



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Tebti Mohammed Cherif

Zahraoui Abderrazak

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: microbiologie fondamentale

THÈME

Effet des extraits de *Marrubium Vulgare* sur la
croissance de *Candida Albicans* responsable
des infections nosocomiales

Soutenue publiquement le 30/09/2019

Devant les membres du Jury :

Président : M. Chadli R.

Pr : U. Mostaganem

Examinatrice : Mme. Aït Chaabani L.

MCB : U. Mostaganem

Encadreur : M. Bahri F.

Pr : U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie et biochimie de l'université de Mostaganem
Année universitaire 2018-2019*

Dédicaces

Aux êtres les plus chers : Mes parents,

A mon père,

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.

J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.

A ma mère,

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanent et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie et son aide si précieuse qui a rendu possible la soutenance de ce mémoire.

Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS PARENTS que je le dois, que Dieu vous garde.

A mes enseignants

A tout ceux qui ont participé, conseiller, enrichi ma connaissance et nourri mon savoir, je leur exprime gratitude et toute ma reconnaissance.

Remerciements

Avant toute chose, louange à Allah, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mr Bahri Fouad, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Mostaganem pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Rabah Chadli, Maître assistante A à l'Université de Mostaganem pour sa précieuse aide et ses conseils et d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme Aït Chaabani Lousia, Maître assistante A à l'Université de Mostaganem pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens à remercier tout les techniciens du Laboratoire biochimie et microbiologie de l'université de Mostaganem, de nous avoir donnés l'opportunité d'effectuer notre mémoire.

ملخص :

Marrubium vulgare هو نبات طبي تم تحديده بين سكان النبات ، معترف به من خلال اهتماماته العلاجية ، وقد أجريت دراسة كيميائية نباتية لتقديم دليل على فعاليته وتوسيع استخدامه في المجالات الكيميائية والبيولوجية للأغراض الكيميائية في الطب بسبب خصائصه المضادة للميكروبات والفطريات ومضادات الأكسدة.

تم إجراء عملية استخراج المصنع بأربعة مذيبات: الميثانول ، وإثير البترول ، والكلوروفورم ، وخلات الإيثيل على التوالي من خلال طريقة الهز بالترطيب لمدة 24 ساعة.

مكننا التحليلات من عزل أحد المستقلبات الثانوية الرئيسية ، الفلافونويدات والعفص. كشف التحليل عن وجود مركبات الفلافونويد والعفص في الخلاصة المعزولة من الأوراق. كشفت الاختبارات الأولية عن بعض المستقلبات الثانوية مثل العفص كاتشين ، السابونوزيد ، الأنثوسيانين ، التربين والستيروول والفلافونويد.

أظهرت اختبارات النشاط المضاد للبكتيريا فاعلية مضادة للفطريات من العفص والفلافونويد ، ويختلف تأثير مبيد الجراثيم تبعاً لطبيعة السلالة والمادة التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium vulgare* ، الفلافونويد ، العفص ، النقع ، القوة المضادة

للفطريات.

Résumé :

Marrubium vulgare est une plante médicinale recensée auprès des populations végétales, reconnu par son intérêt thérapeutique, une étude phytochimique a été réalisé afin d'apporter preuves de son efficacité et d'élargir son utilisation dans les domaines chimiques et biologiques pour des fin chimique en médecine, vu son pouvoir antimicrobien, antifongique et antioxydant.

L'extraction de la plante a été réalisée avec quatre solvants : le méthanol, éther de pétrole, le chloroforme et l'acétate d'éthyle respectivement par la méthode de macération sous agitation pendant 24h

Les analyses effectuées ont permis d'isoler un des principaux métabolites secondaires, les flavonoïdes et les tanins. L'analyse a révélé la présence des flavonoïdes, et les tanins dans l'extrait isolé à partir des feuilles. Les tests préliminaires mis en évidence certains métabolites secondaires comme les tanins catéchiques, les saponosides, les anthocyanes, les terpènes et stérols et les flavonoïdes.

Les tests de l'activité antibactérienne ont montrés la puissance antifongique des tanins et des flavonoïdes, l'effet bactéricide varie selon la nature de la souche et de la substance testée.

Mots clés : *Marrubium vulgare* , les flavonoïdes, tanins, macération , pouvoir antifongique.

ABSTRACT:

Marrubium vulgare is an herbal found among populations, recognized by its therapeutic interest, a phytochemical study was conducted to provide evidence of its effectiveness and to expand its use in the chemical and biological fields for chemical purposes in medicine, regarding to its antimicrobial and antioxidant power.

The extraction of the plant was carried out with four solvents: methanol, petroleum ether, chloroform and ethyl acetate respectively by the shaking maceration method for 24 hours.

Analyses were used to isolate one of the main secondary metabolites, flavonoids. The analysis revealed the presence of flavonoids and tanins in extract isolated from the leaves. Preliminary tests showed some secondary metabolites such as catechiques tannins, saponins, anthocyanins, terpenes and sterols and flavonoids

. The antifongical activity tests have shown the antibacterial power of tanins and flavonoids, the bactericidal effect varies with the nature of the strain and the substance tested.

Keywords: *Marrubium vulgare*, flavonoids, tanins, maceration, antifongical power.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Pourcentage des extraits bruts des feuilles de <i>Marrubium vulgare</i>	32
Tableau 2 : La mise en évidence des métabolites secondaire au niveau des feuilles du <i>Marrubium vulgare</i> L.....	36
Tableau 3 : Activité antifongique des extraits du <i>Marrubium vulgarea</i> sur milieu Muller-Hinton.....	43
Tableau 4 : Activité antifongique des extraits du <i>Marrubium vulgarea</i> sur milieu PDA....	44
Tableau 5 : Activité antifongique des extraits du <i>Marrubium vulgarea</i> sur milieu Sabouraud.	44

Liste des figures

Figure 1 : <i>Marrubium vulgare</i>	6
Figure 2 : Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles	9
Figure 3 : Structures des différentes classes de flavonoïdes.....	11
Figure 4 : Différentes morphologies de <i>C.albicans</i>	18
Figure 5 : Structure du Kétoconazole.....	22
Figure 6 : <i>Marrubium vulgare</i> prise à partir du site d'étude.....	25
Figure 7 : Localisation du site de prélèvement du <i>Marrubium vulgare</i> dans la wilaya d'Aïn Témouchent.....	26
Figure 8 : Etapes d'extraction des flavonoïdes.....	27
Figure 9 : Protocole d'extraction des composés phénoliques de <i>Marrubium vulgare</i>	30
Figure 10 : La mise en évidence des saponosides.....	32
Figure 11 : Exemple de deux tests réalisés sur la mise en évidence des terpènes et stérols et des tanins catéchiques.....	33
Figure 12 : Présence des anthocyanes après le changement de couleur.....	33
Figure 13 : L'absence des cardinolides.....	34
Figure 14 : La présence de la couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.....	34
Figure 15 : Absence des alcaloïdes.....	35
Figure 16 : Poids des extraits du <i>Marrubium vulgare</i> exprimés en (g).....	36
Figure 17 : Rendement d'extraction par macération avec différents solvant.....	37
Figure 19 : Activation des souches sur milieu solide MH, PDA et Sabouraud	40
Figure 20 : Aspect des colonies.....	41
Figure 21 : Observation microscopique du <i>Candida albicans</i> sous un microscope optique de grossissement $\times 40$	41
Figure 22 : Méthodes de diffusion de disques sur les trois milieux de culture.....	42
Figure 23 : Pose de disques immergés des quatre extraits du <i>Marrubium vulgare</i> sur milieu MH.....	42
Figure 25 : Observation macroscopique des zones d'inhibition sur les deux souches <i>C.albicans</i> et <i>C.albicans</i> ATTC.....	45

Liste des abréviations

ABC : **A**TP-**B**inding **C**asette.

ADN : **A**cide **d**ésoxyribo**n**ucléique

CO : **C**ycloo**o**xygénase.

C : *Candida*

DO : **D**ensité **o**ptique.

GGPP : **G**éranyl**g**éranyl**p**yro**p**hosphate.

HE : **H**uile **e**ssentielle.

LO : **L**ipoo**o**xygénase.

MF : **M**ajor **F**acilatator.

MH : **M**ueller-**H**inton.

P.C.B : Milieu à base de **p**omme de terre, **c**arotte et **b**ile.

PDA : **P**otato **d**extrose **a**gar

RA: **R**ice **a**gar.

RAT: **R**ice **A**gar **T**ween.

ROS: **R**eactive **o**xxygen **s**pecies

Table des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....2

Analyse bibliographique

Chapitre I: Lamiacées

1) Généralités sur les extraits de plantes	5
2) Définition des huiles essentielles	5
3) Propriétés des huiles essentielles	5
4) Aperçu bibliographique sur la plante étudiée : <i>Marrubium vulgare</i>	6
a) Famille des Lamiacées	6
b) Distribution	6
c) Intérêt économique	7
d) Espèce <i>Marrubium vulgare</i>	7
e) Composition Chimique.....	8
f) Utilisations de la plante.....	9
5) Aspect phytochimique de <i>Marrubium</i>	9
a) Sesquiterpènes	10
• Composés acycliques	10
• Composés monocycliques.....	10
• Composés bicycliques	7
• Composés tricycliques.....	7
b) Diterpènes	7
c) Triterpènes	8
• Composés aliphatiques.....	8
• Composés tétracycliques.....	8
• Composés pentacycliques.....	8
d) Flavonoides.....	9
• Répartition	9
• Localisation	10

• Structure chimique et classification	10
e) Tanins.....	11
6) Activités biologiques des plantes.....	12
a) Activité antioxydant	12
b) Activité antiproliférative.....	13
c) Activité anti-inflammatoire.....	13
7) Le pouvoir antimicrobien des plantes médicinales.....	13
8) Utilisation de l'huile essentielle.....	14
• Mode d'action	14

Chapitre II : *Candida albicans*

1) Description générale sur l'espèce <i>Candida albicans</i>	17
2) Habitat	17
3) Forme et morphologie	17
4) Reproduction	17
5) Caractères biologiques et physiologiques de <i>Candida albicans</i>	18
a) Caractères biologiques.....	18
b) Caractères physiologiques.....	18
6) Milieux de culture :.....	19
7) Systématique	19
8) Pathogénicité et Facteurs de virulence.....	19
9) Les infections	20
a) Les candidoses	20
b) Les infections nosocomiales	20
10) Les molécules antifongiques	20
a) Les polyènes.....	21
b) Les échinocandines.....	21
c) Les dérivés azolés	21
• Le kétoconazole	21
• Mécanisme d'action	22
11) Résistance de <i>Candida albicans</i> aux antifongiques	23
12) Généralité sur les antibiotiques	23
a) Mode d'action des antibiotiques	23
b) Le mécanisme de résistance aux antibiotiques	23

Chapitre III : Matériel et méthodes

1) Matériel végétal et site de prélèvement	25
2) Tests biochimiques préliminaires.....	26
a) Les saponines	26
b) Recherche des tanins.....	26
c) Quinones libres.....	26
d) Anthocyanes.....	26
e) Recherche des flavonoides.....	27
f) Alcaloïdes.....	27
g) Recherche des Terpènes et des Stérols.....	28
h) Recherche des Cardinolides.....	28
i) Antraquinones libres : Réaction de Borntrager.....	28
3) Préparation des extraits.....	28
a) Extraction par macération	28
b) Rendements des extraits secs	29
4) Etude de l'activité antifongique	31

Chapitre 4 : Résultats et discussion

1) Résultats de l'étude phyto-chimique.....	32
a) Saponosides	32
b) Terpènes et stérols	33
c) Anthocyanes	33
d) Recherche des cardinolides.....	34
e) Recherche des flavonoïdes	34
f) Recherche des alcaloïdes	35
2) Rendement de l'extrait	36
3) Etude de l'activité antifongique	39
4) Aspect des colonies	40
5) Observation microscopique	41

Conclusion et perspectives.....	50
--	-----------

Références bibliographiques

Annexes



Introduction

Introduction :

Candida albicans est un pathogène nosocomiale opportuniste qui ne cesse de causer des problèmes de santé grave dans les structures de soins (**Marot et al, 1993**). Les infections causées par ce microorganisme sont souvent associées avec des résistances accrues aux imidazoles qui sont les principaux antifongiques spécifiques pour combattre cette espèce (**Bouchet et al., 1989**). Les résistances de ce microorganisme aux antifongiques ont connue des taux alarmants ces dernières années avec des morbidités et mortalités très élevés (**Raoult., 1998**). Pour cela la recherche de nouveaux remèdes est une nécessité pour faire face à ce danger et pour assurer les traitements à ces infections.

Les produits d'origine naturelle étaient toujours la source prometteuse de substances inhibitrices des microorganismes, parmi lesquels, le monde végétal est riche en plantes à effet thérapeutique en particulier les effets antimicrobiens (**El-Rhaffari., 2004**). Ces plantes ont été utilisées depuis l'ancien âge pour traiter les diverses maladies infectieuses même avant de connaître l'origine microbienne de ces maladies (**Sijelmassi., 2000**). .

Les essences végétales autrement appelées huiles essentielles sont des substances présentes dans les plantes aromatiques et sont réputées par leur utilisation thérapeutiques depuis des siècles. Ces dernières années, plusieurs recherches ont été faites spécifiquement sur la sensibilité de *Candida albicans* aux huiles essentielles et ont montré des activités anti-*Candida* intéressantes (**Gaussen., 1982**).

L'Algérie est un pays riche en plantes aromatiques et médicinales dont plusieurs sont utilisés depuis longtemps et jusqu'à présent dans la phytothérapie (**Gaussen., 1982**).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale *Marrubium vulgare* qui est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie (**Raynaud., 2007**). Elle est également employée comme Anti nociceptif (**Dejesus., 2000.**), antihypertenseur (**El bardai., 2004.**), antispasmodique (**Rigano ., 2009**), antioedematogénique (**Stulzer., 2006**), analgésique (**Meyre-silva., 2005**), insecticide (**Pavela., 2004**), anti-inflammatoire (**Sahpaz., 2002**), antimicrobien (**Rigano; 2006**) (**Quave., 2008**) (**Warda., 2009**), antioxydant (**Weel., 1999.**), antifongique (**Edziri., 2007**), anti leucémique (**Alkhatib.; 2010**) et dans de nombreuses autres activités biologiques. L'objectif de cette étude est de comparer le rendement d'extraction de la matière végétale par différents solvant, réaliser des test

phytochimique pour déterminer la composition chimique des extraits de la plante *Marrubium vulgare*, poussant à l'état sauvage dans la région de Tlemcen et déterminer l'activité antifongique des extraits des feuilles de la plante vis-à-vis de deux souches *Candida albicans* de référence



Chapitre 1 :

Lamiacées

1) Généralités sur les huiles essentielles extraites de plantes :

L'histoire de l'aromathérapie se divise en quatre grandes périodes au cours desquelles la connaissance des plantes aromatiques et de leur usage s'est affinée.

Au départ, les plantes à essence étaient utilisées telles quelles, incorporées dans l'alimentation, macérées, infusées ou décoctées. Le lien entre leurs vertus thérapeutiques et leur caractère aromatique n'était pas encore établi.

Lorsque l'intérêt thérapeutique de la substance odorante a été envisagé, les procédés d'utilisation ont évolué, les plantes étaient alors brûlées, macérées ou infusées dans des huiles végétales. Plus tard l'invention de la distillation a permis d'extraire les substances odorantes, le concept « huile essentielle » est né. Mais c'est la fin du XIX^{ème} siècle qui marque les débuts de l'aromathérapie moderne (**Yano., 2006**).

2) Définition des huiles essentielles :

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (**Belaiche., 1979**). Pour (**Bruneton. ; 1999**), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont «des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation». La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme: «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero., 1996**).

3) Propriétés des huiles essentielles :

La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieure à celle de l'eau, il existe cependant des exceptions (les HE de cannelle, de girofle et de saffran (**Paltz., 1997**) (**Paris., 1981**).

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles. Elles ont une composition assez complexe (**Azevedo et al., 2001**). On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes

familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Cosentino et al., 1999).

Les HE sont généralement incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. (Paltz., 1997).

4) Aperçu bibliographique sur la plante étudiée : *Marrubium vulgare*

a) Famille des Lamiacées :

La famille des Lamiacées est composée de près de 258 genres et 6970 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres, à tige quadrangulaire et à inflorescences verticillées. Les feuilles sont généralement opposées ou verticillées, simples ou très rarement pennatiséquées ; il n'y a pas de stipule. Les fleurs sont bisexuées et zygomorphes, les inflorescences sont en cymes bipares puis unipares (Par manque de place). Le calice est synsépale, typiquement 5-mère, parfois bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. corolle est sympétale et typiquement bilabiée, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure. L'androcée peut consister soit en quatre étamines didynames, soit en seulement deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes. (Guignard., 2001, Quezel., 1963).

b) Distribution :

Selon (Judd et al., 2002), la distribution géographique des lamiacées est cosmopolite. Les Lamiacées sont rencontrées sous tous les climats, à toutes les altitudes. Certains des 200 genres que compte la famille sont quasiment cosmopolites, d'autres ont une distribution plus restreinte. Rare dans le milieu forestier tropical, les Lamiacées se concentrent dans la région méditerranéenne (Bruneton., 2001). Les Lamiacées comprennent environ 2500 espèces dont l'aire de disposition est extrêmement étendue, elles sont particulièrement abondantes dans la région méditerranéenne (Crété., 1965).

Les Lamiacées sont surtout des plantes méditerranéennes qui, au Sahara ne se rencontrent guère que dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar, sauf les trois espèces *Marrubium deserti*, *Salvia aegyptica* et *Teucrium polium* qui sont plus largement répandues et en particulier, les deux 1ères espèces (Ozenda., 2004).

c) Intérêt économique :

La famille renferme de nombreuses espèces économiquement importantes soit par leurs huiles essentielles, soit pour leur usage condimentaire, elles appartiennent aux genres

Mentha (la Menthe), *Lavandula* (la Lavande), *Marrubium* (le Marrube) , *Nepeta* (L'Herbe aux chats), *Ocimum* (le Basilic), *Origanum* (l'Origan), *Rosmarinus* (le Romarin), *Salvia* (la Sauge), *Satureja* (la Sarriette) et *Thymus* (le Thym). Les tubercules de quelques espèces de *Stachys* sont comestibles. *Tectona* (le Tek) fournit un bois d'oeuvre important. De nombreux genres contiennent des espèces ornementales : on peut citer parmi eux *Ajuga*, *Callicarpa*, *Clerodendrum*, *Monarda*, *Salvia*, *Scutellaire* et *Vitex* (**Judd et al., 2002**).

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoides, flavonoïdes et iridiodes glycosylés. Le genre *Phlomis* comptant près de 100 espèces est particulièrement riche en flavonoides, phénylethanoides, phenylpropanoides et en iridoides glycosilés.

Le genre *Salvia*, comprenant près de 900 espèces majoritairement riche en diterpénoides et le genre *Marrubium* avec environ 30 espèces réparties dans un grand nombre de pays du globe (**Bonnier., 1909**).

Le genre *Marrubium* comporte quelque 30 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasien et quelques pays d'Amérique Latine (**Rigano, 2006, Meyre, 2005**). Il est muni d'un calice à 10 dents, dont les 5 commissurales plus courtes, toutes terminées en pointe épineuse. C'est un Arbuste à tiges et face inférieure des feuilles blanches tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aigues. Les fleurs sont blanches.

En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium deserti* de Noé : (**Quezel., 1963**).

d) Espèce *Marrubium vulgare* :

Le Marrube vulgaire est une Arbuste, d'aspect blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués, a feuilles petites en coin à la base et portant quelque dents au sommet, fleurs en petites glomérules à l'aisselle des paires de feuilles, corolle petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'accroissant considérablement par sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse (**Ozenda., 2004**).

Selon **(Judd et al., 2002)** la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est ainsi:

Règne	Végétale
Embranchement	Angiosperme.
Classe	Eudicotylédones.
Sous-classe	Gamopétale.
Ordre	Lamiales.
Famille	Lamiacées.
Genre	<i>Marrubium</i> .
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i> L.

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom Marriouth **(Quezel., 1963)**, Merrîwt au Maroc **(Bellakhdar., 1997)**, Marroubia en Tunisie **(Boukef., 1986)**. En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. Selon **(Bonnier. ; 1909)**, le Marrube est composé de deux mots hébreux : mar, rob, suc amer.

e) Composition chimique :

On y trouve des diterpènes amers de la série des furanolabdanes et surtout des composés de lactones : marrubiine principalement et son précurseur préfuranique, la prémarrubiine, mais aussi du pérégrinol, du vulgarol, du marrubénol et du marrubiol. Il y a également des Hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique.

En outre il y a des tanins spécifiques des Lamiacées et dérivés de l'acide hydroxycinnamique (juste à 7%) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, limonène) **(Wichtl., 2003)**.



Figure 1: *Marrubium vulgare* (www.le-jardin-ethnobotanique.com)

f) Utilisations de la plante :

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité. Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmés par des essais scientifiques, le marrube blanc est considéré comme antidiabétique Selon les populations anciennes, il aurait une action hypoglycémiant (Roman et al., 1992, Novaes et al., 2001).

Cependant, les résultats d'un essai conduit récemment au Mexique sur 43 sujets diabétiques qui résistaient au traitement classique révèlent que le Marrube n'a pas eu d'effet significatif sur la glycémie (Herrera et al., 2004). La prudence s'impose tout de même pour l'heure. Il n'y a pas eu sur le Marrube d'essais cliniques en double aveugle. Ses usages sont des usages traditionnels bien établis et des études pharmacologiques sur l'animal.

2) Aspect phytochimique :

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* (Ashkenazy et al., 1983) au regard des données bibliographiques ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoides, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les tanins.

a) Sesquiterpènes :

Ce sont des hydrocarbures de formule $C_{15}H_{24}$, soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes vrais (en $C_{10}H_{16}$). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques.

- **Composés acycliques** : On peut citer le farnésène et le farnésol (alcool correspondant du farnésène, essence de Tilleul, (baumes du Pérou et de Tolu). Le nérolidol, isomère du farnésol (essence de Nérol, baume du Pérou).
- **Composés monocycliques** : Le zingibérène (du Gingembre), L'humulène (du Houblon).
- **Composés bicycliques** : Le cadinène (du goudron de Cade).
- **Composés tricycliques** : Les santalènes (du Santa), Les santalols, alcools correspondants des santalènes.

On peut rattacher aux sesquiterpènes, en raison de leur structure, des lactones comme la santoline, l'héliosène, substances non volatiles mais sublimables. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta- et heptacarbonés ; on trouve dans ce groupe le guaïazulène (du Gaïac), les vétivazulènes, le chamazulène (des essences de Chamomille et de Matricaire) (**Bruneton., 1987**).

b) Diterpènes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C_{20} issus du métabolisme du 2E, 6E, 10E-géranylgéranylpyrophosphate (GGPP). On dénombre plus de 1200 produits diterpéniques répartis en une centaine de squelettes. On les rencontre dans certains insectes et divers organismes marins, ils sont surtout répandus chez les végétaux particulièrement dans les espèces des familles Lamiacées, Astéracées et Fabacées. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, tricycliques ou tétracycliques (**Dey., 1991, Bruneton., 1999**).

c) Triterpènes :

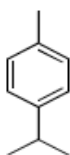
Ces composés en C_{30} sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être aliphatique, tétracycliques ou pentacycliques.

- **Composés aliphatiques** : le squalène, surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.
- **Composés tétracycliques** : l'euphol, l'euphorbol dans les résines d'Euphorbia resinifera Berg. Le butyrospermol de beurre de Karité, dans l'insaponifiable de graisses, les acides éburicoïque, polyporénique chez des champignons (Polypores). Le lanostérol du suint de mouton, retrouvé sous le nom de cryptostérol dans la Levure de bière.
- **Composés pentacycliques** : ils sont très fréquents chez les plantes. On les classe en trois groupes suivant les alcools en $C_{30}H_{50}O$ dont ils dérivent.

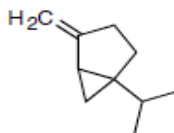
I. Terpenes

-Monoterpenes

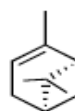
Carbure monocyclic
Cymene ("y") or p.cymene



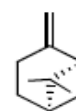
Sabinene



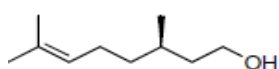
Carbure bicyclic
Alpha-pinene



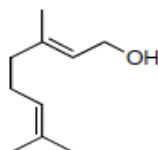
Betapinene



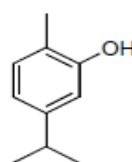
Alcohol acyclic
Citronellol



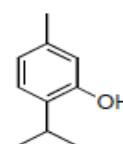
Geraniol



Phenol
Carvacrol

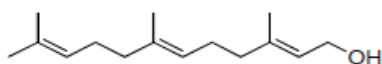


Thymol

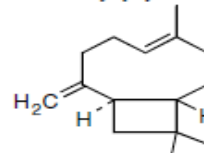


-Sesquiterpenes

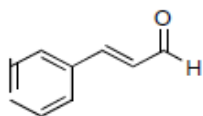
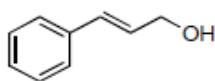
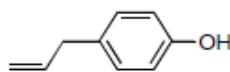
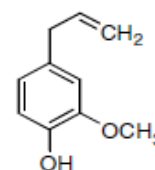
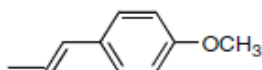
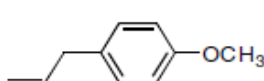
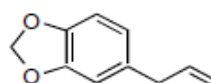
Carbure
Farnesol



Alcohol
Caryophyllene

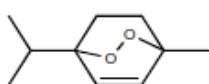


2. Aromatic compounds

Aldehyde
CinnamaldehydeAlcohol
Cinnamyl alcoholPhenol
ChavicolPhenol
EugenolMethoxy derivative
AnetholeMethoxy derivative
EstragoleMethylene dioxy compound
Safrole

3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

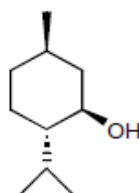


Figure 3: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

d) Flavonoides

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (Rice-Evans et al., 1996). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes.

Ces diverses structures se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

- Répartition :

Les flavonoides sont surtout abondants chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées (Paris., 1980).

La présence de flavonoides chez les algues n'a pas, à ce jour, été démontrée. S'ils sont fréquents chez les Bryophytes (Mousses et Hépatiques), ce sont toujours des flavonoides stricto sensu. Majoritairement des O et C-Hétérosides de flavones et des dérivés O-uroniques.

- **Localisation :**

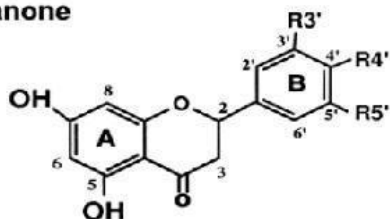
Présents dans les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes feuilles et boutons floraux (**Paris., 1980**).

Les formes hétérosidiques des flavonoides, hydrosolubles, s'accumulent dans des vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle (mais ces deux tissus peuvent accumuler spécifiquement des substances différentes. Comme cela a été démontré chez certaines Céréales, dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (**Bruneton., 1999**).

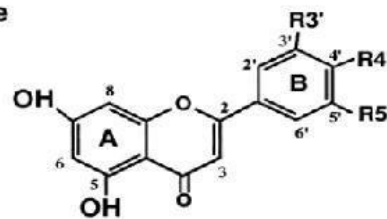
- **Structure chimique et classification :**

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune ce qui explique le fait qu'ils possèdent le même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3. Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central les hétérosides flavonoïdiques, les anthocyanes, les isoflavonoïdes et les flavonoïdes au sens strict comprenant les flavones, les flavonols, les dihydroflavonols, les flavanones ainsi que les aurones et les chalcones (**Bruneton, 1999**).

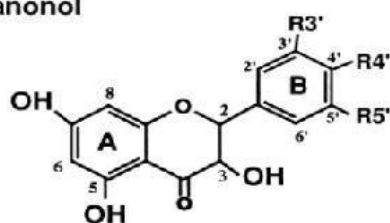
flavanone



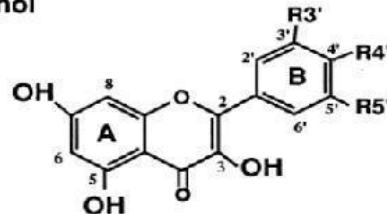
flavone



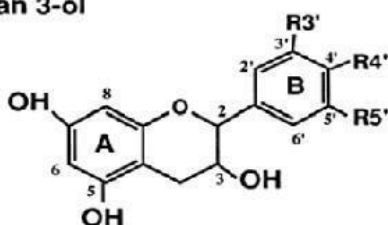
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

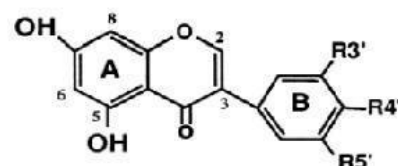


Figure 2 : Structures des différentes classes de flavonoïdes (Bakkali et al., 2008)

e) Tanins

On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, de saveur astringente et ayant la propriété commune de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible et imperméable en se fixant sur les protéines. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides (Paris., 1976).

Les tanins sont très importants dans l'industrie des cuirs, ils agissent en donnant des combinaisons insolubles avec les protéines et rendent ainsi les peaux moins perméables à l'eau et imputrescibles (Paris., 1980).

3) Activités biologiques des plantes

Les plantes, grâce à leurs composés chimiques, sont douées d'activités biologiques importantes dont l'activité antioxydante ou anticancéreuse. Mais, d'autres activités sont reconnues aux plantes ; activité antifongique, antivirale, insecticide, etc.

a) **Activité antioxydant :**

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (reactive oxygen species). Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier., 2003**).

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier., 2006**).

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (**Dacosta., 2003**).

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres, ceci est dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme et à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**).

b) **Activité antiproliférative**

Les plantes constituent un réservoir de molécules ayant une activité antimittotique vis-à-vis des cellules eucaryotes, partant contre les cellules cancéreuses.

Pour la mise en évidence des antimittotiques plusieurs méthodes sont utilisées :

-Test à la tubuline : basé sur l'inhibition de l'assemblage de la tubuline en microtubules ou sur l'inhibition de la désagrégation des microtubules.

-Test sur les oeufs d'oursin en division : il s'agit d'un test d'inhibition de division de l'oeuf d'oursin.^f

-Test sur les cultures cellulaires : il permet d'évaluer l'effet sur la croissance cellulaire des extraits des plantes.

-La cytométrie de flux: analyse le cycle cellulaire. Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues.

c) Activité anti-inflammatoire

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoides possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Sous l'action de la cyclooxygénase (CO) et la lipooxygénase (LO), l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines, et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Les flavonoïdes inhibent la synthèse des eicosanoïdes par inhibition de l'activité de LO et CO, aussi ils provoquent l'inhibition de la peroxydation non enzymatique des acides gras poly insaturés nécessaires pour l'activation de ces oxygénases ce qui provoque un effet anti-inflammatoire.

4) Le pouvoir antimicrobien des plantes médicinales :

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Un grand nombre de plantes, aromatiques, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très importantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture (**Bahorun., 1997**).

Les recherches actuelles sur les molécules antimicrobiennes d'origine naturelle se concentrent principalement sur les plantes, car ils peuvent être achetés plus facilement et seront électionnés sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle (**Yano et al., 2006**).

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales (**Cox et al., 2000 ; Dorman et al., 2000**).

Le mécanisme d'action de ces composés passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, l'interaction avec l'ADN (**Cowan., 1999**).

5) Utilisation de l'huile essentielle :

Les HE sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux).

Les huiles essentielles sont utilisées en médecine alternative depuis très longtemps pour leurs propriétés antimicrobiennes et notamment antifongiques (**Giordani., 2006**).

- **Mode d'action :**

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large due principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à leur nature hydrophobe (**Dorman., 2000**). Les composés terpéniques (les phénols et les aldéhydes) réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Knobloch et al., 1989**).

En général les huiles essentielles empêchent la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines des bactéries. Sur les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium. (**Hulin et al., 1998**).

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al., 2000**).

L'efficacité d'une HE dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l'H.E est riche en substances actives, plus son activité est importante (**Zhiri., 2006**).

Chapitre2 :

Candida albicans

1) Description générale sur l'espèce *Candida albicans* :

Le genre *Candida* apparaît actuellement comme un groupe complexe, hétérogène des levures. Une dizaine d'espèces sont habituellement rencontrées en pathologie, principalement *Candida albicans* qui est en cause de 70- 80 % des cas et un moindre degré *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* (**Bouchet et al., 1989**). *Candida albicans* est une levure polymorphique commensale qui peut entraîner des infections sévères particulièrement chez les patients immunodéprimés. Ce champignon possède ou peut exprimer plusieurs facteurs de pathogénicité (**Marot-Leblond et al., 1993**). En milieu hospitalier, la levure *Candida albicans* représente la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique (**Raoult., 1998**).

2) Habitat :

Candida albicans se trouve dans les cavités naturelles de l'homme, au niveau des muqueuses de la cavité buccale, de l'intestin et du vagin (**Salerno et al., 2011**) et de l'animal où il vit de façon normale et exclusive chez 15 à 30 % du sujet sain. Ainsi, on le rencontre couramment dans le tube digestif où il peut apparaître dans les 24 heures suivant la naissance. C'est un saprophyte exclusif des muqueuses (**Bouchet et al., 1989**).

3) Forme et morphologie :

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, aérobie, diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes. Cette levure peut mesurer de 3 à 15µm (**Kabha et al., 1995**).

Candida albicans a une capacité de croître sous des formes morphologiques variées (figure 2) (**Kumamoto., 2005**).

4) Reproduction :

Le mode de multiplication de *C. albicans* est principalement de type asexué. La multiplication est assurée par bourgeonnement de la blastospore à un pôle particulier de la cellule, donnant naissance, après division du noyau par simple mitose et septation de la cellule, à une blastospore fille qui se dissocie ultérieurement de la blastospore mère (**Odds., 1979**).

Sous certaines conditions (température, pH, composition du milieu de culture), la séparation ne se produit pas à la suite de la septation. Les cellules restent attachées les unes aux autres et forment une chaîne plus ou moins ramifiée appelée pseudomycélium.

Les conditions favorisant la formation de pseudomycélium favorisent également la formation de mycélium vrai chez *C. albicans*. Ce deuxième mode de multiplication végétative consiste en une croissance apicale, conduisant tout d'abord à la formation d'un tube germinatif puis d'un filament mycélien. Le filament mycélien se présente sous la forme d'articles cellulaires cylindriques et séparés par des cloisons ou septa incomplets avec persistance d'un pore central assurant la continuité cytoplasmique (Odds, 1979., Staebell et al., 1985)

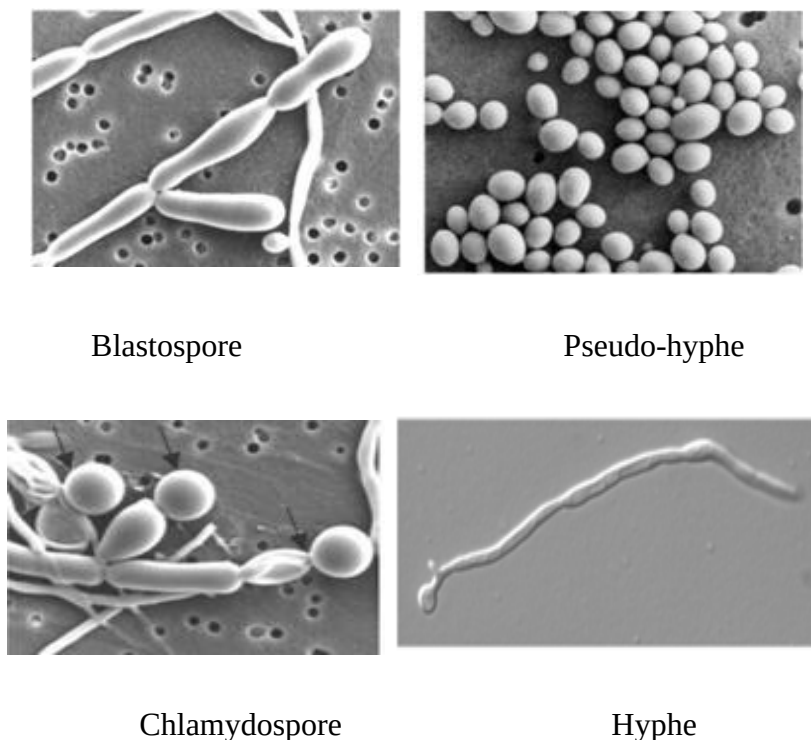


Figure 4 : Différentes morphologies de *C.albicans* (Odds, 1979).

5) Caractères biologiques et physiologiques de *Candida albicans* :

a) Caractères biologiques :

- **Milieu de vie :** Toutes les espèces du genre *Candida* sont aérobies.
- **pH :** La croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7.
- **Température :** la Croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures.

b) Caractères physiologiques :

Cette espèce possède la propriété de fermenter le glucose et le maltose, mais pas le lactose, ni le raffinose, ni le saccharose (**Dupont., 1985**).

Elle est incapable de réduire les sels de tétrazolium et de les transformer en un composé coloré (la colonie restera blanche). *C. albicans* n'élabore pas d'uréase, elle produit une protéase kératolytique, capable de digérer la couche cornée de l'épiderme, d'où la pathogénicité du champignon lorsqu'il est présent à la surface de la peau (**Segretain et al., 1987**).

6) Milieux de culture :

C. albicans peut croître sur des milieux tels que Sabouraud, RAT (Rice Agat Tween), RA (Rice Agar) (**Vaubour, 2007**), milieu P.C.B à base de pomme de terre, carotte, bile.

Un antibiotique comme le chloramphénicol doit être additionné au milieu de culture pour éviter la croissance des bactéries et une contamination par ces dernières (**Raoult., 1998**).

7) Systématique : (Errol et al., 2011)

Règne : Eumycota

Phylum : Ascomycota

Sous embranchement : Saccharomycota

Classe : Saccharomycètes

Famille : Saccharomycetaceae

Genre : *Candida*

Espèce : *Candida albicans*

8) Pathogénicité et Facteurs de virulence :

La pathogénicité du *C.albicans* est largement associée à sa capacité d'adaptation à l'environnement, qui est aussi liée à sa variabilité structurale.

De nombreux facteurs permettent à *C.albicans* d'être virulente :

- **Le dimorphisme** : elle est capable d'échanger entre deux morphologies principales cellule blastospore de levure et des cellules hyphes (**Walther., 2008**).
- **L'adhérence à l'hôte** : elle peut se faire au niveau des muqueuses (adhésines) (**Hoyer et al., 1998**). Elle peut se faire aussi à partir de la formation de biofilm à l'occasion d'un traumatisme de façon iatrogène ou chirurgicale par l'introduction de matières plastiques telles que les cathéters et les sondes urinaires.
- **Sécrétion d'enzymes** : la sécrétion d'enzyme hydrolytique au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires (**Schaller et al., 2005**). Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps) (**Monod., 2002**), des phospholipases (**Ghannoum., 2000**) et des lipases (**Fu et al., 1997**).

Ces facteurs permettent l'invasion et l'autodéfense contre l'hôte et contre les autres processus pathogènes (**Brown et al., 2006**).

9) Les infections :

C.albicans est responsable d'infections qui par leurs gravité, se situent au premier rang des infections fongiques (**Samaranayake et al., 2002**).

C.albicans est une levure commensale présente principalement dans le tube digestif, la sphère oropharyngée et dans le tractus génito-urinaire chez 50 à 70 % des sujets sains (**Ruhnke., 2002**).

C.albicans est de loin l'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine quel que soit le type d'infection considérée (**Develoux., 2005**).

a) Les candidoses :

Les candidoses sont des affections fongiques ubiquitaire et extrêmement répandues. Elles sont communes à l'homme et à certains animaux et sont associées à une augmentation du coût de la prise en charge hospitalière, de la durée d'hospitalisation et de la mortalité (**Zaoutis et al., 2005**).

Il existe différents types de candidose : les candidoses digestives, qui regroupent les candidoses buccales, oropharyngées, oesophagiennes et gastro-intestinales, les candidoses vaginales, les candidoses cutanées et les onychomycoses (pathologies de l'ongle) (Odds, 1987).

b) Les infections nosocomiales :

C. albicans est la quatrième cause des septicémies nosocomiales (Pfaller., 2007), avec un taux de mortalité allant de 37 à 44 % chez les patients immunodéprimés (Moran et al., 2010).

10) Les molécules antifongiques :

Les antifongiques comprennent un groupe important et diversifié de médicaments utilisés pour traiter les infections fongiques. Les antifongiques doivent pénétrer dans la cellule fongique intacte et se fixent sur ses cibles pour perturber le fonctionnement cellulaire et parvenir à un effet fongistatique (Ghannoum., 1999). Leur mécanisme d'action varie, ils inhibent la membrane fongique et la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse de l'acide nucléique, les microtubules et inhibent aussi les altérations des membranes fongiques (Niimi et al., 2010).

Les composés antifongiques utilisés actuellement peuvent être divisés en 5 groupes selon leur mode d'action les polyènes, les échinocandines, les azolés, les fluoro-cytosines, les allylamines, les deux premières sont issues de produits naturels tandis que les trois autres sont synthétiques. (Odds et al., 2003)

a) Les polyènes :

Les polyènes sont des antifongiques naturels produits à partir d'extrait de culture d'actinomycètes (Hatnilton., 1973).

Les polyènes agissent en formant un complexe insoluble avec un stérol membranaire, et plus précisément avec l'ergostérol. En effet, les polyènes ont une très forte affinité avec l'ergostérol, constituant majeur de la membrane cellulaire fongique (Brajtburg et al., 1996).

Le plus utilisée est Amphotericine B.

b) Les échinocandines

Les échinocandines sont des métabolites fongiques secondaires. Elles sont constituées d'un hexapeptide cyclique avec des chaînes aliphatiques de différentes tailles (**Turner et al., 1997**).

Les échinocandines se différencient des autres antifongiques par leur mode d'action original. En effet, elles inhibent la synthèse de la paroi fongique (**Odds, 2003**).

c) Les dérivés azolés :

Il s'agit de molécules de synthèse issues de la modification du noyau azolé. Ce groupe d'antifongiques a en commun un noyau azolé contenant deux atomes d'azote (imidazolé) ou trois atomes d'azote (triazolé) (**Odds et al., 2003**).

- **Le kétoconazole :**

Le kétoconazole est un antifongique imidazole caractérisé par la présence d'un noyau azolé (Figure 5), il est lipophile, pratiquement insoluble dans l'eau (**Winnicka et al., 2012**), soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol, DMSO, DMF(dimethyl formamide) (**Rotstein., 1992**) . Sa formule chimique est : C₂₆H₂₈CL₂N₄O₄ (**Waugh., 2008**).

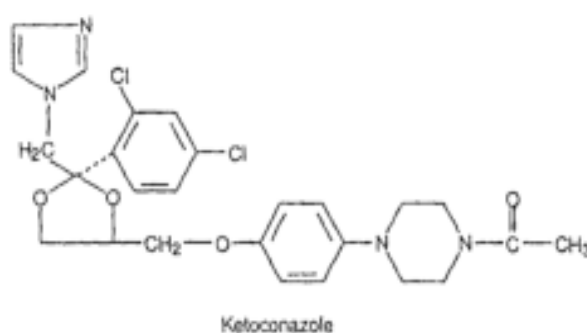


Figure 5: Structure du Kétoconazole (Perry et al., 2003)

Le kétoconazole est l'un des antifongiques administré par voie orale dans le traitement des infections superficielles et profonds (**Sugar et al. 1987**), il est utilisé aussi par voie topique.

L'efficacité du kétoconazole est limitée dans le traitement de la méningite et faible pour les patients immunodéprimés (**Odds., 2003**).

- **Mécanisme d'action :**

Il bloque l'activité d'enzyme lanostérol 14 α -deméthylase (cytochrome). Il inhibe la biosynthèse du l'ergostérol qu'est nécessaire à la formation de la membrane fongique (**Odds., 2003**).

Le kétoconazole inhibe la transformation du *C. albicans* de la forme blastospore à la forme mycélienne (**Gil et al., 1994**).

11) Résistance de *Candida albicans* aux antifongiques :

C. albicans peut résister au antifongique soit par une surproduction de la cible cellulaire de l'antifongique (diminution de son affinité), certaines mutations ponctuelles aboutit la résistance aux antifongique azolés (**Mallory., 2012**).

Soit par des pompes à efflux actif de l'antifongique. Les principales familles de transporteurs qui sont impliquées dans la résistance aux azoles chez les levures, il y a les transporteurs de type MF (Major Facilitator), codé par le gène MDR1 chez *C. albicans* et les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Casette), codé par le gène CDR1 et CDR2 chez *C. albicans*. (**Coste et al., 2007**).

C. albicans est résistant aux échinocandines (**Niimi et al., 2010**), aux azolés (**Coste et al., 2007**), au terbinafine (**Ghannoum., 1999**).

12) Généralité sur les antibiotiques :

a) Mode d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques agissent habituellement soit comme bactéricides (ils tuent les bactéries) soit comme bactériostatiques (ils inhibent la croissance bactérienne et détruisent les bactéries). Par exemple, une bêta-lactamine est bactéricide parce qu'elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne (**Niimi et al., 2010**). Sans cette paroi, la bactérie meurt. D'autres antibiotiques interfèrent avec les processus chimiques internes de la cellule, ce qui entraîne la mort de la bactérie. Les nouveaux types d'antibiotiques, comme les quinolones, provoquent le déroulement de l'ADN de la bactérie en interférant avec une enzyme

bactérienne qui permet à la longue à la molécule d'ADN de se loger dans une petite cellule (Mallory., 2012).

En conséquence, la bactérie ne pouvant pas se diviser ou produire les enzymes nécessaires à son activité normale, meurt.

b) Le mécanisme de résistance aux antibiotiques :

Quelques bactéries sont naturellement résistantes à certains antibiotiques. Mais la résistance est souvent acquise. Les bactéries deviennent résistantes par l'incorporation dans leurs gènes d'un "facteur résistant" qui rend les antibiotiques inefficaces. Cette résistance peut être transmise rapidement à d'autres bactéries par l'intermédiaire de petits fragments de matériel génétique, appelés plasmides. Les gènes résistants peuvent parfois être englobés dans les unités d'ADN appelées transposons qui leur permettent de sauter d'un site d'ADN à un autre.

La multi résistance, grâce à laquelle des bactéries résistent à différents antibiotiques, est transmissible d'une espèce à l'autre. Les changements dans la cellule de la bactérie qui affectent la réceptivité à l'antibiotique ; des modifications de la paroi cellulaire qui font que cette paroi est plus difficilement attaquée par l'antibiotique. Une augmentation de la vitesse d'absorption dans la cellule ou de décharge hors de la cellule, ce qui limite le temps de présence de l'antibiotique et sa concentration dans la cellule, ou la production d'enzymes qui rendent l'antibiotique inefficace.

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

1) Matériel végétal et site de prélèvement :

Le matériel végétal choisi est constitué de feuilles de *Marrubium vulgare* puisque c'est à leur niveau que se trouve la majorité des principales substances actives. Les feuilles de *Marrubium vulgare* ont été récoltées en Février 2019 dans la commune de Béni Saf, qui se situe à l'ouest de la wilaya d'Aïn Témouchent, à environ 30 km à l'ouest d'Aïn Témouchent et 120 km au sud-ouest d'Oran.

Les coordonnées géographiques de la commune de Beni Saf ($35^{\circ} 18' 08''$ nord, $1^{\circ} 23' 01''$ ouest) avec une latitude: **35.3021**, Longitude: **-1.38367** avec une altitude de 25m.

Les feuilles du *Marrubium vulgare* ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Le matériel végétal préparé soumis à des extractions afin d'extraire les différentes classes de composés chimiques contenues dans la plante, pour des tests phytochimiques et biologiques.



Figure 6 : *Marrubium vulgare* prise à partir du site d'étude.



Figure 7 : Localisation du site de prélèvement du *Marrubium vulgare* dans la wilaya d'Aïn Témouchent (https://fr.wikipedia.org/wiki/Béni_Saf)

2) Préparation des extraits :

Dans cette partie de travail, nous avons tenté d'extraire les composés phénoliques par macération en présence des mélanges méthanol, acétate d'éthyle, chloroforme, et l'éther de pétrole.

a) Extraction par macération :

Une quantité de 20 g du matériel végétal séché est mise en contact avec 200 ml de méthanol. La préparation est laissée macérée sous agitation à température ambiante pendant 24 h. à l'abri de la lumière. Après filtration, avec papier (Wattman n°1), l'extrait est évaporé à sec à 50°C avec un rota vapeur. Le résidu sec est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

La macération des autres solvants a été réalisée avec un volume de 100ml et une quantité de 10g de matériel végétal.

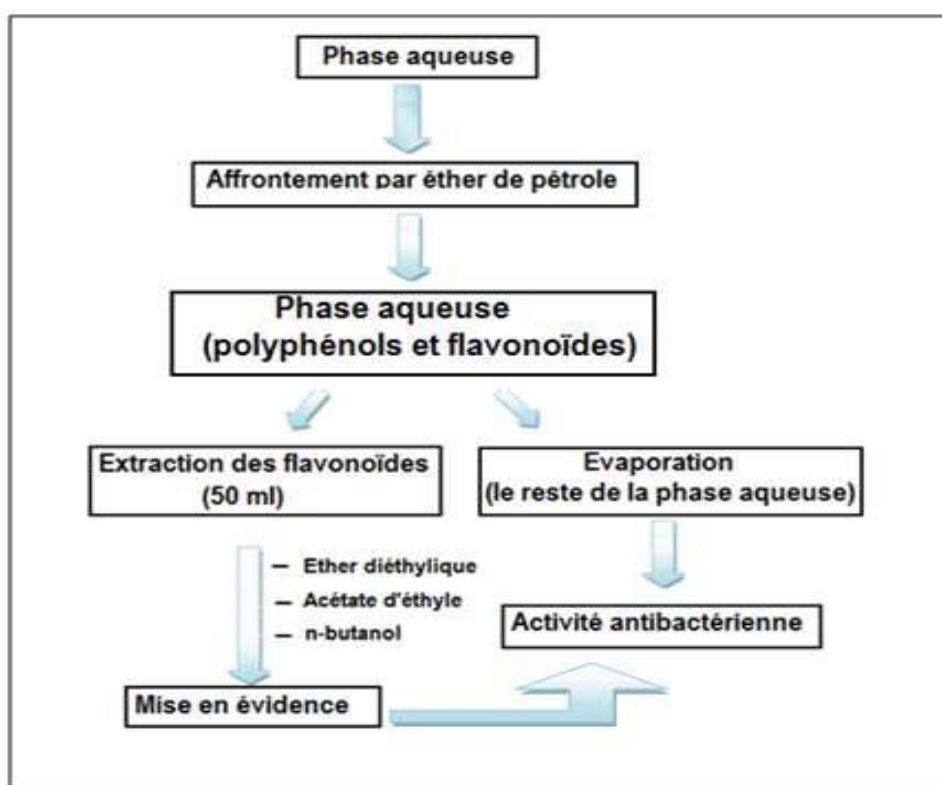


Figure 8 : Etapes d'extraction des flavonoïdes (Rihane et Benlahreche., 2013)

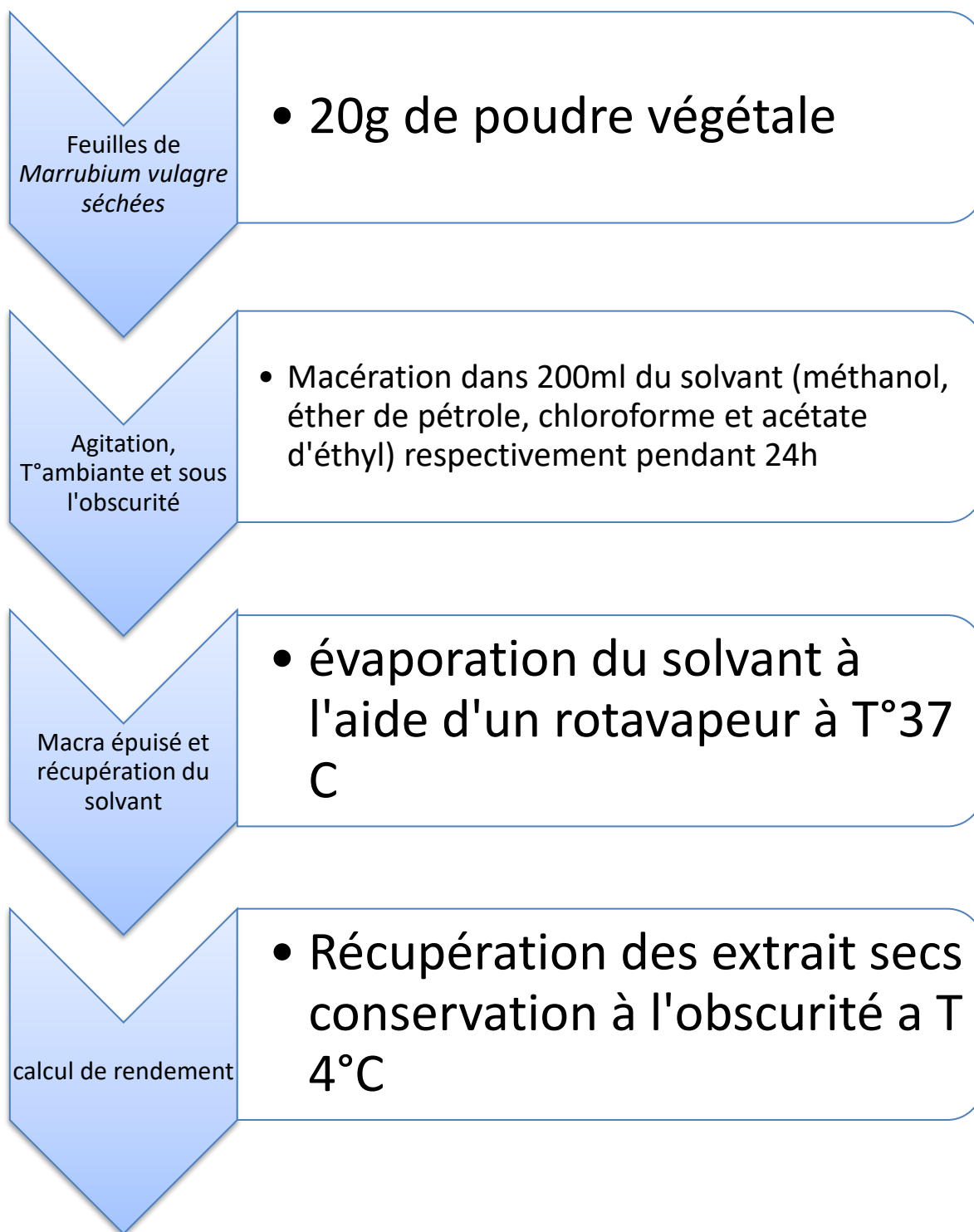


Figure 9 : Protocole d'extration des composées phénoliques de *Marrubium vulgare* (Diallo et al., 2004 ; Falleh et al.,2008)

b) Rendements des extraits secs :

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$R(\%) = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation (g) ;

P2 : poids du ballon avant évaporation (g) ;

P3 : poids de la matière végétale (g).

3) Testes biochimiques préliminaires :**a) Recherche des saponines :**

Dans un tube à essai, introduire 2ml de l'extrait à analyser, ajouter 2ml d'eau distillée chaude, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm d'une mousse indique la présence de saponines.

b) Recherche des tanins :

A 1 mL de d'extrait est ajouté 250 µL de FeCl₃ (1%). La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu-noirâtre (tanins galliques) (Karumi *et al.*, 2004).

c) Recherche quinones libres :

A 1 mL d'extrait est ajouté 0,1 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 10 %.

L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyede., 2005).

d) Recherche anthocyanes

A 1 mL de l'extrait est ajouté 1 mL d'HCl (2N). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violet par addition d'ammoniac, cela indique la présence des anthocyanes (Debrayb *et al.*, 1971).

e) Recherche des flavonoïdes :

A 1 ml d'extrait est ajouté 1 ml d'HCl concentré puis 3 coupes de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge, rose ou orange (Karumi *et al.* 2004).

f) Recherche alcaloïdes

Dans deux tubes contenant 2 ml d'extrait, nous avons ajouté 0,5 mL de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactif de Wagner dans le second. L'apparition d'un précipité blanc ou marron respectivement indique la présence des alcaloïdes (**Mojabe et al., 2003**).

g) Recherche des Terpènes et des Stéroïdes

5 g de la poudre sont macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, Après filtration, la phase organique est évaporée. Le résidu est dissout dans 0.5 ml d'acide acétique (CH_3COOH) en ajoutant 1 ml d'Acide Sulfurique (H_2SO_4) concentré, dans la zone de contact entre les deux liquides. S'il y a apparition d'un cercle violé ou marron devenant gris par la suite, ceci indique la présence des terpènes et stéroïdes.

h) Recherche des Cardinolides

On réalisé la macération de la drogue pulvérisée (1g) dans de l'eau distillée (20 ml), pendant 3h, après filtration du macérât, on prélève 10 ml auxquels on ajoute 10 ml du mélange de la solution Chloroforme (CHCl_3), Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). L'évaporation de la phase organique dans un bain à une 0°C de 90°C . Le précipité est ensuite dissout dans 3 ml de l'acide acétique glacial (CH_3COOH), enfin, on ajoute quelques gouttes de Chlorure Ferrique (FeCl_3) puis 1 ml d' H_2SO_4 concentré sur les parois de tube. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des Cardinolides.

i) Recherche antraquinones libres : Réaction de Borntrager

Dans un tube à essai, ajouter à 5ml de l'extrait, 2,5ml de NH_4OH à 20% puis agiter. Une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.

4) Etude de l'activité antifongique :**a) Souches fongiques testées :**

Dans notre travail, nous avons isolés deux 2souches *C. albicans* ATCC 10231 isolé de l'institut Pasteur Alger, et *C.albicans* isolé du laboratoire d'analyse de l'hôpital de Mostaganem.

Ces espèces bactériennes ont été choisies parce qu'elles représentent les espèces à Gram positif et à Gram négatif les plus communes, responsables d'infections nosocomiales et résistantes aux antibiotiques. (sont des levures- parmi les champignons qu'ils n'ont pas de Gram- ne sont pas des bactéries)

b) Les milieux de cultures utilisés :

- Boillon nutritif :
- Milieu PDA
- Gélose Mueller-Hinton
- Milieu gélose Sabouraud

c) Préparation de l'inoculum :

Chaque espèce est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24 h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées sont mises en suspension dans un bouillon nutritif (ou en eau physiologique à 0,9 % NaCl). Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,12 à 0,15 lue à 530 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 10^8 UFC/ ml (CA-SFM, 2013).



Figure 10 : activation de la souche *Candida* sur milieu solide avant incubation à 37°C.

5) Test d'activité antifongique :

- Couler dans les boîtes de pétri une quantité de gélose nutritive équivalente à 13 ou 15ml;
- Laisser les boîtes entrouvertes devant la flamme jusqu'à complète solidification,
- Déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne (inoculum) sur la surface de la gélose, puis étaler à l'aide d'un écouvillon.
- S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée,
- Déposer à l'aide d'une pince stérile 8 disques (2 pour chaque extrait), imprégnés d'extrait végétal 50µl, sur la surface de la gélose, milieu PDA et Sabouraud respectivement.
- Placer les boîtes de pétri à basse température (+4°C) pendant 15 à 30mn afin de permettre aux extraits de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier.
- Retirer les boîtes du réfrigérateur et les placer à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (37 °C) pendant 24 h. Les boîtes doivent être placées couvercle en bas.

La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque, en prenant la moyenne des trois essais effectués (**Gulluce et al., 2007**).

Après 24 heures d'incubation, mesurer à l'aide d'une règle graduée le diamètre d'inhibition des bactéries autour des disques. Le diamètre (mm) de la zone entourant le disque est proportionnel à la sensibilité du germe étudié.

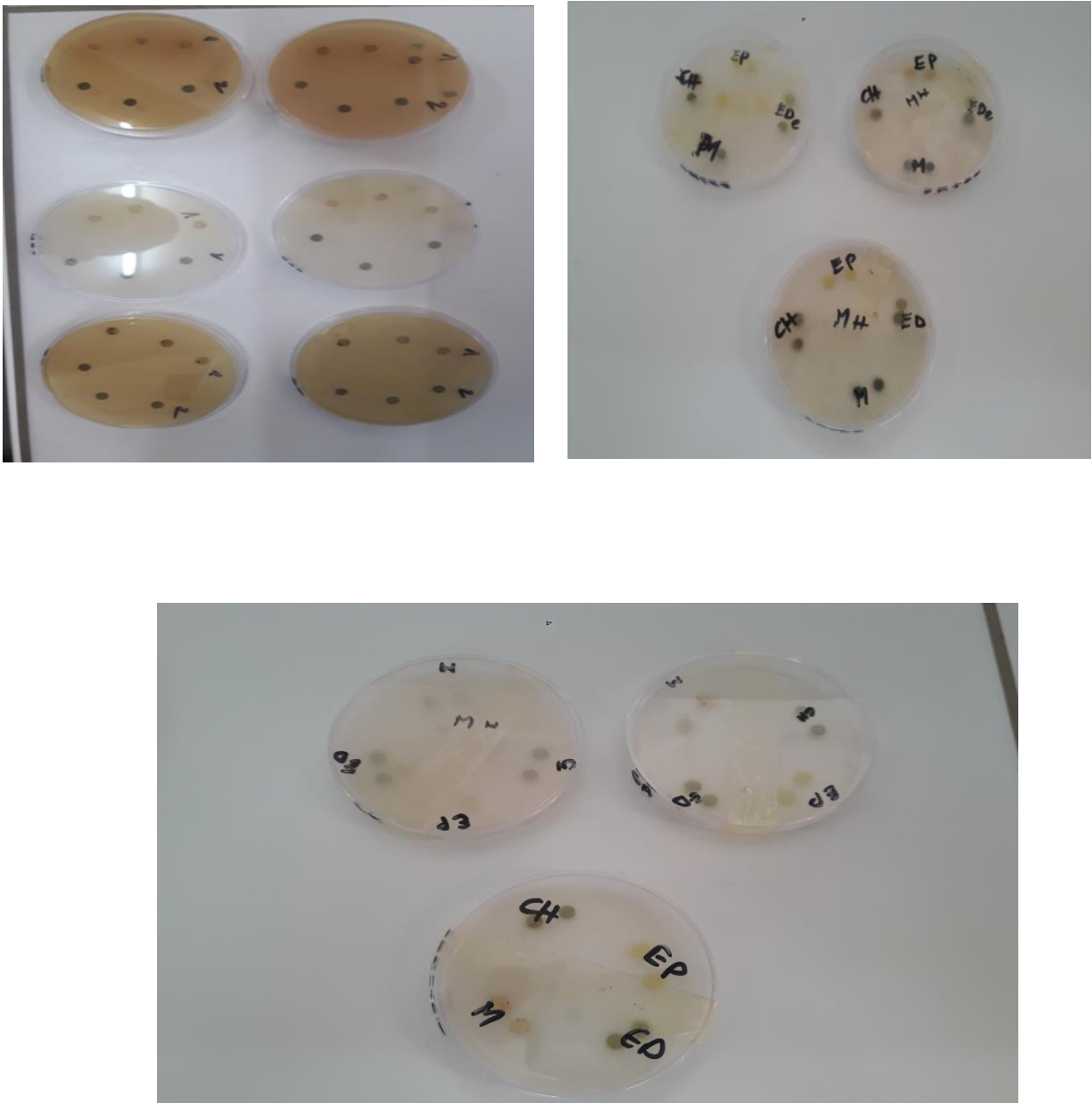


Figure 22 : Méthodes de diffusion de disques sur les trois milieux de culture.

Chapitre 4: Résultat et discussion

1) Rendement de l'extrait :

Les extraits bruts isolés ont été quantifiés selon la formule :

$$R\% = \frac{PEB}{PMV} \times 100$$

R : rendement

PEB : poids de l'extrait brut choisi (g)

PMV : poids de matière végétale (g)

Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau suivant (Tableau 1) :

	Extrait de méthanol	Extrait éther de pétrole	Extrait de chloroforme	Extrait acétate d'éthyle
Poids de l'extrait (g)	5,32	1,81	1,37	1,4
Pourcentage de l'extrait (%)	26 ,6	18,1	13,7	14

Tableau 1 : Pourcentage des extraits bruts des feuilles de *Marrubium vulgare*.

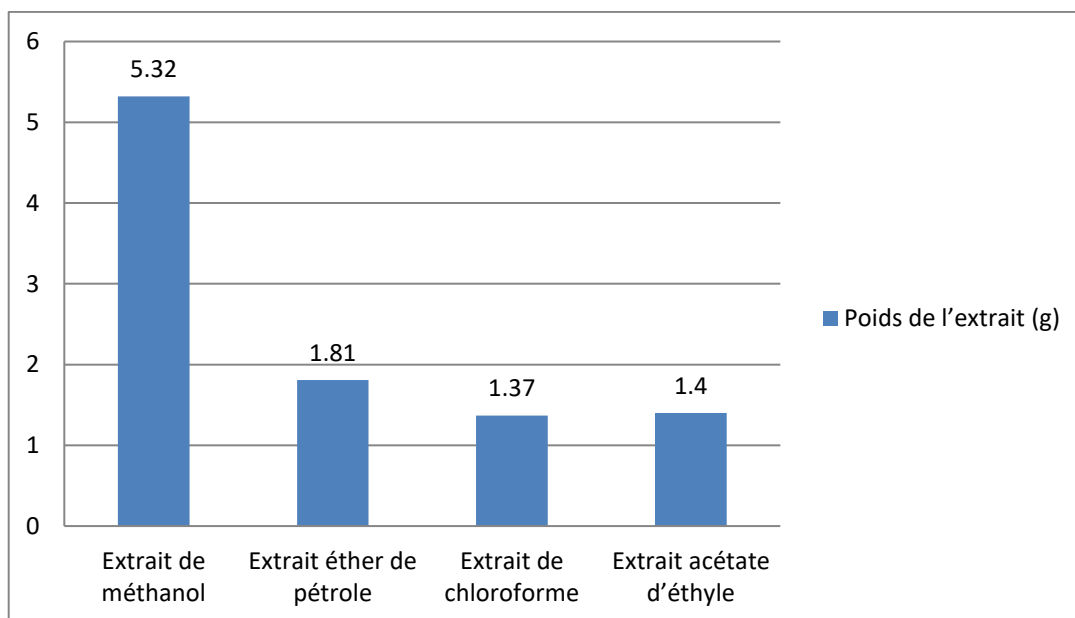


Figure 16 : Poids des extraits du *Marrubium vulgare* exprimés en (g)

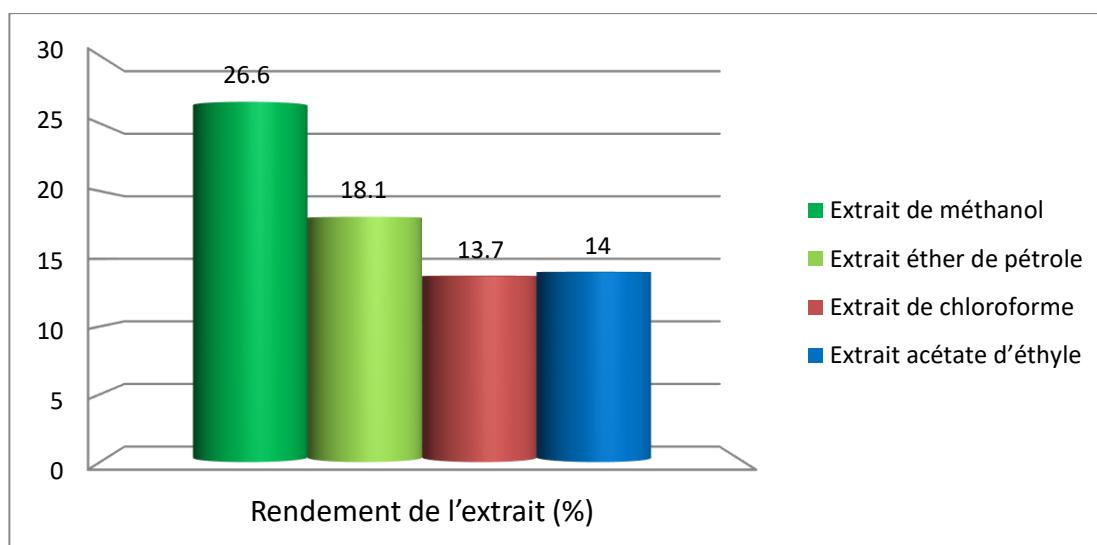


Figure 17 : Rendement d'extraction par macération avec différents solvant (%)

D'après la **figure (16)**, nous remarquons que le rendement en concrète pour la plante varie selon la nature du solvant.

La préparation de l'extrait méthanoïque de la drogue a donné un rendement de l'ordre de 5,32 g, ce qui correspond à un pourcentage de 26,6 %.

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des poly phénols, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant. En plus de ces aspects quantitatives, quelque soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio activité de ces principes actifs.

Un rendement de 39,2 % de l'extrait méthanolique a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par **Kanyonga et al.; 2011**). C'est un pourcentage nettement supérieur à celui obtenu dans notre cas (26,6%, 18,1%, 13,7%, 14% pour l'extrait méthanol, éther de pétrole, chloroforme et l'acétate d'éthyle respectivement). Ceci pourrait être du à la technique utilisée par l'auteur (extraction par soxhlet) et sous une température de 70 °C), ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération.

L'extraction de la matière végétale par l'éther de pétrole ainsi que le solvant chloroforme a donné un rendement de 1,81g et 1,37g, qui donne un pourcentage 18,1% et 13,7% respectivement.

Les travaux réalisés par (**Bendriss., 2003**) sur l'extraction par macération du *Marrubium vulgare* par les solvants éther de pétrole et le Chloroforme ont atteint un rendement de 13,57% et 12,36%, un rendement pas loin des résultats obtenu après notre extraction.

Notre étude a donné un rendement d'ordre de 1,4g qui correspond un pourcentage de 14%, une autre expérience d'extraction par macération du *Marrubium vulgare* par le solvant acétone a donné un rendement de 19% (**Kasmi., 2016**), un résultat bien proche de nos calculs faites après extraction par macération.

Cette variabilité en composés phénoliques entre les différents extraits des plantes étudiées est due probablement à la nature des substances phénoliques contenues dans chaque extrait brut, de leur solubilité d'une part, d'autre part, de méthode d'extraction, de solvant utilisé et de leur polarité.

Selon (**Bruneton., 2009**), l'extraction des tanins est en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et d'acétone ce qui explique nos résultats. Alors que, l'extraction à reflux permet d'extraire le maximum de polyphénols.

Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Counet et Collin (2003) ont montré qu'un mélange acétone/ eau était optimal pour l'extraction des flavonoïdes. Pour les anthocyanidines, le méthanol acidifié (1% HCl) et l'acétone aqueux (70 :30 ; v/v) sont les solvants les plus fréquemment utilisés (**Collin et Crouzet., 2011**).

L'utilisation de mélange eau/Méthanol (50/50) est parfois préalable afin de permettre une extraction appropriée de glycosides. En effet, des études ont indiqué qu'un rapport de 70% de méthanol est utilisé généralement dans l'extraction des flavonoïdes, des acides phénols et leurs dérivés (**Tabart et al., 2007 ; Al-Farsi, 2008**).

Cependant, la solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (**Mahmoudi et al., 2013**).

Il est à noter ainsi que cette variabilité des teneurs en composés phénoliques est influencée par la composition phénolique des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry., 2007**), les conditions biotiques et abiotiques (**Ksouri et al., 2008**), la nature du sol et le type du microclimat et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes (**Atmani et al., 2009**).

2) Résultats de l'étude phyto-chimique :

Les résultats de la mise en évidence des métabolites secondaires sont mentionnés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : La mise en évidence des métabolites secondaire au niveau des feuilles du *Marrubium vulgare L.*

Principes actifs	Présence
Saponines	(+)
Tanins catéchiques	(+)
Tanins galliques	(-)
Anthocyanes	(+)
Leuco-anthocyanes	(-)
Flavonoïdes	(+)
Alcaloïdes	(-)
Terpènes et stérols	(+)
Cardinolides	(-)

(+) Présence

(-) Absence

a) Recherches des saponosides :

La mousse persistante est proche de 1cm dans le 7eme tube alors :

$$I = 9\text{cm} \times 5 / 0,07 \quad I = 642,8$$

L'indice est supérieur de 100 ce qui confirme la présence des saponosides.



Figure 10 : La mise en évidence des saponosides.

b) Recherche des terpènes et stérols :

Figure 11 : Exemple de deux tests réalisés sur la mise en évidence des terpènes et stérols et des tanins catéchiques.

c) Recherche des anthocyanes :

Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

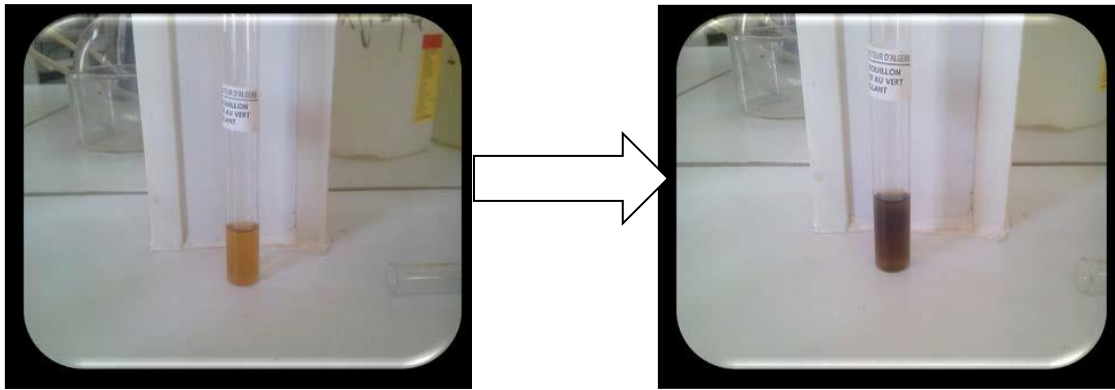


Figure 12 : Présence des anthocyanes après le changement de couleur

d) Recherche des cardinolides

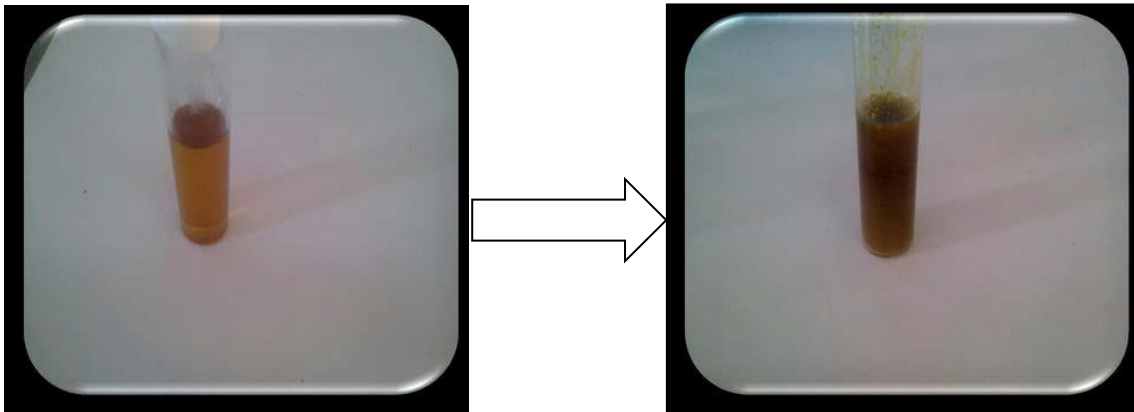


Figure 13 : L'absence des cardinolides.

e) Recherche des flavonoïdes :



Figure 14 : La présence de la couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

f) Recherche des alcaloïdes :

L'analyse phytochimique qualitative des extraits bruts de la partie aérienne de *M.vulgare*, a révélé la présence des saponosides comme constituants majoritaires, aussi bien des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes et des sucres réducteurs.

Par contre, les tests de recherche, des anthocyanes, des coumarines, des alcaloïdes et des anthraquinones ont été négatifs sur nos extraits. Ce ci a été démontré dans les travaux de **(Azzi et al.,2014)**, qui révèlent la présence des flavonoïdes, des tanins, des coumarines, des saponosides, des terpénoïdes, et des sucres réducteurs. Ces différences de composition phytochimique ne sont que le reflet de l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la synthèse des métabolites secondaires par les plantes. En effet, il existe plusieurs facteurs externes pouvant influencer la composition chimique des métabolites secondaires : le sol, la température, et la lumière **(Bourgaud., 2012)**.



Figure 15 : Absence des alcaloïdes.

3) Etude de l'activité antifongique :**a) Aspect des colonies :**

L'aspect macroscopique de *C.albicans* présente des colonies blanches à crème, lisses et crémeuses.



Figure 20 : aspect des colonies

b) Observation microscopique :

Candida albicans est sous forme de blastospore qui représente des petites cellules ovoïdes ; et chlamydospore qui est caractériser par des structures terminales ou latérales arrondies.

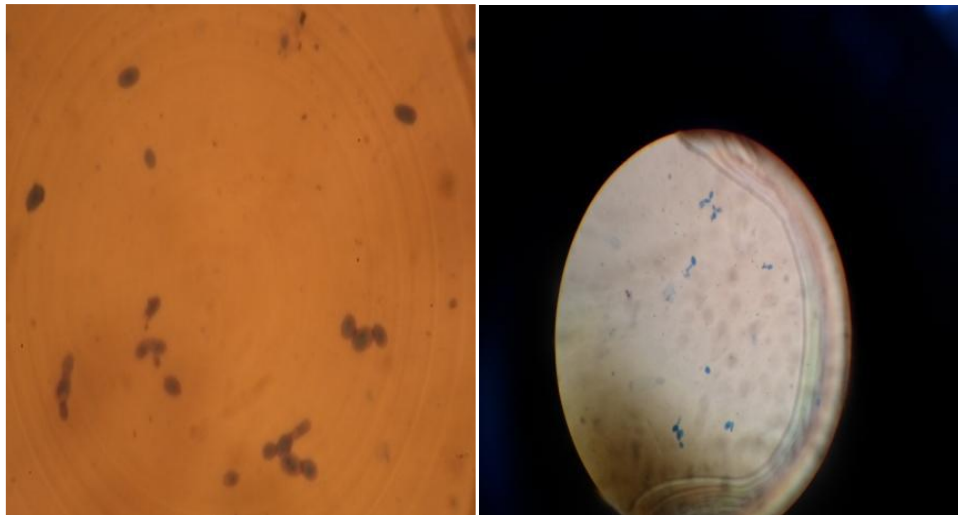


Figure 21 : Observation microscopique du *Candida albicans* sous un microscope optique de grossissement $\times 40$.

Les résultats obtenus après incubation à 37°C durant 24h, on mesure la zone d'inhibition de chaque disque à l'aide d'une règle graduée pour chaque milieu de culture et différents extraits, les résultats sont enregistrés dans les tableaux suivants :

Tableau 3 : Activité antifongique des extraits du *Marrubium vulgarea* sur milieu Muller-Hinton

	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Extrait méthanol	00	00
Extrait éther de pétrole	07,5	08
Extrait chloroforme	08	07
Extrait Acétate d'éthyle	07,5	07,5

Tableau 4 : Activité antifongique des extraits du *Marrubium vulgarea* sur milieu PDA

	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Extrait méthanol	00	00
Extrait éther de pétrole	10	12
Extrait chloroforme	09,5	10
Extrait Acétate d'éthyle	08	07,5

Tableau 5 : Activité antifongique des extraits du *Marrubium vulgarea* sur milieu Sabouraud

	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Extrait méthanol	08	00
Extrait éther de pétrole	10,5	09,5
Extrait chloroforme	09,5	09
Extrait Acétate d'éthyle	07,5	06

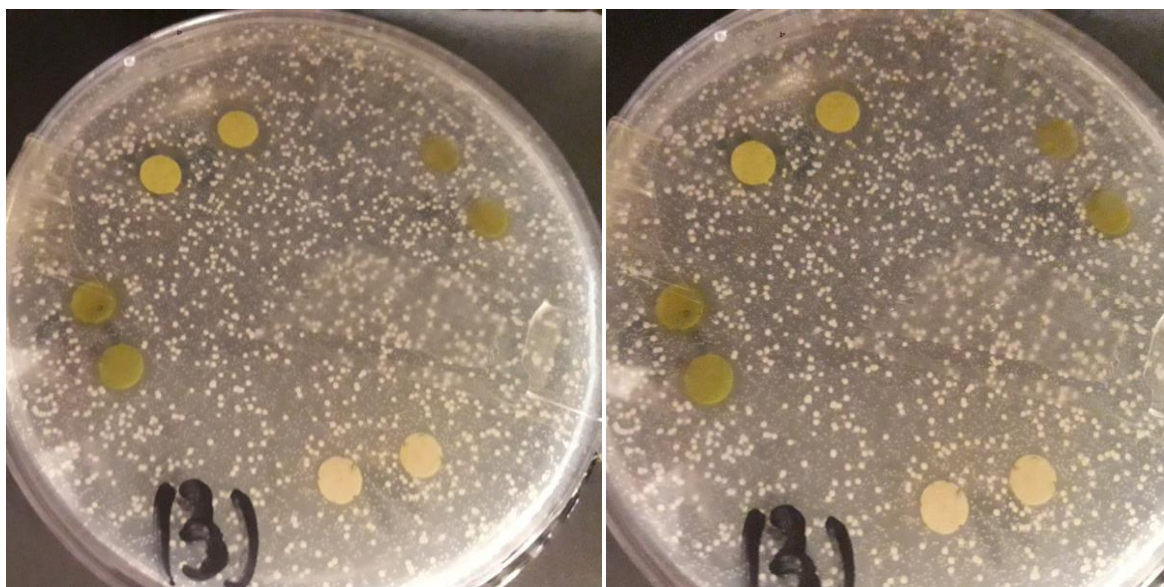


Figure 25 : Observation macroscopique des zones d'inhibition sur les deux souches *C.albicans* et *C.albicans* ATTC

Des zones d'inhibition plus importantes comprises entre 07 et 08 mm sur milieu MH et 07,5 à 12 sur milieu PDA et des zones d'inhibition entre 06mm à 10, 5 mm ont été enregistrées sur milieu Sabouraud pour la souche *C.albicans*.

Globalement, l'extrait tannique des feuilles de l'espèce végétale *Marrubium vulgare* semblent être plus efficace que l'extrait flavonoïdique envers les souches fongiques testées. Les diamètres des zones d'inhibition des tanins sur les trois milieux de culture sont plus élevés que ceux obtenus avec les flavonoïdes. Les zones d'inhibitions sont comprises entre 07 et 12 mm contre 0 et 8 mm pour les flavonoïdes.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique qui vient rivaliser celui des antibiotiques. De nombreux travaux soulignent cet effet antibactérien des principes actifs naturels.

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes.

Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences

des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (**Rhayour., 2002**).

Les recherches réalisées sur l'activité antifongique des extraits naturels isolés des plantes, sont relativement peu nombreuses, notamment vis-à-vis de la plupart des souches telles que *Candida albicans*, nos résultats confirment l'efficacité des extraits du genre *Marrubium* et viennent appuyer les résultats publiés par (**Kanyonga et al., 2011**).

Les recherches réalisées sur l'activité antifongique des extraits naturels isolés des plantes, sont relativement peu nombreuses, nos résultats confirment l'efficacité des extraits du genre *Marrubium* et viennent appuyer les résultats publiés par (**Kanyonga et al., 2011**), (**Khalil et al., 2009**).

Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs. Selon (**Chabot et al., 1992**), l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

D'autre part, (**Mori et al., 1987**) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne. Les travaux antérieurs de (**Sarker et al., 2005**), montrent également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (**Seidel., 2005**). Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons. Si l'on se réfère aux études de (**Moussaid et al., 2012**), l'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante. D'autre part, Il semble également que le broyage avec nitrogène liquide soit recommandé, car le broyage est aussi à l'origine de la génération de la chaleur responsable de la perte

des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (**Jones., 2005**).



Chapitre 4: **Conclusion**

Au terme de ce modeste travail, nous pouvons conclure que les extraits de la plante étudiée, à savoir le *Marrubium Vulgare* a montré une certaine activité antifongique vis-à-vis la levure *Candida albicans*.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence différentes familles de composés chimiques dans les différents extraits bruts de l'espèce végétale étudiée, *Marrubium vulgare*. Dans notre cas, les flavonoïdes n'exercent qu'une activité faible voire à modérée sur *Candida albicans* par rapport aux tanins qui exercent un fort pouvoir fongique vis-à-vis *Candida*.

L'extraction par éther de pétrole nous a permis de distinguer un effet efficace comme étant un solvant organique.

On peut conclure aussi que les extraits de plante par chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol, ont une activité importante, ceci pourrait signifier que la composition du solvant influe l'extraction des principes actifs ce qui répercute sur l'effet des extraits sur la levure.

Il faut noter que ce travail reste à compléter par une étude biochimique (dosage des principes actifs et chromatographie), afin de déterminer avec plus de précision les principes actifs de cette plante.

Nos résultats confirment que les extraits de *Marrubium vulgare* pourraient probablement rivaliser les produits chimiques synthétiques et les antibiotiques qui sont utilisés dans les traitements des maladies infectieuses. Ces tests contribuent à la validation scientifique de l'usage traditionnel massif, de cette espèce, par les populations.

Il serait également intéressant de tester son effet sur d'autres germes responsables des infections chez l'homme. Cette plante, très utilisée par nos populations, sera mieux connue et de la mieux valorisée dans le cadre de la pharmacopée, et pour mieux utiliser notre patrimoine végétal et aussi pour éviter l'usage abusif des drogues chimiques qui ont leurs effets négatifs.



Références bibliographiques

A

- Alkhatib R., Joha S., Cheok M., Roumy V., Idziorek T., Preudhomme C., Quesnel B., Sahpaz S., Bailleul F. & Hennebelle T., 2010. Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*, *Planta Medica*, Vol. 76 (1), 86-87.
- Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania, *J. Fett/Lipid*, Vol. 101 (10), 395-400
- Ashkenazy D., Friedman J., Kashman Y., 1983. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. *Journal of Medicinal Plant Research*, 47: 218-220.
- Azevedo N.R., Campos I.F.P., Ferreira H.D., Portes T.A., Santos S.C., Seraphim J.C. Paula J.R. and Ferri P.H. (2001) - Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 57:733-736.

B

- Baborun T. (1997) - Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit.Mauritius.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008) – Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Bellakhdar J., 1997. Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle. IBS Press. pp. 340-341. Belaiche P. (1979) - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- Bonnier G. (1990) - La grande flore en couleur .Ed. Belin. Paris.
- Boukef M.K., 1986. Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, Les plantes de la médecine traditionnelle tunisienne, Agence de Coopération Culturelle et Technique. Paris. France. pp.163-164.
- Burnie G., Forrester S., Greig D. et Guest S. (2006) - Encyclopédie de botanique et d'horticulture .Ed. Place des victoires, Paris p. 376
- Bruneton J., 2001. Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2ème Ed : TEC & DOC. Paris. 337 p.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 1120 p.

C

- Cosentino S., Tuberoso C. L., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999) – In vitro antimicrobial activity and chemical composition Sardinian Thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol., 29(2) : 130-135.
- Crété P., 1965. Précis de Botanique : Systématique des Angiospermes. Tome II. 2e Ed: Masson, Paris. pp. 368-371.
- Coste, A., M. D. Linas, S. Cassaing, J. Bernad, S. Chalmeton, J. P. Seguela, and B. Pipy(2002). A sub- inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. The Journal of antimicrobial chemotherapy 49:731-740.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R and Wyllie S.G. (2000) - The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.

D

- Dacosta, les phytonutriments bioactifs, 669 references bibliographiques ED,Yves dacosta , paris, 2003 p 317.
- Develoux M., 2001. Griséofulvine = Griseofulvin. Annales de dermatologie et de vénéréologie. 128 (12): 1317-1325.
- Dey P.M., Harborne J.B., 1991. Methods in plant biochemistry. Terpenoids. London Academic press. pp. 7.
- DJAHRA Ali Boutlelis 2013.thèse : Etude phytochimique et activité antimicrobienne,antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA.,ALGERIE.
- Dorman H.J.D, and Deans H.J.D. (2000) - Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2) 308–316,
- Dupont B. (1985).L'écobiologie des Candida. Laboratoire Squibb.
- Duke J. (2009) – Phytochemical and ethnobotanical database. USDA- ARS- NGRI, Beltsville Agricultural research center (<http://www.Ars-grin.gov/duke/>)

- Donlan R.M., (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8:881-890.

E

- Edziri H., Ammar S., Groh P., Mahjoub M.A., Mastouri M., Gutmann L., Zine M. & Aouni M., 2007. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama retama* in Tunisia, *Pak. J. Biol. Sci.*, Vol. 10, 1759-1762.
- Errol Reiss, Jean Schadomy. H, Marshall Lyon(2011). *Fundamental Medical Mycology*. ISBN 978-0-470-177791-4.

F

- Favier A. (2003) – Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 2006; 64: 390-396.

G

- Garnero J. (1996) - Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico-chimiques. vol. papier n°: K2.
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501-517.
- Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole* 2005; 554-558.
- Giordani R., Hadeif Y. and Kaloustian J. (2008) – Composition and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79 : 199-203.
- Guignard J.L. (2001) – *Biochimie végétale*. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185.

H

- Herrera A.A., Aguilar S.L., *et al.*, 2004. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*. 11(8): 561-6.
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. (1998) - Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18: 563-582.

J

- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P., 2002. Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1ere Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384.
- Jordan M.J., Martinez R.M., Goodner K.L., Baldwin E.A. and Sotomayor J.A. (2006) - Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*.

K

- Kabha Kisra, Liat Nissimov , Abed Athman , Yona Keisari, Haralambos Parolis ,
- Leseley A. S.Parolis , RuTh M. Grue, Jutta Schlepper-Schafer , Alan R.B. Ezekowitz Dennis E. Ohman, and Itzhak Ofek (1995). Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *INFECTION AND IMMUNITY* .p.847-852 Vol.63.
- khalil A., dababneh B.F., Al-gabbiesh A.H., 2009. Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal jordanian plants. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 7 (2): 103-106.
- Kanyonga P.M, Faouzi M.A, Meddah B, Mpona M, Essassi E.M, Cherrah Y., 2011.
- Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3: 199-204.
- Knobloch, K., A. Pauli, et al. (1989). "Antibacterial and antifungal properties of essential oil components." *Journal of Essential Oil Research* 1(3): 119-128.

- Kumamoto, C.A., and Vines ., M.D.(2005) Contributions of hyphae and hypha-coregulated genes to candida albicans virulence. Cell Microbial 7:1546-1554
- .Ketsawatsakul U., Whiteman M., Halliwell B., 2000. A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. Biochemical and Biophysical Research Communications. 279: 692-699.

M

- Mallory and craven (2012), Candida albicans Dap1 p promotes Ergosterol synthesis via the P450 Protein Erg11/Cyp51 p , Regulating Susceptibility to Azole Antifungal Drugs , Morphogenesis and Damage Resistance .Pharmacologia 3 (7) : 179-189.
- Matkowski A., Piotrowska P., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia. 77: 346-353.
- Meyre-silva C., Yunes R.A., Schlemper V., Campos-buzzi F. & Cechinel V., 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), *IL Farmaco.*, Vol. 60 (4), 321-326.
- Mohammedi Z. (2006) – Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UABB de Tlemcen.
- Muller P., Fellin R., Lambrecht J., Agostini B., Wicland H., Rost W., Sadel D., 1974.
- Hypertriglyceridemia, secondary to liver disease, *European Journal of Clinical Investigation*. 4: 419-428.

N

- Niimi, Masakazu, Firth, Norman A., et Cannon, Richard D, (2010). Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* vol. 98, no 1, p. 15-25.

O

- Odds, F. C. (1979). *Candida and Candidosis*, Leicester University Press ed, London.

- Odds, F. C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12:45-93.
- Odds, F. C. (1994). "Candida species and virulence: The study of virulence attributes in *Candida albicans* has come of age, and the host- fungus interplay may be more complex than previously realized." *ASM News* 60(6): 313-318.
- Odds, F. C. (2003). "Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication." *Mycologist* 17(02): 51-55.
- Ozenda P., 2004. Flore et végétation des saharas. 3^{ème} Ed : CNRS édition. Paris. pp.399-402.
- Ozturk I.C., Ozturk F., Gul M., Ates B., Cetin A., 2009. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*. 27: 309–315.

P

- Pavela R., 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants, *Fitoterapia.*, Vol. 75, 745–749.
- Paris M. et Hurabielle M. (1981) – Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339
- Paris R.R., Moyse H., 1976. Matière Médicale. Tome I. 2^{ème} Ed : Masson, Paris. 406p.
- Perry J.J., Staley J.T., et Lory S. (2003) - Microbiologie. Cours et questions de révision. Ed. Dunod.
- Platzer N. (2002) - Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.

Q

- Quave C., Plano L., Pantuso T. & Bennett B., 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 118 (3), 418-428.
- Quezel P. et Santa S. (1963) - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1, Edition CNRS, Paris.

R

- Raja S., Nazeer Ahamed K.F.H., Kumara V., Mukherjee K., Bandyopadhyay A., Mukherjee P.K., 2007. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride-treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 41-7.
- Ramdani M., Rached O., Laouer H., El Kolli M. and Lograda T. (2007) - Chemical composition and antimicrobial activity of *Cupressus dupreziana* A. Camus. *Natural Product Communication*. 2 (9): 945-949,
- Raoult, D. (1998) .Dictionnaire de maladies infectieuses : épidémiologie, diagnostic. 2-84299-036-6.
- Reynaud J. (2002) - La flore du pharmacien. Ed.TEC et DOC, Paris.
- Rolland Y. (2004) – Antioxydants naturels végétaux. OCL. 11(6) : 419-424.
- Raynaud J., 2007. Prescription et conseil en phytothérapie. Ed : Tec & Doc. Paris. 149p.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.
- Rigano D., Formisano C., Basile A., Lavitola A., Senatore F., Rosselli S. & Bruno M., 2006. Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*, *J. Phytother. Res.*, Vol. 21, 395-397.
- Roman R.R., Alarcon-Aguilar F., et al., 1992. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research*. 23(1): 59-64.
- Rousseau P.A.J., 1978. Intérêt diagnostique du dosage de certains enzymes plasmatiques en pathologie hépatique bovine : tude bibliographique expérimentale. Thèse de doctorat : vétérinaire. Université Paris-Est Créteil. 89 p.
- Russel A. D., (1991) – Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics : food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(3): 191-201.

S

- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. et Radice M. (2005) – Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- Samaranayake L.P, Fidel P.L., Naglic J.R., Sweet S.P., Teanpaisan R., Coogam M.M., Blignaut E. and Wanzala P., (2002) fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*; 2:151-160.
- Sahpaz S., Garbacki N., Tits M. & Bailleul F., 2002. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*, *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 79 (3), 389-392.
- Sijelmassi A (2000) Les plantes médicinales du Maroc. Edition Le Fennec.
- Sugar, A., S. Alsip, et al. (1987). "Pharmacology and toxicity of high-dose ketoconazole." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31(12): 1874-1878.

W

- Warda K., Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Abbad A., Romane A. & Bouskraoui M., 2009. Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 3 (3), 101-104.
- Wang B.S., Li B.S. and Zeng Q.X. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry*. 107 : 1198-1204.
- Weel K.C.G., Venskutonis P.R., Pukalskas A., Gruzdiene D. & Linssen J.P.H., 1999.
- Wichtel M. et Anton R. (1999) - Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
- Winnicka, K., M. Wroblewska, et al. (2012). "Hydrogel of ketoconazole and PAMAM dendrimers: Formulation and antifungal activity." *Molecules* 17(4): 4612-4624.
- (www.le-jardin-ethnobotanique.com)

Y

- Yano Y., Satomi M. & Oikawa H., 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio arahaemolyticus*, *International J. Food Microbiology*., Vol. 111, 6-11

Z

- Zaoutis T, E., Argon J., Chu J., Berlin J. A., Walsh T . J. and Feudtner C (2005) The epidemiology and attributable outcomes on candidemia in adults and children hospitalized in the united states : A propensity analysis . Clin infect Dis ; 41:1232-1239.

Annexes :

Principaux Milieux de culture (Composants g/ litre)

Bouillon nutritif : Peptone.....10 g Extrait de levure.....3 g Extrait de viande.....3 g Le chlorure de sodium.....5 g pH : 7,4	Muller Hinton : Extrait de viande:3 g Peptone de caséine:..... 17,5 g Amidon:1,5 g Agar:16 g pH : 7,4
PDA : Glucose20g Agar.....15g Extrait de pomme de terre1000ml pH : 5,6	Sabouraud : Peptone..... 10 g Glucose20g Agar15 g pH : 5.7 ± 0.2