemisia campestris*, d'un composé aromatique dérivé du phénylpropane (23,86%) de la myristicine pour *Anethum graveolens*, de cétones (77,60%) de 2-undecanone pour *Ruta montana* et de composés phénoliques (59,15%) de carvacrol et (56,80%) de thymol pour les *Thymus*.

2. Activité antileishmanienne

L'activité antileishmanienne des huiles essentielles a été évaluée sur les promastigotes de *Leishmania major* et comparée à celle de l'amphotéricine B médicament de référence en utilisant le dosage colorimétrique du méthylthiazole tétrazolium (MTT) est un composé organique coloré en jaune, il est réduit uniquement dans les cellules métaboliquement actives (vivantes) par des déshydrogénases mitochondriales, en un composé violet, insoluble : le formazan. Cette modification chimique s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption. Ceci permet une mesure spectrophotométrique du formazan et de sa quantification. Après 72h d'incubation, une observation des plaques de culture cellulaire au microscopique optique inversé afin d'évaluer l'état des parasites dans chaque condition.

Puis les traiter au MTT. Après solubilisation (dissoudre les cristaux de formazan) (Fig. 1), une lecture par spectrophotométrie à une longueur

d'onde égale à 540 nm nous a permis de calculer le pourcentage d'inhibition à 72 h et de tracer les graphes (Fig. 2).

Tableau 2 : Composition chimique en pourcentage (%) des HES par hydrodistillation

composants	IR ^a	IR ^b	A.c	IR ^b	A.g	IR ^b	R.m	IR ^b	T.p	IR ^b	T.v
α-Thujene	930	931	3,17	-	-	-	-	924	0,9	-	-
α-Pinene	939	939	16,35	941	8,7	938	0,1	943	1,98	940	2,16
Camphene	954	-	-	947	2,28	-	-	955	0,83	-	-
Sabinene	975	-	-	969	1,2	-	-	-	-	-	-
β-Pinene	979	975	23,54	974	11,2	-	-	977	0,78	980	0,19
Myrcene	990	982	8,7	-	-	-	-	982	3,2	-	-
α-Phellandrene	1002	-	-	997	14,8	1005	0,23	-	-	-	-
ρ-Cymene	1024	-	-	1025	4,25	-	-	1019	10,6	1022	15,50
o-Cymene	1026	1025	3,65	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1029	1031	11,23	1032	13,3	1021	0,57	1028	0,2	1036	1,25
γ-Terpinene	1059	1050	4,35	1054	9,02	1060	0,23	1057	4,3	1054	8,76
Terpinolene	1088	-	-	-	-	-	-	1083	0,54	-	-
Fenchone	1086	-	-	1089	0,1	-	-	-	-	-	-
Linalool	1096	1090	0,23	1098	3,2	-	-	1092	0,87	1096	4,15
2-Nonanol	1098	-	-	-	-	1096	1,2	-	-	-	-
Trans- Pinocarveol	1139	1137	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans- Sabinol	1142	-	-	1139	0,6	-	-	-	-	-	-
Camphor	1146	-	-	1141	1,4	-	-	1153	0,1	-	-
Citronellal	1153	-	-	-	-	-	-	-	-	1151	1,25
Terpinen-4-ol	1177	1175	2,78	-	-	-	-	-	-	1174	1,17
α- Terpineol	1188	1183	2,04	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanone	1192	-	-	-	-	1189	12,89	-	-	-	-
Myrtenal	1195	1192	2,26	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Decanol	1199	-	-	-	-	1201	0,83	-	-	-	-
Thymol	1290	1286	0,17	1290	0,2	-	-	1309	12,43	1288	56,80
2-Undecanone	1294	-	-	-	-	1291	77,60	-	-	-	-
Carvacrol	1299	1295	3,2	1299	0,4	-	-	1315	59,15	1301	3,07
2-Undecanol	1301	-	-	-	-	1305	0,41	-	-	-	-
Citraldimethoxy (E)	1341	-	-	-	-	-	-	-	-	1339	0,82
Carvacryl Acetate	1367	-	-	-	-	-	-	1368	0,97	-	-
α-Gurjunene	1409	1402	1,29	-	-	-	-	1406	0,3	-	-
(E)-Caryophyllene	1419	-	-	1411	0,1	-	-	1424	0,25	1416	1,5
Aromadendrene	1441	-	-	-	-	-	-	1445	0,14	1439	0,29
α-Humelene	1454	-	-	1448	-	-	-	-	-	1452	0,14
α-Patchoulene	1456	1454	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-
Farnesene (E)- β	1456	1461	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-
Curcumene	1472	1476	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Selinene	1490	1488	3,02	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Tridecanone	1496	-	-	-	-	1491	0,80	-	-	-	-
γ-Cardinene	1513	-	-	-	-	-	-	-	-	1509	0,11
Myristicine	1518	-	-	1514	23,86	1533	0,32	-	-	-	-
δ-Cardinene	1523	-	-	1530	0,1	-	-	1531	0,13	1528	0,16
Elemicine	1557	-	-	1551	1,2	1560	0,10	-	-	-	-
Spathulenol	1578	1572	2,87	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpènes hydrogénés			70,99		64,75		1,13		23,33		27,86
Monoterpènes oxygénés			11,98		5,90		92,93		73,52		67,26
Sesquiterpènes hydrogénés			5,51		24,06		1,12		0,82		2,2
Sesquiterpènes oxygénés			2,87		1,2		0,10		-		-
Total (%)			91,35		95,91		95,28		97,67		97,32

IR^a : Indice de rétention de Kovats Adams , IR^b : Indice de rétention de Kovats calculé par rapport aux séries homologues de n-alcanes (C8-C28) sur la colonne HP5MSTM , A.c : *Artemisia campestris*, A.g : *Anethum graveolens*, R.m : *Ruta montana*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*

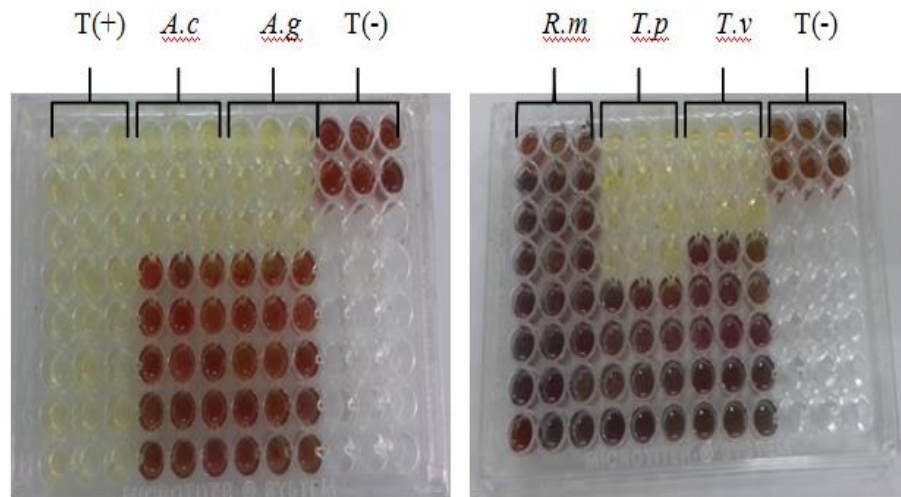


Figure 1: Résultats du test MTT sur plaque
 T(+):Témoin positif (Amphotéricine B), A.c :*Artemisia campestris*, A.g :*Anethum graveolens*,
 R.m : *Ruta montana*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*, T(-) : Témoin négatif

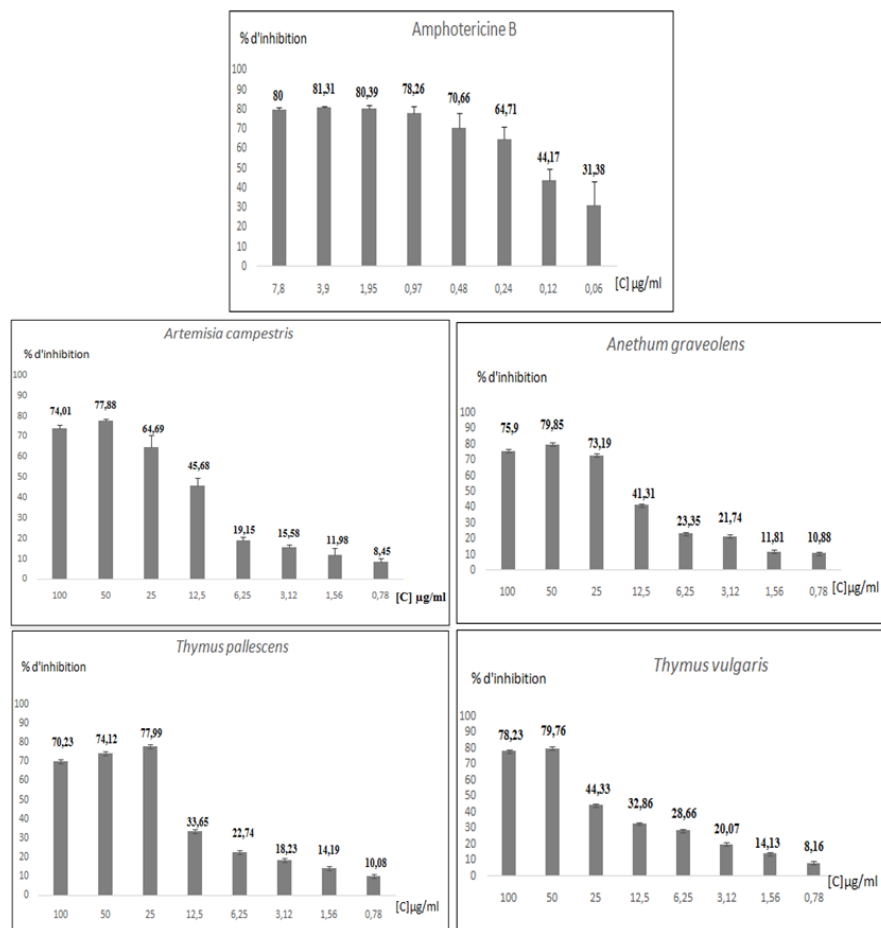


Figure 2 : Pourcentage d'inhibition des promastigotes vis-vis des différentes concentrations

Un premier criblage sur des cultures de *Leishmania major* nous a permis d'identifier quatre espèces végétales à activité antileishmanienne à l'exception de *Ruta montana*. La concentration de (50µg/ml) à enregistrée les taux les plus élevés d'inhibition de promastigotes avec (77,88%) pour *Artemisia campestris*, (79,85%) pour *Anethum graveolens*

et (79,76%) pour *Thymus vulgaris*. Par contre, *Thymus pallescens* a enregistré un taux de (77,99%) pour une concentration de (25µg/ml). Les résultats obtenus ont été analysés par le test de régression non linéaire dose-réponse à l'aide du programme GraphPad Prism 5. La CI₅₀ est déterminée (Fig. 3).

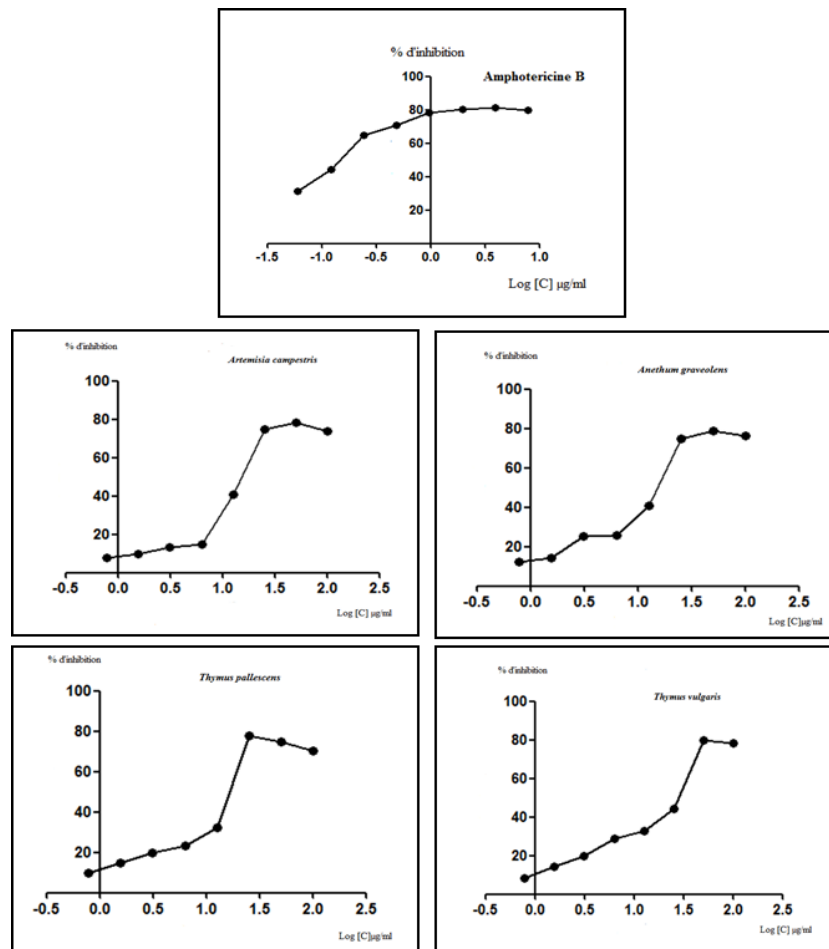


Figure 3 : Pourcentage d’inhibition des promastigotes en fonction du Log des différentes concentrations

Nos HES ont présenté une activité leishmanicide inférieure à celle de l’amphotéricine B (produit pur). Les HES de *Thymus pallescens*, *Anethum graveolens* et *Artemisia campestris* ont exprimé un meilleur pouvoir antiparasitaire contre *Leishmania major* par

rapport à *Thymus vulgaris*. Le test de Tukey a révélé que les CI50 de ces trois HES n’étaient pas significativement différentes entre elles $p > 0,05$ (Tableau 3).

Tableau 3 : Activité antileishmanienne *in vitro* sur les promastigotes de *Leishmania major*

Plantes étudiées	CI50±SEM Promastigotes	CI50	Classement
<i>Artemisia campestris</i>	14,02 ^a ±0,18	10 <CI> 50	Active
<i>Anethum graveolens</i>	13,83 ^a ±0,30	10 <CI> 50	Active
<i>Ruta montana</i>	-	>100	Non active
<i>Thymus pallescens</i>	13,72 ^a ±0,20	10 <CI> 50	Active
<i>Thymus vulgaris</i>	31,60 ^b ±0,50	10 <CI> 50	Active
Amphotéricine B	0,061 ^b ±0,01	< 10	Très actif

CI50: Concentration d’inhibition à 50%, Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif), Les lettres (a et b) indiquent les différences significatives selon le test de Tukey , a : $p > 0,05$ et b : $p < 0,05$

3- Test de cytotoxicité et indice de sélectivité

Le test de cytotoxicité des huiles essentielles a été évalué sur les cellules macrophagiques (Raw 264.7) et comparées à l’amphotéricine B pour évaluer leur utilité comme produits bioactifs à effet leishmanicide. Il ressort de cette activité, après 72h d’incubation et traitement des plaques au MTT (Fig. 4) puis une lecture par

spectrophotométrie que les *Thymus* sont toxiques sur les macrophages Raw 264.7 dont les IS sont inférieurs à 10 et que les huiles d’*Artemisia campestris* et d’*Anethum graveolens* ont montré une faible cytotoxicité sans danger pour les macrophages. Le test de Tukey a révélé une différence significative entre les moyennes des CC50 $p < 0,05$ (Tableau 4).

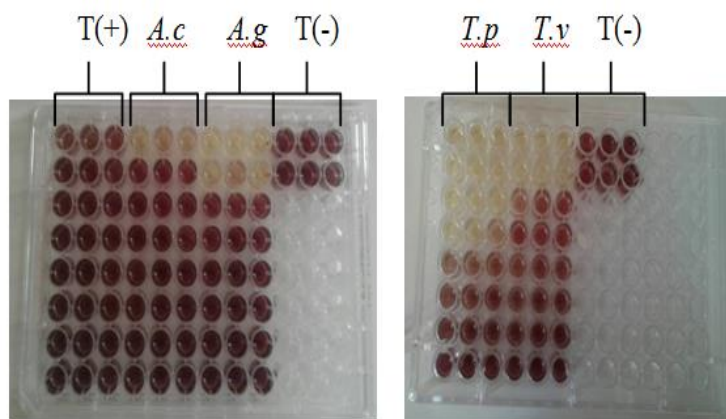


Figure 4: Résultats du test MTT sur plaque

T(+):Témoin positif (Amphotéricine B), A.c :*Artemisia campestris*, A.g :*Anethum graveolens*, T.p : *Thymus pallescens*, T.v : *Thymus vulgaris*, T(-) : Témoin négatif

Tableau 4: Activité cytotoxique sur les cellules Raw264.7 et indice de sélectivité.

Plantes étudiées	CC50±SEM	CC50/CI50
	Macrophages	Indice de sélectivité
<i>Artemisia campestris</i>	183 ^a ±0,18	13,05
<i>Anethum graveolens</i>	158,1 ^a ±0,22	11,43
<i>Thymus pallescens</i>	5,024 ^a ±0,49	0,36
<i>Thymus vulgaris</i>	23,79 ^a ±0,26	0,75
Amphotéricine B	2,2 ^a ±0,26	36,06

CC50: Concentration cytotoxique à 50%, c Amphotéricine B : Médicament de référence (Contrôle positif). la lettre (a) indique la différence significative avec le test de Tukey $p < 0,05$.

DISCUSSION

Les compositions chimiques de ses huiles avaient été étudiées par de nombreux chercheurs algériens [22- 29] où les résultats sont assez proches avec quelques variations des composants et de leurs teneurs dans l'huile essentielle. D'ailleurs, il est connu que la composition chimique d'une huile essentielle dépend des facteurs environnementaux, du patrimoine génétique et du stade de développement de la plante [30].

L'activité antileishmanienne de nos huiles essentielles a révélé que *Ruta montana* riche en cétones dont le composé majoritaire est le 2-undécanone avec (77,60%) représentant la quasi-totalité de l'huile, n'a montré aucune activité.

Les huiles de *Thymus pallescens* renfermant (59,15%) de carvacrol et de *Thymus vulgaris* avec (56,80%) de thymol ont montré une activité significative contre les promastigotes de *Leishmania major*. Il semblerait que cette activité antileishmanienne est liée à la présence des composés phénoliques. En effet, les diverses propriétés biologiques rapportées pour les *Thymus*, telles que les activités antioxydantes, insecticides, antibactériennes, antifongiques et antivirales [31-33], sont généralement liées aux composés phénoliques,

particulièrement le thymol et le carvacrol [34-36].

Nous avons noté que l'huile essentielle de *Thymus pallescens* riche en carvacrol était plus efficace, que celle de *Thymus vulgaris* riche en thymol. Des travaux réalisés par Farias-junior et al. [37] pour lequel l'huile essentielle de *Lippia sidoides* riche en carvacrol était plus efficace que l'huile riche en thymol vis-à-vis de *Leishmania chagasi*.

Cependant, nos huiles essentielles de *Thymus* ont montré une toxicité contre les macrophages Raw 264.7. D'après Lawrence [38], l'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. A cet effet, il semblerait que le thymol et le carvacrol seraient responsables de la toxicité. En effet, les travaux réalisés par Rodrigues et al. [39] ont démontré que les deux composés phénoliques thymol et carvacrol possédaient une cytotoxicité élevée à tous les types de cellules testées.

Quant aux huiles d'*Artemisia campestris* riche en monoterpènes hydrocarbonés et d'*Anethum graveolens* contenant 23,86% de myristicine ont montré une bonne activité antileishmanienne avec une faible cytotoxicité. Cette activité antileishmanienne n'est pas seulement due au composé majeur de (HE) mais également à la synergie entre les différents constituants.

En effet, les résultats d'une étude ont montré que α -pinène et ρ -cymène avaient une activité antileishmanienne [39]. Dans notre étude *Artemisia campestris* contient (16,35%) de α -pinène et *Anethum graveolens* (8,7%) α -pinène et (4,25%) ρ -cymène.

De même, les résultats d'une autre étude ont montré que la plante *Myrtus communis* avait des propriétés anti leishmaniennes *in vitro* probablement en raison de sa teneur en α -pinène [40].

Rodrigues et al. [39] ont montré que α -pinène était efficace contre les formes de *leishmania amazonensis* et présentaient une faible cytotoxicité contre les macrophages murins et les érythrocytes humains.

En effet, *Artemisia campestris* a déjà été étudiée par Essid et al. Et Mathlouthi et al. [41 et 42], tandis qu'*Anethum graveolens* mérite plus d'attention car à notre connaissance il s'agit du premier rapport concernant l'activité antileishmanienne.

CONCLUSION

Les leishmanies sont responsables d'un taux élevé de mortalité et de morbidité mondiale et les plantes médicinales pourraient être une source intéressante de composés naturels avec des activités de lutte antiparasitaire. Les deux huiles d'*Artemisia campestris* et d'*Anethum graveolens* qui présentent une activité leishmanicide vis-à-vis de *Leishmania major* avec une faible cytotoxicité envers les cellules macrophagiques Raw 264.7 peuvent être considérées comme une initiation à la recherche de nouveaux traitements naturels en vue de se substituer aux médicaments chimiques considérés comme onéreux et toxiques. À l'avenir, des études sont nécessaires pour révéler les composés bioactifs et moins toxiques car l'huile essentielle est un mélange complexe de substances et la purification de composés actifs pourrait entraîner une augmentation considérable de leur activité antileishmanienne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Achour-Barchiche N. et Madiou M. (2009). Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathol Biol.*, 57 : 65-70.
- [2]. Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J. Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M. et Dedet J.P. (1996). *Leishmania infantum* and *L.major* in Algeria. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.*, 90 : 625-629p.
- [3]. Bachi F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La lettre de l'infectiologie* – Tome XXI – n°1.
- [4]. Harrat Z., Boubidi S.C., Pratlong F., Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C. Belkaid M. (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte and Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 716-720.
- [5]. Belazzoug S. (1982). Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 75 : 497-504.
- [6]. Belazzoug S. (1986). Découverte d'un *Meriones shawi* (rongeur, gerbillidae) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*: 79 (5): 630-3.
- [7]. Boudrissa A., Cherif K., Kherrachi I., Benbetka S., Bouiba L., Boubidi S.C., Benikhlef R., Arrar L., Hamrioui B., Harrat Z. (2012). Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105 : 30-35.
- [8]. Belazzoug S. (1983). Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'Sila (Algérie), infestation naturelle de *Psammomys obesus* (rongeur, gerbillidae). *Bull.Soc.Pathol Exot.* 76 : 146-9.
- [9]. Ashford R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30. 1269-1281.
- [10]. Kowalski K. et Rzebiak-Kowalska B. (1991). Mammals of Algeria. Polish Academy of Sciences. *Institute of Systematics and evolution of Animals.* 370 p.
- [11]. Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S. 1984 – Phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) d'Algérie. *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* Vol : XXII, N°2 : 99-127.
- [12]. Izri M.A., Belazzoug S., Pratlong F., Rioux J.A. (1992). Isolement de *Leishmania major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie) fin d'une épopée écoépidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 67 : n° 1, 31-32.
- [13]. Pharmacopée Européenne. (2010). 7^{ème} édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe.
- [14]. Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry; 4 th Ed. USA.
- [15]. Meerloo J.V., Kaspers G.J.L., Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.*, 731(10): 237–245.
- [16]. Aloui Z., Messaoud C., Haoues M., Neffati N., Bassoumi-Jamoussi I., Essafi-Benkhadir K., Boussaid M., Guizani I., Karoui H. (2016). Asteraceae *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes. *Hindawi Publishing Corporation* ; Article ID 9147096: 15 .
- [17]. Osório E., Arango G.J., Jiménez N., Alzate F., Ruiz G., Gutiérrez D., Paco M.A., Giménez A., Robledo S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J.Ethnopharmacol.* 111: 630-635.
- [18]. de Lima J.P.S., Pinheiro M.L.B., Santos A.M.G., Pereira J.L.S., Santos D.M.F., Silva-Jardim I., Costa E.V. (2012). In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.*, 4: 692-702.

- [19]. Weninger B., Robledo S., Arango G.J., Deharo E., Arango R., Munoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J.Ethnopharmacol.*, 78 : 193–200.
- [20]. Acerby L., Jullian V., Sauvain M. (2008). Ethnopharmacologie et leishmanioses en Amérique latine. *Ethnopharmacologia.*, 41 : p19.
- [21]. Monzote L., Piñón A., Setzer W.N. (2014). Antileishmanial potential of tropical rainforest plant extracts. *Medicines.*, 1: 32–55.
- [22]. Ghorab H., Laggoune S., Kabouche A., Semra Z., Kabouche Z. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre.*, 5 (2): 189-192.
- [23]. Touil S. et Benrebihia F.Z. (2014). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* L de la région aride de Djelfa. *AgroBiologia.*, 4(1) : 40-45.
- [24]. Alloun K., (2013). Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Silvia officinalis* L.) et la rue des montagnes (*Ruta montana* L.) Magister en Technologie Alimentaire - Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El – Harrach Alger. p.119.
- [25]. Zellagui A., Belkassam A., Belaïdi A., Gherraf N. (2012). Environmental impact on the chemical composition and yield of essential oils of Algeria *Ruta Montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in environmental Biology.*, 6(10): 2684-2688.
- [26]. Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R. (2008). Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food.*, 11(3): 593-595.
- [27]. Benchabane O. (2014). Chemical composition and insecticidal activities of essential oils of two Algerian endemic plants: *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. And *Thymus pallescens* de Noé. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR).*, 4(6): 185-192.
- [28]. Sahraoui N., Abchich H., Mellal M. (2016). Optimisation par plan d'expériences de l'extraction de l'huile essentielle du (*Thymus pallescens*). *International Journal of Scientific Research and Engineering Technology (IJSET).*, 85- 93.
- [29]. Benameur Q., Gervasi T., Pellizzeri V., Pluchtova M., Tali-Maama H., Assaous F., Guettou B., Rahal K., Grulova D., Dugo G., Marino A., Ben-Mahdi M.H. (2018). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{ESBL} producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. *Natural Product Research.*, p. 9.
- [30]. Deschepper R. (2017). Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. *Doct. Pharm, Univ. Pharm.Marseille.*, p.172.
- [31]. Figueiredo A.C., Borroso J.G., Pedro L.G., Salgueiro L., Miguel M.G., Faleiro M.L. (2008). Volatiles des espèces portugaises *Thymbra* et *Thymus*: composition chimique et activités biologiques. *Curr.Pharm.Des.*,14 (29): 3120-40.
- [32]. Pina-Vaz C., Goncalves-Rodrigues A., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Salgueiro L., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de Oliveira J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 18(1) : 73-8.
- [33]. Vale-Silva L.A., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Salgueiro L., Pinto E. (2010). Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species . *Planta Med.*, 76: 882–888.
- [34]. Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A. (2001). Activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *Thymus revolutus* Celak de Turquie. *J. Ethnopharmacol.* , 76 (2) : 183 -186.
- [35]. Rasooli I. et Mirmostafa S.A. (2003). Sensibilité bactérienne aux huiles essentielles de *Thymus kotschyanus* et de *Thymus persicus* et composition chimique de celles-ci. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (8):2200–2205.
- [36]. Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J. (2008). Activité antimicrobienne et composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, de *Thymus zygis* et de *Thymus hyemalis*. *Food Control.*, 19 (7): 681–687.
- [37]. Farias-Junior P.A., Rios M.C., Moura T.A., Almeida P.A., Alves P.B., Blank A.F., Fernandes R.P.M., Scher R. (2012). Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biol Res* , 45: p. 399- 402 .
- [38]. Lawrence B.M. (2000). Progress in essential oils-Ravensara oil. *Perfumer and flavourist*, 25(5) : 68-71.
- [39]. Rodrigues V., Cabral C., Evora L., Ferreire I., Cavaleira C., Cruz M.T., Salagueiro L. (2015). Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Thymus zygis* L. subsp. *Sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout. essential oil and its main compounds. *Arabian journal of chemistry.*, p.8.
- [40]. Mahmoudvand H., Ezzatkhab F., Shariffar F., Sharifi I., Dezaki E.S. (2015). Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. *Korean J . Parasitol.*, (53):21–27.
- [41]. Essid R., Rahali F.Z., Msaada K., Sghair I., Hammami M., Bouratbine A., Aoun K., Limam F. (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in northern Tunisia. *Industrial Crops and products.*, 77: 795- 802.
- [42]. Mathlouthi A., Belkessam M., Sdiri M., Djouani M.F., Souli A., El-Bok S. (2018). Chemical Composition and Anti-*Leishmania major* Activity of Essential Oils from *Artemisia* spp. Grown in Central Tunisia. *Journal of Essential oil bearing plants.*, 21: 1186-1198.