

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة د. مولاي الطاهر

Université de Saida Dr MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Biochimie**

Thème

**Contribution à l'étude des mécanismes d'action des huiles essentielles de l'écorce de *Cinnamomum cassia* et des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* vis-à-vis des isolats de *Candida albicans***

Présenté par :

- M<sup>elle</sup> : BAGHDAD Chaimaa
- M<sup>elle</sup> : CHERIFI Nour El Imene

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. ADLI Djallal Eddine Houari	MCA U. de Saida
Examineur	Mr. BENREGUIEG Mokhtar	MCA U. de Saida
Rapporteur	Mr. HALLA Noureddine	MCA U. de Saida
Invité	Mr. RACHEDI Abdelkrim	MCA U. de Saida

Année universitaire 2021/2022



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة د. مولاي الطاهر

Université de Saida Dr MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Biochimie**

Thème

## **Contribution à l'étude des mécanismes d'action des huiles essentielles de l'écorce de *Cinnamomum cassia* et des fruits de *Ammodaucus leucotrichus* vis-à-vis des isolats de *Candida albicans***

Présenté par :

- M<sup>elle</sup> : BAGHDAD Chaimaa
- M<sup>elle</sup> : CHERIFI Nour El Imene

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. ADLI Djallal Eddine Houari	MCA U. de Saida
Examineur	Mr. BENREGUIEG Mokhtar	MCA U. de Saida
Rapporteur	Mr. HALLA Nouredine	MCA U. de Saida
Invité	Mr. RACHEDI Abdelkrim	MCA U. de Saida

Année universitaire 2021/2022

## Dédicaces

Aujourd'hui l'histoire est finie.

J'ai levé mon chapeau et dit adieu aux années passées.

Tout d'abord, Je remercie Dieu de m'avoir offrir la santé, le courage et la volonté pour réaliser cette mémoire ,pour la patience qui nous a donné durant toutes les années d'études , je dédie ma remise de diplôme et le fruit de ma réussite pour ceux qui ont le mérite de ce succès a mes chers parents.

A Qui m'a soutenu moralement et matériellement tout au long de ma carrière scolaire, Mon père Hadj Djillali qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, que dieu le garde et le protège .Papa Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consenti pour mon éducation et ma formation.

Une dédicace spéciale pour ceux sous ses pieds paradis, ma chère amie, ma mère Nadia merci pour être toujours avec moi, son amour sa tendresse et son sacrifice pour tout ce que je ne parviendrai jamais à lui rendre ce qu'elle a fait pour moi.

A mes très chère sœurs chaima et Fatima et a ma très cher frère Hocine ; et aussi ma petite princesse Ratile, Merci d'être dans ma vie et Merci pour votre soutien.

Aux les enseignants qui ont fait partie importante de mon cursus éducatif. Et je n'oublie pas mes chers amis sans exception et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et surtout ma tante et son mari, et mes grandes parents Hadj Otman et Hadj Miloud.

**IMANE**

---

## Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents, À l'homme qui m'a appris les principes de la vie, qui a fait de moi une forte guerrière ; mon papa Boualem.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse: mon adorable mère Fatima qui m'a soutenu et encouragée durant toutes les

---

années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A ma chère docteur Aicha , ma sœur qui a partagée avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail elle m'a chaleureusement supportée et encouragée tout au long de mon parcours.

A ma chère sœur Setti et ses enfants,

A mes deux frères Hadj et Mohammed

À ceux qui ont cru en mes capacités , pour tous ceux qui m'ont encouragé, pour tous ceux qui m'aiment, je dédie ce travail.

**CHAIMAA**

---

## Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de réaliser ce travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr. **HALLA Noureddine**, on le remercie pour sa patience, sa rigueur, sa disponibilité.

Notre remerciement s'adresse à Mr. **RACHEDI Abdelkrim** pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

Nos vifs remerciements aux membres du jury :

**Mr. ADLI Djallal Eddine Houari et Mr BENREGUIEG Mokhtar**

pour leur présence, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.

Nous tenons à remercier Mr **SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib** pour son aide et son soutien et ainsi pour les conseils qui nous a donné.

On remercie également tous nos professeurs pour leurs générosités, et la grande patience, dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Merci à tous les responsables du laboratoire pédagogique de l'Université de Dr MOULAY Taher Saida, ainsi qu'à tous nos collègues avec qui nous avons partagé nos expériences et nos beaux moments.

---

## Liste des abréviations

MH : Muller Hinton.

GN : gélose nutritive

GS : gélose saboraud

BS: bouillon saboraud

DMSO: DiMethyl SulfOxyde

HE : Huiles essentielles.

ATCC : American Type Culture Collection

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

UV : ultraviolet

g : Gramme.

Kg : kilogramme.

m : mètre

mg: Milligramme

min: Minute

ml: Millilitre

µg: Microgramme

µL: Microlitre

PS : Extrait de *Ammodaucus leucotrichus* qui obtenu par soxlet.

PM : Extrait de *Ammodaucus leucotrichus* qui obtenu par macération.

CS : Extrait de *Cinnamomum cassia* qui obtenu par soxlet.

CM : Extrait de *Cinnamomum cassia* qui obtenu par macération.

F : Fungizone.

---

## Liste des tableaux

Tableau 01 : médicaments antifongiques.....	18
Tableau 2 : Composition chimique de l'huile de fruit d' <i>A. leucotrichus</i> .....	33
Tableau 3 : résume les Matérielles et les produits de laboratoire utilisé au cours de l'expérimentation.....	41
Tableau 4 : résume le protocole de soxlet de deux plante ( <i>Cinnamomum cassia</i> et <i>Ammadocus leucotrichus</i> ) .....	47
Tableau 5: résume le Protocole de macération de deux plante <i>Cinnamomum cassia</i> et <i>Ammadocus leucotrichus</i> .....	49
Tableau 6: représente le rendement des huiles de <i>C. cassia</i> et d' <i>A. leucotrichus</i> .....	63
Tableau 7 : représente les rendements des extraits de <i>C.cassia</i> et d' <i>A.leucotrichus</i> .	65
Tableau 8 : représente les polyphénols qui sont présents dans les extraits (CS, PS et PM).....	68
. Tableau 10 : tableau résume la présence d'un groupe de métabolites secondaires dans les trois extraits (CS, PM et PS). .....	70
Tableau 11: les CMI des huiles essentielles et les extraits éthanolique de <i>Cinnamomum</i> et d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> ; et du fungizone .....	71
Tableau 13: les propriétés des principaux composés de Monoterpènes d'hydrocarbures de l'huile essentielle d' <i>Ammaudocus leucotrchus</i> .....	81
. Tableau 14: les propriétés des principaux composés des Monoterpènes oxygénés de l'huile essentielle d' <i>Ammaudocus leucotrchus</i> .....	82
Tableau 15 : la formule et structure 2Det 3D de Lanosterol.....	83
Tableau 16 : représente les inhibiteur de CYP51 : 1YN (basé sur une étude de recherche et 3D-structure PDB id 5v5z)......	83

## Liste des figures

Figure 1 : Morphologie de <i>Candida albicans</i> .....	7
Figure 2 : Les quatre formes de <i>C. albicans</i> . <i>C. albicans</i> est sous forme levure (c) et	
Figure 3 : Organisation cellulaire d'une cellule de levure (Caraës, 2016). ....	8
Figure 04: Ergostérol libre (à gauche) et ergostérol estérifié ou .....	10
Figure 5 : voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>S.cerevisiae</i> .Le nom des gènes	12
Figure 6 : Reproduction sexuée chez <i>C. albicans</i> impliquant obligatoirement deux	14
Figure 7: voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>Candida albicans</i> .....	17
Figure 8 : <i>Cinnamomum cassia</i> .....	26
Figure 9 :Structures chimiques de divers constituants de <i>Cinnamomum cassia</i> .....	28
Figure 10 : <i>Ammodaucus leucotrichus</i> .....	30
Figure 11 :structures des principaux constituants de d'A.....	34
Figure 12 : Cannelle en bâtonnets et broyée .....	42
Figure 13 : fruits d' <i>Ammodocus leucotrichus</i> .....	43
Figure14 : Ensemencement par stries des souches de <i>C. albicans</i> .....	44
Figure 15 : montage utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle de <i>Cinnamomum cassia</i> .....	45
III.6. Figure 16 : montage utilisé pour l'extraction de l'huile essentiel d' <i>Ammodocus leucotrichus</i> .....	46
Figure 17: préparation des extraits éthanoïques par Soxhlet.....	48
Figure 18 : préparation des extraits éthanoïques par macération. ....	50
Figure 19 : filtration du produit des soxhlet .....	51
Figure 20: dosage des métabolites secondaire.....	52
Figure 21 : préparation de la pré-culture des souches étudiés. ....	54
Figure 22 : préparation des dilutions des huiles essentielles.....	55
Figure 23 : la méthode de CMI par dilution d'agar sur milieu solide (MH). ....	56

---

Figure 24 : traitement des souches sélectionnées avec des concentrations en huiles essentielles égale à la CMI la plus faible .....	57
Figure 25 : incubation des cultures sous l'agitation. ....	57
Figure 26 : centrifugation et lavage des cellules en phase stationnaire. ....	58
Figure 27 : détermination du poids net humide du culot cellulaire.....	58
Figure 28 : incubation dans le bain d'eau à 85°C pendant 1h. ....	59
Figure 29 : extraction des stérols par l'addition du mélange d'eau distillée stérile et éther de pétrole. ....	60
Figure 30 : homogénéisation du mélange.....	60
Figure 31 : la couche de n-heptane et stérol.....	60
Figure 32 : transfert de la couche d'éther de pétrole. ....	61
Figure 33 : dilution de stérol extrait dans l'éthanol.....	61
Figure 34 : la lecture des extraits de stérol diluée par spectrométrie UV-Visible entre 230 et 300.....	61
Figure 36 : l'extrait éthanoïque de <i>C. cassia</i> .....	66
Figure 37 : Examen macroscopique de <i>C. albicans</i> .....	67
Figures 38: l'observation microscopique de <i>C. albicans</i> (G x 100). ....	68
Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols. ....	69
Figure 40: Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes. ....	70
Tableau 9 : représente les flavonoïdes qui sont présents dans les extraits CS, PS et PM. ....	70
Figure 41 : CMI par dilution d'agar de l'huile essentielle d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i>	73
Figure 42 : CMI par dilution d'agar de l'huile essentielle de <i>Cinnamomum cassia</i> .....	73
Figure 43 : CMI par dilution d'agar de l'extrait éthanolique obtenu par macération et Soxhlet d' <i>A. leucotrichus</i> . ....	74
Figure 44 : CMI par dilution d'agar de l'extrait éthanolique obtenu par macération de <i>C. cassia</i> .....	75
Figure 45 : CMI par dilution d'agar de l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet de <i>C. cassia</i> .....	75
Figure 46: CMI par dilution d'agar de l'antifongique fungizone. ....	76

---

---

Figure 47 : Résultats des CMI des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de <i>C. cassia</i> et d' <i>A. leucotrichus</i> et ainsi que du fungizone contre les souches fongiques	77
Figure 48: Courbe de dosage des stérols membranaires de <i>Candida albicans</i> traitées par les huiles essentielles d' <i>Ammaudocus leucotrchus</i> et <i>Cinnamomum cassia</i> .....	80
Figure 49 : Résumé des données sur la striction de l'enzyme CYP51 dans une structure complexe avec inhibiteur antifongique 1YN.....	85
Figure 50: L'inhibiteur 1YN dans la poche de liaison entouré de résidus de contact. Au bas de la poche de liaison, l'inhibiteur lie le groupe Heme à travers l'anneau de triazole .....	86
Figure 51 : En rose, l'inhibiteur 1YN est entouré de résidus de site de liaison. Le groupe Heme, laissé en couleur par type d'atome (cpk), de l'enzyme CYP51 est fortement lié à l'anneau triazole de l'inhibiteur.....	87
Figure 52: Liste des ligands liés à l'enzyme; inhibiteur 1YN et groupe prothétique Heme (HEM). Cliquer sur le lien « Environnement » génère le tableau détaillé vu dans cette image .....	88
Figure 53: Détails des types de liaisons et de contacts non liés trouvés entre l'inhibiteur 1YN et les éléments de structure secondaire (et les boucles possibles) de l'enzyme. La liste n'est pas citée dans cette image, mais les utilisateurs du SSFS peuvent faire défiler la liste et même enregistrer l'ensemble de la table.....	88

---

## Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la contribution à l'étude des mécanismes d'action des huiles essentielles de l'écorce de *Cinnamomum cassia* et des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* vis-à-vis des isolats de *Candida albicans*. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par entraînement à la vapeur et le rendement était de 0.44% pour *C. cassia* et 0.43% pour *A. leucotrichus*. L'extraction par l'éthanol a été réalisée par deux méthodes macération et par Soxhlet. Les rendements obtenus étaient de l'ordre de 12 % (CM - *C. cassia* macération), 5.6 % (CS - *C. cassia* Soxhlet), 15.05 % (PS - *A. leucotrichus* macération) et 20.50 % (PM - *A. leucotrichus* Soxhlet). Ensuite, un dosage spectrophotométrique des extraits a été mené pour la quantification des polyphénols et des flavonoïdes qui a montré la présence de ces métabolites secondaires dans les deux plantes et beaucoup plus dans *C. cassia*. En plus, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices des extraits et des huiles essentielles des deux plantes vis-à-vis 11 souches de *C. albicans* qui sont différentes par leur résistance. Les résultats obtenus ont enregistré des valeurs de CMI de 0.0468 mg/ml à 0.0234mg/ml pour HE de *A. leucotrichus* et de 0.0125mg/ml pour l'HE de *C. Cassia*. Quatre souches ont été sélectionnées pour la détermination de taux de l'ergostérol membranaire qui représente une cible antifongique très intéressante et nous avons trouvé que les souches les plus sensibles ont un taux très faible d'ergostérol. Dans la dernière partie nous avons abordé l'interaction moléculaires de différents composants de l'huile essentielle avec l'enzyme clé de la biosynthèse de l'ergostérol fongique de *C. albicans* (CYP51) en utilisant la bioinformatique. Nous avons enregistré que les composants de l'huile essentielle de fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* ne peuvent pas faire une forte liaison avec la grande poche de liaison allongée de l'enzyme CYP51 et donc l'étude d'arrimage est futile sur eux pour cette enzyme.

**Mots clés** : *Candida albicans*, Ergostérol, *Cinnamomum cassia*, *Ammodaucus leucotrichus*, Huile essentielle, Mécanisme d'action.

---

## Abstract

This work is part of the contribution to the study of the mechanisms of action of the essential oils of the bark of *Cinnamomum cassia* and the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* against the isolates of *Candida albicans*. The extraction of essential oils was carried out by steam distillation and the yield was 0.44% for *C. cassia* and 0.43% for *A. leucotrichus*. The ethanol extraction was carried out by two maceration methods and by Soxhlet. The yields obtained were around 12% (CM - *C. cassia* maceration), 5.6% (CS - *C. cassia* Soxhlet), 15.05% (PS - *A. leucotrichus* maceration) and 20.50% (PM - *A. leucotrichus* Soxhlet). Then, a spectrophotometric assay of the extracts was carried out for the quantification of polyphenols and flavonoids which showed the presence of these secondary metabolites in the two plants and much more in *C. cassia*. In addition, we determined the minimum inhibitory concentrations of extracts and essential oils of the two plants against 11 strains of *C. albicans* which are different in their resistance. The results obtained recorded MIC values of 0.0468 mg/ml to 0.0234mg/ml for EO from *A. leucotrichus* and 0.0125mg/ml for EO from *C. Cassia*. Four strains were selected for the determination of membrane ergosterol level which represents a very interesting antifungal target and we found that the most sensitive strains have a very low level of ergosterol. In the last part we discussed the molecular interaction of different components of the essential oil with the key enzyme of fungal ergosterol biosynthesis of *C. albicans* (CYP51) using bioinformatics. We have recorded that the components of *Ammodaucus leucotrichus* fruit essential oil cannot make strong binding with the large elongated binding pocket of the CYP51 enzyme and therefore docking study is futile on them for this enzyme.

**Keywords:** *Candida albicans*, Ergosterol, *Cinnamomum cassia*, *Ammodaucus leucotrichus*, Essential oil, Mechanism of action.

## ملخص

يعد هذا العمل جزءًا من المساهمة في دراسة آليات عمل الزيوت العطرية للحاء *Cinnamomum cassia* وثمار *Ammodaucus leucotrichus* ضد عزلات *Candida albicans*. تم استخلاص الزيوت العطرية عن طريق التقطير بالبخار وكان المردود 0.44% لنبات *C. cassia* و 0.43% ل *A. leucotrichus*. تم استخلاص بالإيثانول باستعمال طريقتين: النقع وبواسطة جهاز Soxhlet. كانت النواتج التي تم الحصول عليها حوالي 12% (CM - *C. cassia maceration*) ، 5.6% (CS - *C. cassia Soxhlet*) ، 15.05% (PS - *A. leucotrichus macration*) و 20.50% (PM - *A. leucotrichus Soxhlet*). بعد ذلك ، تم إجراء اختبار الطيف الضوئي للمستخلصات المدروسة لتقدير البوليفينول والفلافونويد الذي أظهر وجود هذه المستقلبات الثانوية في النباتين مع كمية معتبرة في نبات *C. cassia*. بالإضافة إلى ذلك ، حددنا الحد الأدنى من التركيزات المثبطة للمستخلصات والزيوت الأساسية للنبتين ضد 11 سلالة من *C. albicans* التي تختلف في مقاومتها. سجلت النتائج التي تم الحصول عليها قيم MIC من 0.0468 مغ / مل إلى 0.0234 مغ / مل ل *A. leucotrichus* و 0.0125 مغ / مل ل *C. Cassia*. بعدها تم اختيار أربع سلالات لتحديد مستوى الأرغوسترول الغشائي والذي يمثل هدفًا مثيرًا للاهتمام لمضادات الفطريات ووجدنا أن السلالات الأكثر حساسية لها مستوى منخفض جدًا من الإرغوستيرول. ناقشنا في الجزء الأخير التفاعل الجزيئي لمختلف مكونات الزيت الأساسي مع الإنزيم الرئيسي للتخليق الحيوي للإرغوستيرول الفطري (CYP51) باستخدام المعلوماتية الحيوية. لقد سجلنا أن مكونات الزيت الأساسي لفاكهة *Ammodaucus leucotrichus* لا يمكن أن تقيم رابطًا قويًا بجيب الربط الممدود من إنزيم CYP51 ، وبالتالي فإن دراسة الالتحام لا جدوى منها بالنسبة لهذا الإنزيم.

**الكلمات المفتاحية:** *Candida albicans* ، أرغوسترول ، *Cinnamomum cassia* ، *Ammodaucus*

*leucotrichus* ، زيت أساسي ، آلية التأثير .

---

**Table des matières**

<b>PARTIE I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
III.1. Généralités sur <i>Candida Albicans</i> :.....	4
III.1.1. Taxonomie.....	5
III.1.2. Morphologie .....	5
III.2. Organisation cellulaire :.....	7
III.3. Paroi Cellulaire.....	8
III.4. Composition lipidique de la membrane plasmique :.....	9
III.5. L'ergostérol :.....	9
III.6. La voie de biosynthèse de l'ergostérol : .....	10
III.6.1. Régulation.....	11
Fonctions de l'ergostérol.....	13
III.7. Physiologie et Conditions de Croissance.....	13
III.8. Epidémiologie : .....	14
III.9. Médicaments Les médicaments antifongiques et leurs modes d'action :.....	15
III.9.1. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ergostérol .....	16
III.9.2. Médicaments qui perturbent la membrane plasmique.....	19
III.9.3. Médicaments qui affectent la synthèse du glucane :.....	20
III.9.4. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ADN et l'ARN :.....	20
III.9.5. Autres médicaments antifongiques : .....	21
III.9.6. Les échecs des thérapies antifongiques .....	21
III.10. Résistance aux agents antifongiques chez <i>C. atbicans</i> :.....	21
III.11. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice : .....	22
III.12. Généralité sur les huiles essentielles.....	23
III.13. Présentation de l'espèce étudiée « <i>Cinnamomum cassia</i> ».....	25
III.13.1. .Généralité sur les canneliers : .....	25
III.14. Présentation de la plante : .....	25
III.15. Critères organoleptiques de <i>C. cassia</i> : .....	26
III.15.1. Constituants actifs : .....	26
III.15.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i> :.....	27

---

III.15.3. Les Propriétés et l'effet thérapeutique de <i>C.cassia</i> : .....	27
III.15.4. Mécanisme d'action : .....	28
III.16. La plante <i>Ammodaucus leucotrichus</i> .....	29
III.17. Présentation de la plante : .....	30
III.17.1. Géographique : .....	31
III.17.2. Systématique : .....	31
III.18. Description botanique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> : .....	31
III.19. Propriétés thérapeutiques .....	32
III.20. Composition chimique .....	32
III.21. Phytochimie : .....	34
III.21.1. Activités pharmacologiques : .....	35
III.21.2. Activités antioxydantes .....	35
III.21.3. Activités antidiabétiques .....	36
III.21.4. Activités anti-inflammatoires .....	36
III.21.5. Activités anticholinestérasiques .....	37
III.21.6. Activités de cytotoxicité .....	37
<b>PARTIE IV. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>39</b>
IV.1. Matériel et méthodes : .....	40
IV.1.1. Objectif et le plan de travail .....	40
IV.2. Matériel : .....	41
IV.2.1. Matériel végétal : .....	42
IV.2.2. Matériel biologique : .....	43
IV.3. Identification: .....	44
IV.3.1. Examen macroscopique: .....	44
IV.3.2. Examen microscopique : .....	44
IV.4. Extraction de l'huile essentielle : .....	44
IV.4.1. <i>Cinnamomum cassia</i> : .....	44
IV.5. <i>Ammodaucus leucotrichus</i> : .....	45
IV.6. Décantation et conservation des huiles essentielles : .....	46
Calcul du rendement .....	46
IV.7. Préparation des extraits éthanoliques : .....	47

---

---

IV.8. Calcul le rendement de l'extrait.....	48
IV.9. Extraction par macération : .....	48
IV.10. Dosage des métabolites secondaire.....	50
IV.10.1. Dosage de la teneur en polyphenols totaux (TTP).....	50
IV.10.2. Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT).....	50
IV.10.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI): .....	51
IV.11. Préparation de pré-culture : .....	52
IV.11.1. Préparation de la suspension fongique :.....	53
IV.11.2. Préparation des dilutions des huiles essentielles :.....	53
IV.11.3. Préparation des dilutions des extraites.....	54
IV.11.4. Extraites de <i>Cinnamomum cassia</i> :.....	54
IV.11.5. Extraits d' <i>Ammadocus leucotrichus</i> : .....	54
IV.11.6. Préparation de dilution du fungizone :.....	54
IV.12. Inoculation et détermination des CMI sur milieu solide : .....	54
<b>PARTIE V. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>62</b>
V.1. Calcul des rendements des huiles essentielle : .....	63
V.2. Le rendement de HE d' <i>A. leucotrichus</i> :.....	63
V.3. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes. ....	67
V.4. Les polyphénols .....	67
V.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	70
V.6. Les huiles essentielles : .....	71
V.7. Les extraits éthanoliques (Sohxlet/macération) : .....	73
V.7.1. Les extraits d' <i>A. leucotrichus</i> :.....	73
V.7.2. L'antifongique Fungizone :.....	75
V.8. Résultats de la détermination de taux d'ergostérol par spectrophotomètre:....	78
V.9. Etude de Docking sur la possibilité de l'effet inhibiteur des composés d'huile essentielle extraite de la plante <i>Ammadocus leucotrichus</i> sur l'enzyme CYP51:.....	80
V.9.1. Nature des composés extraits : .....	80
V.9.2. Monoterpènes oxygénés : .....	82
V.10. Comparaison chimique et structurale du substrat naturel et les inhibiteurs du CYP51 : .....	83

---

---

V.11. Inhibiteur de CYP51 : 1YN (basé sur une étude de recherche et 3D-structure PDB id 5v5z).....	83
V.12. Détails de liaison de l'inhibiteur 1YN : .....	84
<b>PARTIE VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>89</b>
<b>PARTIE VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>90</b>
<b>PARTIE VIII. ANNEXES .....</b>	<b>98</b>
VIII.1. Annexe 1 .....	99
VIII.2. Annexe02 : nl'observation microscopique des souches de candida albicans..	101
VIII.3. Annexe :03 .....	103

# **PARTIE I. INTRODUCTION**

---

## Introduction

Les pathogènes fongiques représentent une grande charge sur la santé humaine, car ils sont responsables d'environ 1,6 million de décès dans le monde chaque année (Almeida, 2019). Ces pathogènes sont principalement opportunistes et causent des infections systémiques qui affligent les populations immunodéprimées, comme les patients qui suivent une chimiothérapie ou des traitements aux stéroïdes, ainsi que les personnes atteintes du sida (Fisher et al., 2020). L'un des principaux pathogènes est *Candida albicans*, qui est un composant naturel du microbiote humain qui peut devenir pathogène lors de la suppression immunitaire de son hôte. Les cas de candidose invasive à l'échelle mondiale ont été estimés à 700000 par année, et *C. albicans* a été classé comme le principal agent étiologique de ces infections nosocomiales (Bongomin, 2017). Étant donné que ces infections opportunistes sont une comorbidité de premier plan pour une gamme de problèmes de santé sous-jacents, elles sont associées à des taux de mortalité extrêmement élevés de 40 % (Kullberg and Arendrup, 2015). Cette situation est aggravée par l'insuffisance des options disponibles pour traiter ces maladies (Kali et al., 2022).

Le traitement des infections fongiques systémiques est délicat car il est difficile d'éliminer un eucaryote chez un eucaryote sans des effets néfastes, ce qui le rend limité à trois grandes classes d'antifongiques seulement, sont : les azoles, les échinocandines et les polyènes. Malheureusement, chacun de ces antifongiques présente des inconvénients majeurs, comme une faible biodisponibilité, un spectre d'activité limité ou une toxicité pour les hôtes (Robbins, 2017). En outre, leur utilité accrue dans les milieux cliniques a contribué à une hausse des isolats résistants, de sorte que les Centers for Disease Control and Prevention ont déclaré le genre *Candida* est résistant aux dérivés azolés (Kali et al., 2022).

Nous faisons maintenant face à un grave problème, et nous n'avons qu'une bonne compréhension des mécanismes de résistance de ces levures contre les médicaments disponibles. En règle générale : un mécanisme

d'action bien identifié, génère des nouvelles aspirations pour de nouvelle cible pour de nouveaux antifongique.

La sévérité de la candidose, en plus de la pauvreté dans la thérapeutique antifongique, nous a forcés à regarder à la source inépuisable de remèdes naturels sous les herbes thérapeutiques (Boucherit-Otmani, 2013). De nouveaux remèdes efficaces et sûrs pour les Candidoses sont nécessaires, la médecine verte ou les plantes médicinales continuent d'être une aide thérapeutique importante pour soulager les maux de l'humanité. On sait que les produits végétaux jouent un rôle important dans la découverte de médicaments et la biologie chimique.

Dans cette étude, nous avons concentrés sur la cannelle et l'*Ammaudocus* en tant que des plantes médicinales qui sont utilisées depuis plusieurs milliers d'années dans la médecine traditionnelle orientale et occidentale, à des fins thérapeutiques telles que l'activités anti-inflammatoires, antimicrobienne, antifongique, antioxydante, antidiabétique, anticancéreuse, anticoagulante et aussi esthétiques.

Ainsi, le but de notre travail est d'étudier les mécanismes d'action des huiles essentielles de l'écorce de *Cinamomum cassia* et des fruits d'*Ammaudocus Leucotrichus* vis-à-vis des isolats de *Candida albicans*.

# **PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre I

Les champignons « encore appelés "Fungi" (contraction du latin "funus" qui signifie funérailles, et "ago" qui signifie produire) ou mycètes (du grec mukês, champignon) ». sont des organismes eucaryotes, uni- ou pluri cellulaires, thallophytes, non chlorophylliens. Ces organismes sont immobiles et hétérotrophes: incapables de photosynthèse, ils se développent à partir d'une source extérieure de carbone en tant que saprophytes, parasites ou par symbiose , La structure du thalle ou appareil végétatif permet de distinguer deux types de micromycètes: les champignons filamenteux (thalle pluricellulaire, sous forme de filament ou hyphe) regroupant les moisissures et les dermatophytes, et les levures (thalle unicellulaire, circulaire ou ovoïde). Certains champignons dits dimorphiques possèdent des morphologies différentes à l'état saprophytique (forme filamenteuse) et à l'état pathogène (forme levure) (Garnaud, 2017).

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires qui appartiennent au domaine des champignons, ils se multiplient par bourgeonnement (Youcef-Ali, 2014). Les levures ont tout la capacité de convertir le sucre en alcool et en dioxyde de carbone, donc ils sont apte à provoquer la fermentation des matières organiques. *Candida albicans* est un microorganisme de la famille des levures, il est responsable de divers et communs infections, comme la candidose buccale ou la vaginite (Bruchlen., 2016). Cette levure représente la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés (Youcef-Ali, 2014).

### **II.1. Généralités sur *Candida Albicans* :**

*Candida albicans* est un organisme mycotique qu'il appartient de la famille des levures asexuées et classées dans le groupe des Fungi imperfect , il est le mieux étudié et le plus répandu des champignons humains pathogènes qui se trouvent normalement dans la muqueuse de l'organisme humain en quantité relativement limitée (Berman, 2012), dont Il est présent au niveau des

muqueuses buccales, digestives et génitales ,Chez le sujet sain, la levure se répartit différemment selon les sites de prélèvement, le réservoir principal reste le tube digestif :peau (3%) ;vagin (13%) ;tractus ano-rectal (15%) ;cavité buccale (18%) ;estomac et duodénum (36%) ;le jéjunum et iléon (41%) (Youcef-Ali, 2014).

*C. albicans* est donc nécessaire à l'équilibre du microbiote et sa présence n'est pas pathologique. Cependant ces microbes peuvent devenir pathogènes en raison de modification de l'environnement ou d'un affaiblissement du système immunitaire de l'hôte (Barros, 2018). Il prolifère et devient libérateur de toxines. Les infections causées par les espèces *Candida* sont connues sous le nom de "candidose" Mais il existe des noms communs décrivant des pathologies spécifiques tel que le Muguet (ou candidose buccale) (El Kirat, 2010). Une candidose provoque des mycoses, habituellement bénignes mais qui peuvent être graves chez le sujet immunodéprimé.

### **II.1.1. Taxonomie**

Les espèces de genre *Candida* comprennent plus de 200 espèces, mais seule une dizaine sont impliquées dans un processus pathologique chez l'Homme On retrouve principalement *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* et *C. krusei* et dans une moindre mesure *C. lusitaniae*, *C. pulcherrima* et *C. dubliniensis* (Youcef-Ali, 2014).

La classification de ce genre

Règne : Fungi.

Division : Ascomycota.

Classe : Saccharomycètes.

Ordre : Saccharomycetales.

Famille : Saccharomycetaceae.

Genre : *Candida*.

Espèce : *Candida albicans* (Youcef-Ali, 2014).

### **II.1.2. Morphologie**

*Candida albicans* est une levure ovale à paroi mince, non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Il se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements

multilatéraux d'une cellule mère (le blastopore), formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15  $\mu\text{m}$ , et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver in vitro et in vivo et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* :

- La forme blastopore : ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4  $\mu\text{m}$  avec parfois un bourgeon de formation ;

- La forme pseudomycélium : mesurant de 500 à 600  $\mu\text{m}$  de longueur et de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants.

- La forme mycélium vrai : champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (Youcef-Ali, 2014).

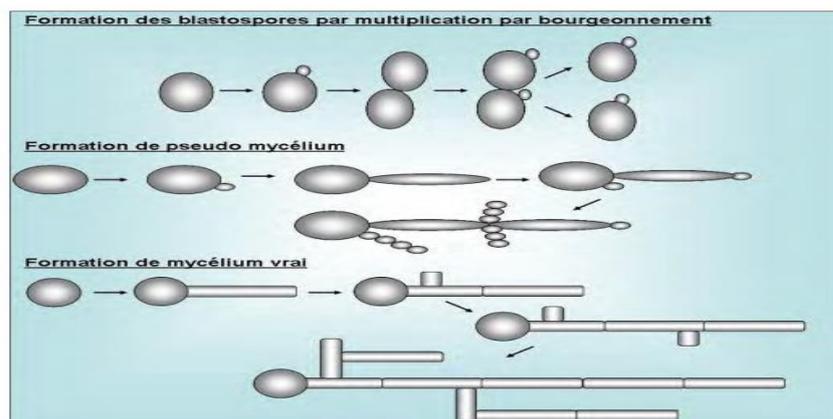


Figure 1 : Morphologie de *Candida albicans* (Youcef-Ali, 2014).

*Candida albicans* peut aussi former des chlamydospores, qui sont des structures terminales ou latérales arrondies. Elles sont formées par

épaississement du thalle, mesurent deux fois la taille du blastospore et possèdent une paroi plus épaisse.

Les chlamydospores sont la forme de résistance de *Candida albicans* et participent à l'identification du champignon en laboratoire. Elles sont rarement mises en évidence in vivo. Toutes ces transitions morphologiques se mettent en place en réponse à des changements de conditions environnementales, et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différentes niches biologiques (Youcef-Ali, 2014).

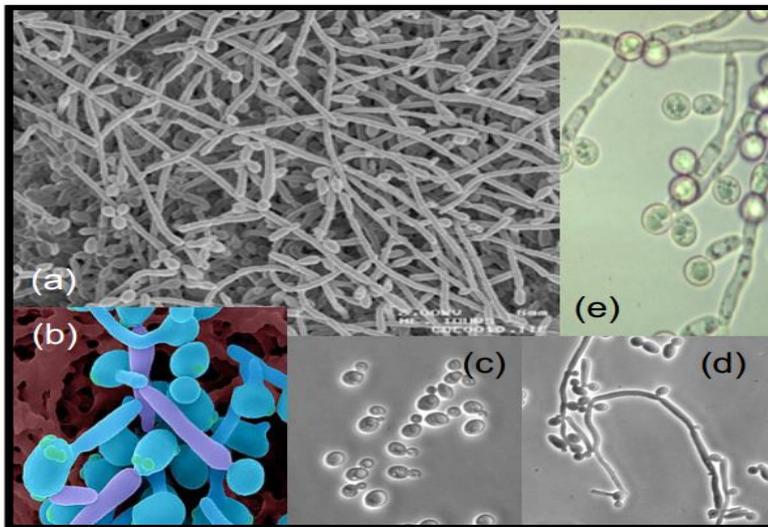


Figure 2 : Les quatre formes de *C. albicans*. *C. albicans* est sous forme levure (c) et peut se retrouver sous forme hyphe (a, d) lorsque les conditions le permettent (pH basique, 37°C, sérum). L'hyphe est généralement précédé par la formation d'un tube germinatif (b) (e) (Cornu., 2010).

## II.2. Organisation cellulaire :

*C. albicans* est un eucaryote avec un noyau, une double membrane nucléaire, des chromosomes, des mitochondries, des inclusions lipidiques. Dans le cytoplasme, tous les organites cellulaires classiques sont présents : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, noyau, vacuoles digestives et une paroi qui entoure la cellule. Seul le contenu protéique et notamment l'activité enzymatique (de type phosphatase, oxydase et peroxydase) varie en fonction du stade morphologique surtout durant la germination (Beucher., 2007).

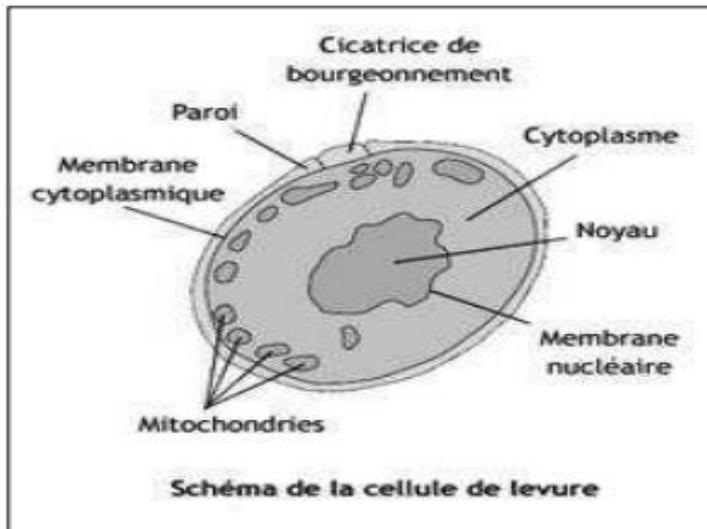


Figure 3 : Organisation cellulaire d'une cellule de levure (Caraës, 2016).

### II.3. Paroi Cellulaire

La paroi cellulaire est indispensable à la survie des levures du genre *Candida* car elle assure leur forme, leur stabilité mécanique, et permet donc de conserver l'intégrité cellulaire. Celle-ci doit être d'une grande plasticité pour pouvoir s'étendre lors des multiplications, et réagir aux diverses agressions extérieures, physiques et chimiques, voire au stress. Elle joue aussi un rôle important lors de l'interaction avec les cellules de l'hôte (Caraës, 2016).

Composition biochimique de la paroi de *Candida* :

Dans la paroi, on retrouve les polysaccharides à hauteur de 80 à 90 %, comprenant de mannoprotéines (polymères de mannoses liés à des protéines par des liaisons covalentes), de  $\beta$ -glucanes (polymères de glucoses) et de chitine (polymères de N-acétyl-glucosamines) les glycosylphosphatidylinositol (GPI) et les protéines pariétales (Caraës., 2016). Cela représente 15 à 30 % du poids sec de la levure. Ainsi on peut décomposer sa composition comme telle :

- 55 % de glucanes
- 35 % de mannoprotéines ;
- 1 à 7 % de lipides ;
- 1 à 3 % de chitine.

#### **II.4. Composition lipidique de la membrane plasmique :**

La paroi de *C. albicans* ne contient que 1 à 7 % de lipides essentiellement concentrés dans la membrane plasmique. La membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique formant une frontière entre la cellule et son environnement. Elle sert aussi d'ancrage à de nombreuses protéines présentant des fonctions variées (enzymes, transporteurs, récepteurs...). Elle présente des invaginations qui facilitent l'ancrage de la couche interne de la paroi. Les lipides neutres représentent 21,5 % des lipides totaux, avec comme principal composant le triacylglycérol (39,9 %), puis les stérols non estérifiés (28 %) et les stérols estérifiés (8,1 %). Chez les champignons, l'ergostérol remplace le cholestérol. C'est le stérol majoritaire de la membrane plasmique. Les stérols remplissent une grande variété de fonctions comme le maintien de l'intégrité et de la fluidité membranaire (Caraës, 2016).

#### **II.5. L'ergostérol :**

Equivalent au cholestérol dans les cellules animales, l'ergostérol se retrouve uniquement dans la membrane des levures et champignons. Ce stérol joue un rôle au niveau de la fluidité et de la perméabilité de la membrane cellulaire. Son absence totale dans les cellules animales fait de ce stérol une cible pour de nombreux antifongiques. L'ergostérol existe sous deux formes au sein des cellules fongiques. La forme libre est présente au sein de la bicouche lipidique, le plus souvent en plus grande quantité. L'ergostérol sous forme d'ester (qualifié aussi de lié) est, quant à lui, présent dans le cytoplasme.

Des études ont montré que l'estérification de l'ergostérol libre augmente lorsque les levures et champignons se trouvent dans une phase de croissance stationnaire. Le groupement R1 est fonction de l'acide gras qui réagit avec l'ergostérol libre pour donner la forme esterifiée (Dechamps, 2016).

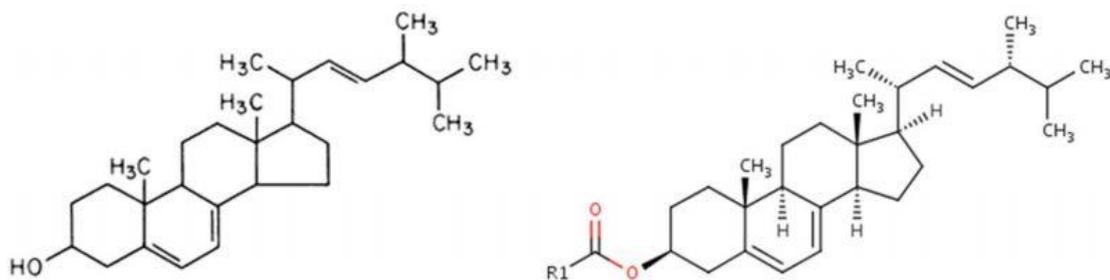


Figure 04: Ergostérol libre (à gauche) et ergostérol estérifié ou lié (à droite)  
(Dechamps, 2016).

## II.6. La voie de biosynthèse de l'ergostérol :

Sa voie de biosynthèse comporte des étapes spécifiques au règne des Fungi, qui sont donc des cibles de choix pour la conception de molécules antifongiques (Vandeputte, 2008).

En effet, six enzymes de cette voie de biosynthèse sont des cibles spécifiques de certains antifongiques. L'HMG coA réductase est inhibée par les statines, et notamment la lovastatine, qui présentent des propriétés antifongiques, mais sont utilisées essentiellement pour le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'homme. La squalène monooxygénase (aussi appelée squalène époxydase) est la cible des allylamines telles que la terbinafine, qui est utilisée pour traiter les infections à dermatophytes. La C14 stérol réductase et la C8 stérol isomérase sont inhibées par le fenpropimorphe, un antifongique de la famille des morpholines principalement utilisées en agriculture. La 14 $\alpha$  stérol déméthylase et la C22 stérol désaturase, les deux seules enzymes à cytochrome P450 de la voie, sont inhibées spécifiquement par les antifongiques azolés (Vandeputte, 2008).

Enfin, le produit final de la voie, l'ergostérol, est la cible des antifongiques polyéniques. La voie de biosynthèse de l'ergostérol est une voie métabolique complexe, étudiée principalement chez l'organisme de référence *S. cerevisiae*. Elle comporte plus de 20 enzymes. La principale singularité de cette voie, qui explique en partie sa complexité, réside dans le fait qu'elle n'est pas une voie métabolique figée, c'est-à-dire qu'une même enzyme peut prendre en charge des substrats différents et ainsi court-circuiter la voie. Ainsi, toutes les enzymes

ne sont pas indispensables et l'inactivation (in vivo ou in vitro) de certains gènes reste viable pour le champignon. Cette singularité est d'ailleurs à l'origine de résistances aux antifongiques polyéniques et azolés, les deux classes moléculaires ayant pour cible l'ergostérol et sa voie de biosynthèse (Vandeputte, 2008).

Ainsi, la délétion systématique des phases ouvertes de lecture du génome de *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence le caractère essentiel des gènes ERG1, ERG7, ERG8, ERG9, ERG10, ERG11, ERG12, ERG19, ERG20, ERG24, ERG25, ERG26 et ERG27. La plupart de ces gènes essentiels codent des enzymes très précoces de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et, chez *S. cerevisiae*, les mutants pour ces gènes sont auxotrophes pour le mévalonate ou l'ergostérol, en fonction de la position du gène dans la voie. La délétion des gènes ERG11 et ERG24 est létale, mais elle peut être compensée par une mutation inactivant le gène ERG3 pour ERG11 ou par une culture en anaérobiose pour ERG24. De même, la délétion du gène ERG25 est viable en présence d'azolés dans un contexte où les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème (HEM2 ou HEM4) sont inactifs (Vandeputte, 2008)

En revanche, la délétion des gènes ERG2, ERG3, ERG4, ERG5 ou ERG6 est viable et se traduit par une absence d'ergostérol, une diminution des capacités de croissance, ou une modification de la sensibilité aux azolés et/ou aux polyènes (Vandeputte, 2008).

### **II.6.1. Régulation**

Le début de la voie de biosynthèse de l'ergostérol est commun à tous les terpénoïdes tels que le dolichol, les protéines sur lesquelles sont branchés des groupements farnésyl, l'hème ou l'ubiquinone. Cette voie est même appelée la voie du mévalonate, dont le produit final, le farnésyl pyrophosphate, est à l'intersection de nombreuses voies métaboliques. Pour cette raison, la machinerie enzymatique responsable de ces premières réactions est extrêmement régulée, notamment par un mécanisme de rétro-contrôle négatif exercé par le farnésyl pyrophosphate sur sa propre biosynthèse. La partie

propre à la synthèse de l'ergostérol commence à partir de la formation dusqualène et le premier intermédiaire stérolique synthétisé est le lanostérol. Le rétrocontôle négatif est également un mécanisme par lequel l'ergostérol est capable de réguler sa propre biosynthèse. Des travaux ont mis en évidence la présence d'une séquence régulatrice au niveau du promoteur des gènes appartenant à la voie de biosynthèse. Cette séquence, appelée SRE pour "Sterol Response Element", est reconnue par un facteur de transcription appelé SREBP pour "Sterol Response Element Binding Protein". SREBP appartient à la famille des facteurs de transcription de la famille bHLH, il est localisé dans le cytoplasme sous une forme complète. Quand le taux d'ergostérol diminue dans la cellule fongique, SREBP est clivé et sa partie active se retrouve dans le noyau où elle active la transcription des gènes contenant une séquence SRE dans leur promoteur (Vandeputte, 2008).

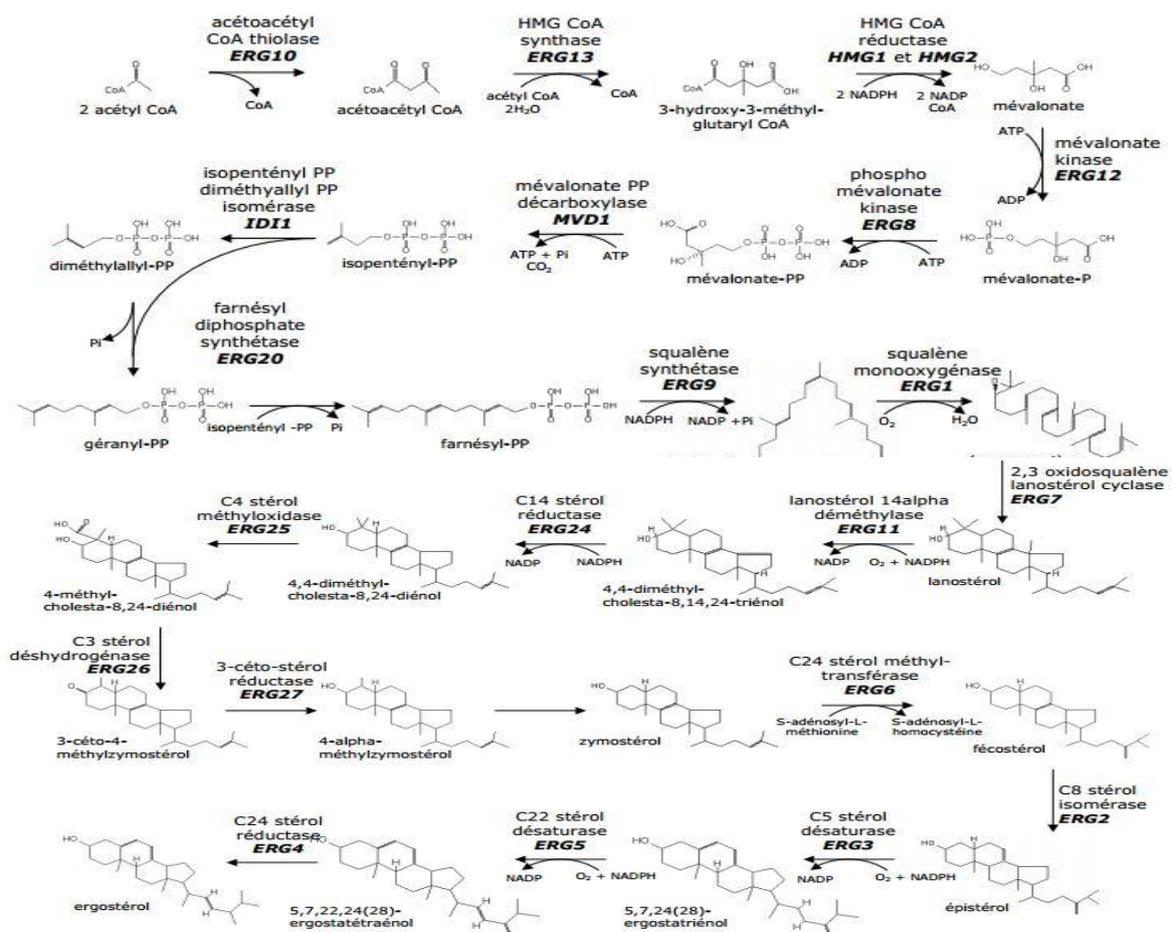


Figure 5 : voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *S.cerevisiae* .Le nom des gènes codant chaque enzyme est indiqué en gras, d'après saccharomyces génome database (Vandeputte, 2008).

**Fonctions de l'ergostérol :**

L'ergostérol, principal composant lipidique des membranes de la cellule fongique avec les sphingolipides, est responsable du maintien des propriétés des membranes cellulaires, tant au niveau de leur fluidité que de leur perméabilité, et ainsi leur permettent d'exercer leur rôle de barrière physique. L'ergostérol joue également un rôle prépondérant dans la composition en protéines des membranes et par conséquent dans une multitude de phénomènes cellulaires dépendants de ces protéines membranaires. En effet, la présence de radeaux lipidiques, qui sont des portions membranaires dont la composition en stérols se distingue du reste de la membrane cellulaire, détermine l'adressage des protéines membranaires. Ainsi, en influençant l'activité des enzymes liées à la membrane, l'ergostérol détermine les capacités de croissance cellulaire ou la progression du cycle cellulaire lui-même (Vandeputte, 2008).

**II.7. Physiologie et Conditions de Croissance**

*C. albicans* est connu pour sa grande adaptabilité, et se retrouve sur différents supports : minimum, synthétique, pauvre ou riche, mais il a besoin de carbone organique, d'azote et de phosphate sources. Il peut se développer dans des conditions allant de 2 à 8 sur l'échelle du pH et entre 20 et 40°C avec une température optimale à 37°C. Enfin, cette levure est une prototrophe de la biotine semblable aux mammifères, la concentration de CO<sub>2</sub> à l'intérieur de cet organisme est près de 140 fois (5 %) supérieur à celui de l'air atmosphérique (0,036 %), et au cours de son cycle de vie, *C. albicans* peut être exposés à des concentrations de CO<sub>2</sub> radicalement différentes. Pendant infections cutanées superficielles, *C. albicans* doit être adapté à un taux de CO<sub>2</sub> inférieur à lorsqu'il infecte les tissus profonds, car la peau est en équilibre avec l'atmosphère, Cet organisme est un anaérobie facultatif et il est au moins 4 fois plus résistant aux antifongiques traitements lorsqu'il est dans des conditions anaérobies plutôt qu'aérobies (David, 2016).

La reproduction de *C. albicans* :

*C. albicans* a été considéré pendant très longtemps comme un champignon diploïde asexué. Mais depuis la découverte du Mating Type Locus (MTL) et des conditions nécessaires à la reproduction de *C. albicans*, a été établi un cycle parasexuel (reproduction et réduction du génome mais sans méiose) comme possible modèle de reproduction sexuée de *C. albicans*. En analysant le génome de *C. albicans*, une région similaire au MTL de *S. cerevisiae* a été identifiée montrant ainsi que *C. albicans* porte les deux allèles du MTL et que c'est un diploïde  $a/\alpha$  (Bertrand, 2007).

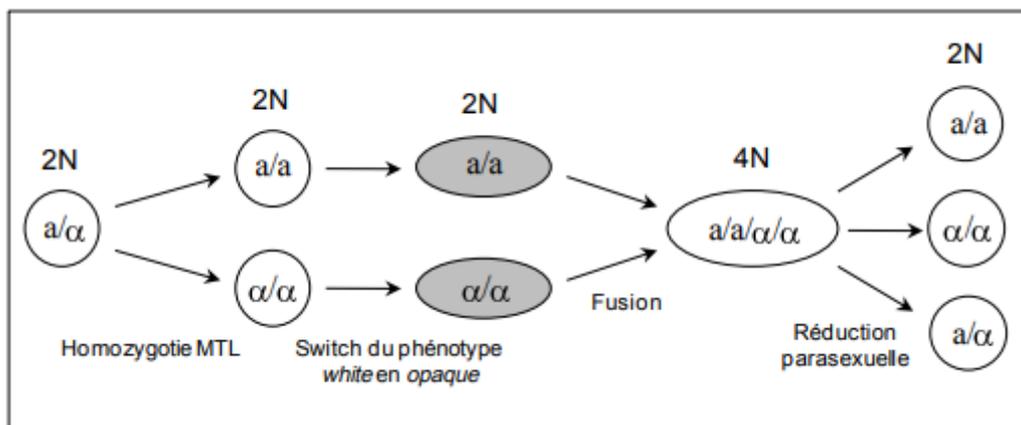


Figure 6 : Reproduction sexuée chez *C. albicans* impliquant obligatoirement deux étapes, l'homozygotie du locus MTL et le switch des cellules white en opaque. D'après Heitman (Bertrand, 2007)

### II.8. Épidémiologie :

Les candidoses existent dans toutes les régions du Monde puisqu'elles sont en grande parties dues à la multiplication de levures appartenant à la flore saprophyte de l'individu, mais d'importantes variations subsistent selon les autres espèces et les régions. Dans la région de Saida (Algérie) ; au niveau de laboratoire d'hygiène ; on a trouvé que il y a environ 70 personnes qui souffrent des candidoses (vaginal ; buccal) en 2021; dont 90% sont des femmes de différentes catégories : les femmes non mariées ; les femmes ont fait une fausse couche ; et les dames. Les infections atteignent un sommet en saison chaude (Mai ; juin ; juillet ; août). Les candidoses existent dans toutes les régions du Monde puisqu'elles sont en grande parties dues à la multiplication de levures appartenant à la flore

saprophyte de l'individu, mais d'importantes variations subsistent selon les autres espèces et les régions. Puis, selon les facteurs favorisants, les levures se mettent à coloniser voire même disséminer vers d'autres tissus (Caraës, 2016).

Cependant les candidoses ne se retrouvent pas en même proportion dans la population, ainsi *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée. *C. glabrata* se situe en deuxième position surtout en Amérique du Nord et en Europe du Nord alors qu'en Amérique du Sud et en Europe du Sud c'est *C. parapsilosis* qui est retrouvé en première position devant *C. albicans* (Caraës, 2016).

L'utilisation accrue des antifongiques à large spectre, le recours à des procédures invasives à but diagnostique et thérapeutique, sont à l'origine d'une évolution du profil de la population des patients, et ont provoqué d'importantes modifications épidémiologiques des agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales, surtout d'origine fongique. L'incidence des candidémies est de 5 à 10 cas pour 10 000 hospitalisations en 1990 et n'a cessé d'augmenter depuis. C'est le 4ème agent pathogène le plus isolé des hémocultures représentant 10 à 15 % de toutes les infections sanguines nosocomiales dans les hôpitaux américains participant au NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance). En Europe, l'incidence varie entre 0,3 et 2 cas pour 1000 hospitalisations selon les pays (Caraës, 2016).

## **Chapitre II**

### **II.9. Médicaments Les médicaments antifongiques et leurs modes d'action :**

Avant le début des années 1990, seulement trois médicaments antifongiques étaient approuvés pour administration par voie intraveineuse ou orale en cas de mycose systémique, soit l'amphotéricine B, la flucytosine et le kétoconazole. Depuis, l'arsenal pharmacologique permettant de contrer les candidoses s'est multiplié, quoique ces médicaments ciblent toujours un nombre restreint de processus et structures cellulaires. En effet, les mycètes sont des organismes eucaryotes, biologiquement très proche des cellules de

mammifères, ce qui rend difficile le développement d'agents antifongiques qui présentent une faible toxicité pour l'humain et les animaux. (Gauthier, 2007).

### **II.9.1. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ergostérol**

Cette catégorie regroupe quatre classes de composés: les allylamines, les thiocarbamates, les azoles et les morpholines. Ces médicaments inhibent la synthèse de l'ergostérol à différentes étapes lors de sa biosynthèse. L'ergostérol est très proche chimiquement du cholestérol des animaux. L'ergostérol est une composante lipidique essentielle des levures puisque cette molécule est responsable entre autres de l'intégrité et de la fluidité de la membrane plasmique, en plus d'assurer le bon fonctionnement de certaines enzymes membranaires (Gauthier, 2007).

Actuellement, il n'existe que deux agents antifongiques de type allylamine, soit le nafiifine et le terbinafine. Le butcnafine est plutôt un benzylamine. Le tolnaftate est le seul représentant de la classe des thiocarbamates. Ces quatre médicaments sont des inhibiteurs de l'enzyme squalène époxidase (produit du gène ERG) qui agit en amont dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Cette enzyme est essentielle chez les levures et champignons. Son inhibition provoque un arrêt de croissance, de reproduction et entraîne la mort du mycète (Gauthier, 2007).

Les azoles constituent la plus importante classe de médicaments antifongiques, comprenant une douzaine de composés différents. On distingue en fait deux types de médicaments azolés, selon leur structure chimique. Il y a d'abord les imidazoles, dont font partie le kétoconazole (KTC), le clotrimazole, l'econazole, le miconazole, l'oxiconazole et le tioconazole. Les triazoles ont été découverts par la suite. Ceux-ci comprennent le fluconazole (FLC), l'itraconazole (ITC), le terconazole et le voriconazole. Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un groupement pentacyclique contenant deux (imidazoles) ou trois (triazoles) atomes d'azote, ainsi qu'un groupement benzène auquel sont greffés deux atomes de chlore ou de fluor. Toutes ces molécules inhibent l'enzyme lanostérol 14C-déméthylase, encodée par le gène ERG] (aussi désignée CYP5]).

Cette enzyme fait partie de la classe des cytochromes P450 et contient donc une protoporphyrine de fer. L'inhibition de cet enzyme par les antifongiques azolés est basée sur la liaison entre un atome d'azote de l'anneau azolé et l'atome de fer contenu dans la partie hème de l'enzyme Erg1p (Gauthier, 2007).

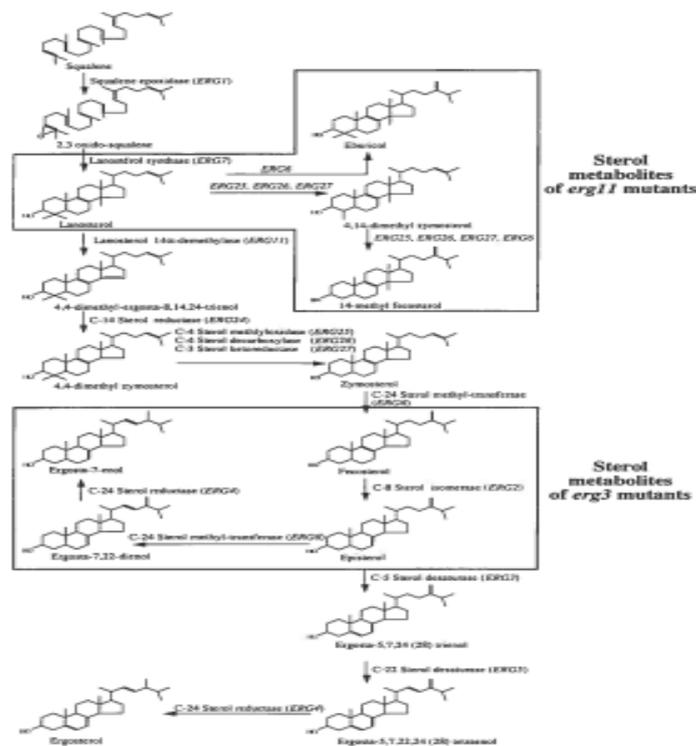


Figure 7: voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *Candida albicans* (Gauthier, 2007).

L'enzyme humaine équivalente à Erg1p est aussi très importante dans la synthèse du cholestérol. Lorsqu'un médicament azolé est administré, son efficacité antifongique est attribuable à sa plus grande affinité pour l'enzyme fongique que pour l'enzyme humaine. Une levure exposée à un traitement aux azoles subira donc une déplétion d'ergostérol accompagnée d'une accumulation de métabolites toxiques, soit les stérols méthylés en position C-14. Une déplétion importante en ergostérol n'est pas seulement dommageable pour l'intégrité et la fluidité de la membrane plasmique, mais aussi pour son rôle dans l'initiation de la prolifération et la croissance cellulaire (Gauthier, 2007)

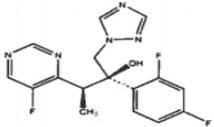
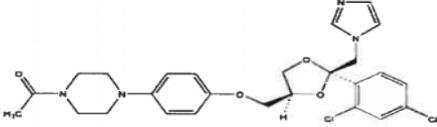
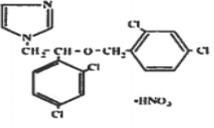
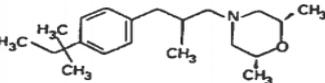
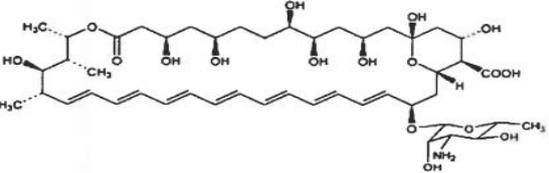
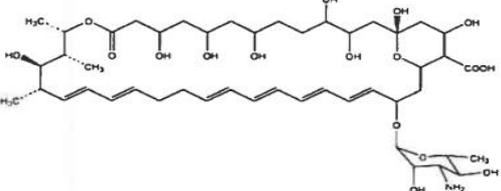
Voriconazole (Vfend)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques
Kétoconazole (Nizoral)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Miconazole (Monistat)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses superficielles
Amorolfine (Loceryl)		Synthèse de l'ergostérol (Erg24p et Erg2p)	Mycoses superficielles
Amphotéricine B (Fungizone)		Membrane plasmique (lie l'ergostérol)	Mycoses systémiques
Nystatin (Nyotran)		Membrane plasmique (lie l'ergostérol)	Mycoses systémiques et superficielles

Tableau 01 : médicaments antifongiques (Gauthier, 2007)

Le développement des imidazoles avait pour objectif d'augmenter la spécificité de ce type de médicament pour cette lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase fongique. Cependant, à l'exception du KTC, l'utilisation des imidazoles est limitée aux mycoses superficielles. En fait, le KTC est maintenant presque exclusivement prescrit pour les cas de mycoses cutanées, à cause notamment de sa toxicité et du caractère erratique de sa biodisponibilité qui est fortement affectée par l'acidité gastrique. Le FLC et l'ITC sont moins toxiques et généralement plus efficaces que le kétoconazole. La toxicité des azoles est tout de même relativement faible comparativement aux autres classes d'antifongiques. L'ITC, pour sa part, est fortement lipophile. Il se concentre donc dans les tissus lipidiques rendant difficile sa distribution vers les organes atteints lors de mycoses profondes. Enfin, l'amorolfine, un dérivé de la morpholine, représente

le dernier type d'agent antifongique qui inhibe la production d'ergostérol. Ce composé bloque deux enzymes situées en aval dans la voie de synthèse de l'ergostérol, soit Erg24p, une 14 stérol réductase, et Erg2p, une - zS.' isomérase. L'amorolfine possède une activité fongicide face aux Dermatiophytes. Il est donc principalement prescrit dans les cas d'onychomycoses en formule topique. L'amorolfine peut également servir à contrer le *C. albicans* (mais pas le *C. glabrata*), et faire partie d'un régime combiné avec d'autres agents antifongiques, tels les azoles, le terbinafine et le griseofulvin (Gauthier, 2007).

### **II.9.2. Médicaments qui perturbent la membrane plasmique**

On retrouve dans le groupe des polyènes l'amphotéricine B (AmB) et le nystatin. Ces molécules amphiphiles cycliques sont composées d'une chaîne polyhydroxyle hydrophile d'un côté et d'une chaîne d'hydrocarbure hydrophobe de l'autre côté. Leur activité repose sur une liaison directe avec l'ergostérol, causant la formation de pores traversant la membrane plasmique, ce qui perméabilise la levure, entraîne la perte des constituants cytoplasmiques et ultimement la mort cellulaire. Les polyènes sont donc des agents fongicides à large spectre d'activité. L'AmB en formule déoxycholate est utilisée depuis les années 60 pour traiter les candidoses systémiques et les candidémies. Malheureusement, les polyènes ne possèdent pas une spécificité très stricte pour l'ergostérol, ce qui cause chez les mammifères une importante toxicité au niveau des reins. Les effets secondaires imputables à l'AmB déoxycholate se manifestent chez 70% à 90% des patients. L'usage de l'amphotéricine B déoxycholate est maintenant limité à des mycoses systémiques graves. Afin de réduire le niveau de toxicité de l'amphotéricine B et pour palier à sa grande hydrophobicité, trois nouvelles formulations ont été développées récemment, soit la dispersion colloïdale, le complexe lipidique et la formule liposomale. Bien que ces nouvelles formules réduisent significativement la néphrotoxicité de l'AmB, leurs coûts d'achat sont importants (10 à 100 fois celui de l'AmB déoxycholate) et doivent être pris en considération (Gauthier, 2007).

Le nystatin est un dérivé de l'AmB. Le mécanisme d'action du nystatin est similaire à l'AmB, mais sa toxicité est moins importante, particulièrement dans sa

nouvelle formule liposomale administrée par voie intraveineuse. Le nystatin montre une bonne activité contre toutes les espèces de *Candida* spp., mais demeure toutefois un agent moins puissant que l'AmB. La formule orale du nystatin est particulièrement intéressante comme alternative à l'AmB chez les patients qui sont sujets à des complications liés à la toxicité de l'AmB (Gauthier, 2007)

### **II.9.3. Médicaments qui affectent la synthèse du glucane :**

Les échinocandines ont été développées récemment. Cette classe comprend la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine. Ces médicaments sont composés d'un noyau cyclique hexapeptidique avec une chaîne latérale lipidique. Ils ciblent la synthèse du 1,3-β-D-glucane, un constituant important de la paroi cellulaire d'une grande variété de mycètes. Une diminution importante de la quantité de glucane cause une instabilité osmotique menant à la mort du mycète. Il n'y a pas de système enzymatique permettant la synthèse du glucane chez les mammifères, d'où l'intérêt pour cette cible cellulaire. Les échinocandines ont une activité fongicide envers un large éventail d'espèces de champignons et de moisissures, incluant *Candida* spp., *Aspergillus* spp. et *Pneumocystis carinii* (Gauthier, 2007).

### **II.9.4. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ADN et l'ARN :**

Cette catégorie ne contient qu'un seul représentant: la flucytosine (5-fluorocytosine; Cette pyrimidine fluorée fonctionne comme inhibiteur métabolique chez plusieurs levures comme les *Candida* spp. et *C. neoformans*. La flucytosine entre dans la levure grâce à une perméase de cytosine. La 5-fluorocytosine est d'abord convertie en 5-fluorouracile par la cytosine déaminase, ensuite modifié par l'uracile phosphoribosyle transférase pour être enfin incorporé dans l'ARN, entraînant un arrêt de la synthèse protéique. La 5-fluorouracile est également converti en 5-fluorodeoxyuridine monophosphate qui est un puissant inhibiteur de la thymidylate synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN et de la division cellulaire. Cependant, plusieurs mycètes filamenteux ne possèdent pas les enzymes ciblées par la flucytosine. De

plus, l'apparition fréquente de résistance à ce médicament limite considérablement son utilisation en monothérapie. La flucytosine est donc principalement administrée en combinaison avec d'autres agents antifongiques (Gauthier, 2007).

#### **II.9.5. Autres médicaments antifongiques :**

La griséofulvine a été le premier médicament antifongique isolé (1939) et accepté pour usage clinique (1958). Ce composé insoluble dans l'eau peut être administré oralement sous forme microcristalline. Les détails de son mécanisme d'action restent à être élucidés, quoique qu'il s'agisse fort probablement d'une interférence dans l'assemblage des microtubules, causant ainsi une incapacité du mycète à effectuer la mitose. Le spectre d'activité de la griséofulvine est limité aux Dermatophytes. Des médicaments moins toxiques et plus efficaces, tels l'ITC et le terbinafine, ont supplanté l'usage de la griséofulvine (Gauthier, 2007).

#### **II.9.6. Les échecs des thérapies antifongiques**

Les traitements antifongiques, qu'ils soient de nature physique (ex : retrait du cathéter infecté) ou pharmacologique, ne sont pas toujours couronnés de succès. Une multitude de facteurs entrent en ligne de compte pour expliquer l'échec clinique d'un traitement antifongique. Ces facteurs peuvent émaner non seulement du ou des mycètes causant l'infection, mais aussi du patient et de son état de santé ou du traitement médical en tant que tel, qui peut être inadéquat, insuffisant ou mal administré. Dans les prochaines sections (Gauthier, 2007).

#### **II.10. Résistance aux agents antifongiques chez *C. albicans* :**

La résistance des *Candida* spp. aux antifongiques constitue un sujet d'importance, celle-ci conduisant à réduire voire anéantir, l'effet des antifongiques pouvant conduire in fine à l'échec thérapeutique. Cependant, il faut rappeler que la résistance in vitro, aussi appelée résistance « microbiologique », ne constitue pas la seule cause d'échec thérapeutique. Il s'agit en effet d'un processus complexe faisant intervenir de nombreux autres paramètres tels que l'accessibilité de l'antifongique au site de l'infection, la

charge fongique, la présence d'un biofilm, l'existence d'une malabsorption ou d'une mauvaise observance, d'éventuelles interactions médicamenteuses ou bien encore le statut immunitaire de l'hôte. La résistance microbiologique des *Candida* aux antifongiques peut revêtir deux aspects : la résistance intrinsèque (dite primaire ou naturelle), caractéristique de certaines espèces comme *C. krusei* vis-à-vis du fluconazole et la résistance acquise (dite secondaire). Cette dernière, résulte d'une exposition souvent prolongée à un antifongique et relève donc d'un processus de sélection génétique. Cette résistance acquise étant le plus souvent le résultat de modifications génétiques constitutionnelles, elle persiste généralement à l'arrêt de l'antifongique. Selon le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) ou cellulaire(s) mis en jeu, elle peut affecter une ou plusieurs molécules de la même classe d'antifongique (Morio et Le Pape, 2014).

#### **II.11. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice :**

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antifongique nécessaire pour inhiber la croissance d'une levure. En fonction de la valeur brute de la CMI obtenue, l'isolat sera classé comme sensible, résistant ou intermédiaire. Ces valeurs brutes pouvant être influencées par le pH, l'inoculum, le milieu de culture, la durée d'incubation et la température. Pour déterminer la CMI d'un antifongique, il existe plusieurs techniques. La méthode classique se fait par dilution en milieu liquide. Les méthodes de référence sont celles établies par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) aux Etats-Unis et l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe. Ces deux méthodes sont relativement similaires dans leur réalisation puisqu'elles reposent sur la microdilution en milieu liquide consistant à mettre en présence une suspension de levure calibrée avec des concentrations croissantes de l'antifongique à tester, mettant en regard à une cupule témoin d'un antifongique. Cependant, la teneur du glucose dans le milieu est de 0,2 % pour le CLSI mais de 2 % pour l'EUCAST. La température d'incubation se situe entre 35 et 37°C sans agitation, mais l'inoculum de suspension est 1000 fois plus important pour l'EUCAST que pour le CLSI. A ces différences s'ajoute une méthode de lecture qui est visuelle pour le CLSI et spectrophotométrique pour

l'EUCAST. Malgré ces différences, ces deux méthodes donnent des résultats cohérents et corrélés entre eux (Sanguinetti et al., 2018).

### Chapitre III

La terrible augmentation de la résistance des microbes aux médicaments chimiques, la difficulté de produire de nouveaux médicaments qui limitent leur gravité et leur coût, la difficulté de les obtenir parfois parce qu'ils sont rares, et aussi les intoxications causées par leur utilisation, toutes ces raisons ont incité l'homme à penser à des solutions naturelles alternatives et disponibles pour remplacer les médicaments chimiques par des autres biologiques, c'est la phytothérapie ; par l'extraction des substances bioactives des plantes médicinales pour la fabrication de nouveaux médicaments mieux que les médicaments fabriqués chimiquement avec un minimum de dommages. Et plus important encore, il ne cause pas de danger pour le consommateur.

Selon la Pharmacopée européenne, les plantes médicinales sont "des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces drogues végétales sont des parties de plantes fraîches ou desséchées (racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, graines, etc.) entières ou fragmentées. Ces dernières sont des usines chimiques naturelles, produisant des substances actives biochimiques : alcaloïdes, huiles essentielles, flavones, tanins, et les mettent à la disposition de l'homme qui, peut en faire usage pour sa santé et satisfaire ses besoins vitaux (apport des plantes médicinales).

Vue que on recherche des compositions bioactives contre les maladies de candidoses et des inhibiteurs actifs contre *Candida albicans* plus précisément. Nous sommes intéressés par deux genres de plantes qui constituent une source importante de molécules bioactives sont : *Cinnamomum cassia* et *Ammodaucus leucorochus*.

#### II.12. Généralité sur les huiles essentielles

Dans la 8<sup>ème</sup> édition de la Pharmacopée française (1965), les huiles essentielles également nommées « essences » ou « huiles volatiles » sont : « des

produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : par distillation dans la vapeur d'eau de plantes à essence ou de certains de leurs organes, et par expression ». La pharmacopée précise ensuite que le second procédé est recommandé pour obtenir les essences de fruit du genre *Citrus*. A partir de la 9<sup>ème</sup> édition (1972), la Pharmacopée française n'utilise que le terme « huile essentielle » officiellement abrégé par « HE ». Dans la 10<sup>ème</sup> édition, elles y sont définies comme : « substance fluide, volatile, odorante, de composition complexe, produite par un appareil sécréteur ». Pour la Pharmacopée européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement dans sa composition ». La Pharmacopée précise aussi que la matière première peut être sèche, fraîche, flétrie, entière, contusionnée ou pulvérisée. Comme on le verra par la suite, de nombreux facteurs influencent de manière plus ou moins importante la composition d'une huile essentielle : leur utilisation passe donc par une standardisation indispensable afin d'établir des normes nationales et internationales auxquelles les huiles essentielles commercialisées doivent répondre. Les organismes de normalisation tels que l'AFNOR (Association Française de Normalisation) et l'ISO (International Organisation for Standardisation) définissent les huiles essentielles par leur mode d'obtention. Ainsi la norme française AFNOR NT 75-006 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*, soit par distillation sèche » (Laguerre, 2015).

### **II.13. Présentation de l'espèce étudiée « *Cinnamomum cassia* »**

#### **II.13.1. Généralité sur les canneliers :**

Le cannelier est un arbre de la famille des Lauracées qui pousse dans des régions tropicales. Le nom de genre du cannelier est *Cinnamomum*. Il existe de nombreuses espèces en fonction de leur provenance : cependant la véritable cannelle est la cannelle de Ceylan ou *Cinnamomum zeylanicum* Blume ou *C. verum* Nees produite au Sri Lanka, que l'on trouve sous le nom de Kurundu. La casse ou cannelle de Chine, *Cinnamomum cassia* Nees ou *C. aromaticum* Nees est une espèce voisine qui possède pratiquement les mêmes propriétés thérapeutiques et qui fournit une cannelle de qualité inférieure. Actuellement *C. zeylanicum* est attribuée à BLUME bien que selon les ouvrages on la trouve attribuée à NEES (Edet, 2004).

#### **II.14. Présentation de la plante :**

*Cinnamomum cassia* (également connu sous le nom de *Cinnamomum aromaticum*, cannelle de Chine ou cassia de Chine) appartient à la famille Laurel (Lauraceae) du règne végétal. C'est récolté à partir de l'écorce de son arbre et est utilisé comme agent aromatisant dans diverses cuisines asiatiques. Les pays cultivant cette plante sont l'Inde, la Chine, l'Ouganda, le Vietnam, Bengladesh et Pakistan. L'herbe est intensément aromatique et a un goût sucré avec une pointe d'amertume. L'herbe est également utilisé dans différentes formes de médecine traditionnelle. Récemment, diverses études ont rapporté l'utilisation médicinale de cette herbe dans différentes conditions pathologiques telles que le diabète sucré, les ulcères peptiques et divers cancers (zaidi et al., 2015).



Figure 8 : *Cinnamomum cassia* (Al-Samydai et al., 2015).

Concernant la taxonomie des canneliers :

- Embranchement : Spermaphytes.
- Sous embranchement : Angiospermes.
- Classe : Dicotylédones.
- Sous classe : Magnolidées.
- Ordre : Laurales ou magoliales
- Famille: Lauracées.
- Genre : *Cinnamomum* (Edet, 2004).

#### **II.15. Critères organoleptiques de *C. cassia* :**

L'écorce est de couleur plus foncée, l'odeur est moins fine et la saveur aromatique est de ce fait moins recherchée. On la retrouve parfois en falsification de la cannelle de Ceylan. Au microscope, les fibres apparaissent plus larges et plus courtes, il y a plus de cellules subéreuses et l'amidon est plus abondant (Edet, 2004).

##### **II.15.1. Constituants actifs :**

Les principaux constituants actifs de *C. cassia* sont le cinnamaldéhyde (75-90%), coumarine (7%) et huile essentielle (4%) (Ng et Wu, 2011). Les autres constituants présents à l'état de traces comprennent l'eugénol, l'acide benzoïque, l'acide cinnamique, l'acide salicylique l'acide, l'alcool cinnamylique et

les esters correspondants et aldéhydes. La moyenne journalière (ADI) de cinnamaldéhyde autorisée par Food and Drug Administration et Organisation mondiale de la santé (FDA/OMS) pour un homme adulte est de 1,25 mg/kg (Zaidi et al., 2015).

### **II.15.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *C. cassia* :**

Les composés principaux de l'huile de *C. cassia* sont :

- L'aldéhyde trans-cinnamique : entre 70% et 90%
- L'acétate de cinnamyle: entre 0% et 6%
- L'eugénol: inférieur à 0.5%
- La coumarine: entre 1.5% et 4.0%
- Le trans-2méthoxycinnamaldéhyde: entre 3.0% et 15% (Edet, 2004).

### **II.15.3. Les Propriétés et l'effet thérapeutique de *C.cassia* :**

Il a été rapporté que les produits chimiques actifs de *C. cassia* ont des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anticancéreuses, antifongiques, antipyrétiques, antimicrobiennes, anti-angiogéniques et activité larvicide. Des activités anti-hépatome de *C. cassia* sont également rapportées et le mécanisme proposé peut inclure l'induction de facteurs de signalisation au sein des cellules hépatiques. Il existe des utilisations médicales de la cannelle depuis la nuit des temps et c'est une des plantes majeures de la médecine traditionnelle chinoise. Ces utilisations ont donné aux chercheurs, l'envie de mettre en évidence les propriétés biologiques de la cannelle (Edet, 2004).

Des études ont également examiné si *C. cassia* améliore index glycémique, résistance à l'insuline et tolérance au glucose chez les diabétiques. Bien que diverses études aient appuyé l'allégation anti-diabétique en montrant diverses molécules mécanismes, seuls quelques-uns ont utilisé essais cliniques à l'appui de cette affirmation (Zaidi et al., 2015). L'acide cinnamique, un constituant de *C. cassia* pourrait agir comme un agent dépigmentant par son effet sur la synthèse de mélanine. *C. cassia* et huile de cannelle a une puissante activité nématocide contre *Bursaphelenchus xylophilus*. Guizhi-Fuling-Gélules (GZFLC), une

formulation chinoise traditionnelle contenant *C.cassia*, s'est avéré protecteur contre l'ischémie cérébrale dommages .Aussi, les effets synergiques de *C. cassia* avec plusieurs autres herbes ont été suggéré pour un mélange polyherbal comme antioxydant puissant (Zaidi et al., 2015).

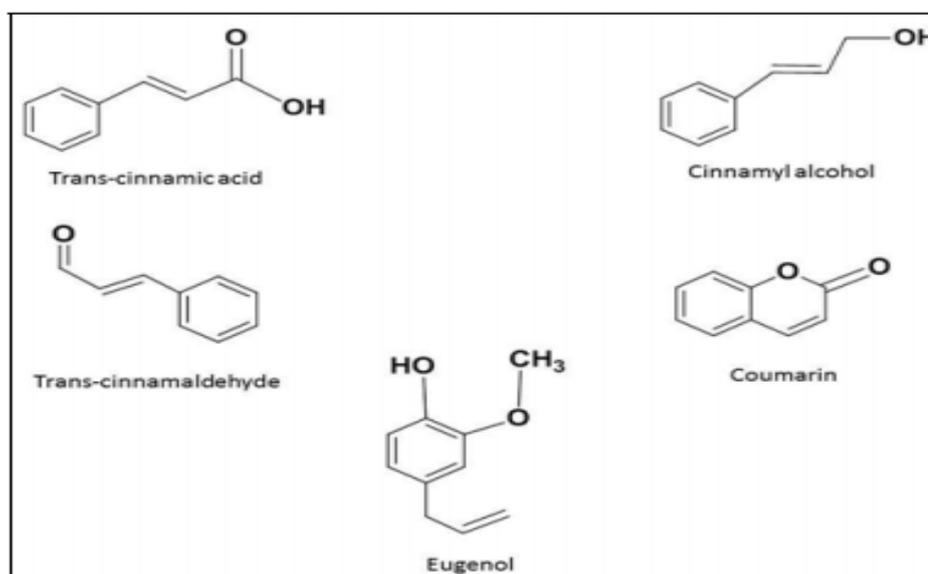


Figure 9 :Structures chimiques de divers constituants de *Cinnamomum cassia* (Zaidi et al., 2015).

#### II.15.4. Mécanisme d'action :

##### II.15.4.1. Antifongique :

La cannelle a démontré une activité antifongique contre quatre espèces de *Candida* ; *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* et *Candida krusei* (CMI : 100 microg/ml à 450 microg/ml), quatre isolats de moisissures; trois *Aspergillus spp.* et une *Fusarium sp.* (CMI : 75 microg/ml à 150 microg/ml) et trois isolats de dermatophytes ; *Microsporum gypse*, *Trichophyton rubrum* et *T. mentagraphytes* (CMI : 18,8 microg/ml à 37,5 microg/ml). Le MIC a été déclaré après en utilisant la méthode de dilution en gélose. Une autre étude a utilisé des modèles de souris et un test in vitro pour montrer le activité anti-proliférative de *C. cassia* sur les candidoses buccales (*C. albicans*) avec le cinnamaldéhyde comme principal composé produisant l'effet (Zaidi et al., 2015).

Antibactérien

Il a été démontré que *C. cassia* possède des propriétés antimicrobiennes propriétés contre divers agents pathogènes. Extrait éthanolique de *C. cassia* a montré une forte activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. La méthode de diffusion du disque a été utilisée pour démontrer cet effet. La méthode de dilution sur gélose a été utilisée pour révéler que le cinnamaldéhyde et ses extraits d'huile sont efficaces contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Salmonella typhimurium*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) du cinnamaldéhyde était de 75 microg/ml à 600 microg/ml (Zaidi et al., 2015).

#### **II.15.4.2. Anti-oxydant :**

L'extrait d'éthanol de *C. cassia* a un effet antioxydant important propriétés. Le mécanisme sous-jacent comprend probablement l'inhibition de la production de NO, un puissant radical libre, via l'inhibition de NF- $\kappa$ B par le cinnamaldéhyde. Aucune activité n'a été dosée in vitro à l'aide du réactif de Griess, Western blot et électrophorèse sur gel. La cannelle est utilisée avec plusieurs herbes pour formuler une préparation de tisane pour réduire l'oxyde nitrique et l'oxygène radicaux libres dérivés prévenant les maladies cardiovasculaires, cancers, arthrite, etc. Les auteurs ont utilisé les radicaux libres DPPH activité de récupération, AUCUNE activité de récupération et activité de piégeage des radicaux superoxydes (Zaidi et al., 2015).

#### **II.16. La plante *Ammodaucus leucotrichus***

Les plantes médicinales et comestibles jouent un rôle crucial dans la prévention et/ou le traitement de différentes maladies humaines depuis la préhistoire et l'antiquité jusqu'à aujourd'hui. L'utilisation de plantes pour leurs propriétés médicinales est une pratique très ancienne, elle trouve ses origines dans les plus anciennes civilisations et a été bien préservée au cours des siècles dans le monde entier .Au cours des deux dernières décennies, beaucoup d'attention a été accordée aux plantes en tant que nouveaux agents

thérapeutiques alternatifs en raison de leurs composés naturels bioactifs tels que les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tanins, etc (Landoulsi et al., 2018).

### II.17. Présentation de la plante :

*Ammodaucus leucotrichus*, connu en Algérie sous le nom de « Moudrayga ou El massoufa » (Idm'hand et al., 2020). Appartenant à la famille des Apiacées, est l'un des grands diversité végétale du désert du Sahara (Naima et al., 2019). Elle est une plante médicinale vendue aux herboristes sur les marchés locaux, en particulier dans le Sahara algérien méridional. Les nomades collectent les graines et feuilles pour leur propre usage, généralement dans printemps, lorsque les fruits sont mûrs (Idm'hand et al., 2020). Dans le sud Sahara algérien, les feuilles de cette plante sont utilisées comme aromatisants à base de plantes dans les thés et les fruits sont souvent utilisés comme épice lors de la préparation culinaire. La littérature disponible sur *Ammodaucus leucotrichus* a montré qu'il s'agit d'une importante plante médicinale utilisée dans une large gamme de traitements ethnomédicaux, notamment pour la diarrhée, la toux, les maladies pulmonaires (Idm'hand et al., 2020).

Nom français : Cumin velu, Cumin du Sahara.

Nom vernaculaire (Algérie) : Kammûn es-sofi, El massoufa (Bechar), Oum draiga, Kamoune l'ibel.

Nom vernaculaire (Targui) : Akâman.

Nom vernaculaire (Maroc) : Kemmoun sofi, Kemmoun bousoufa. Il fleurit généralement au début du printemps (février à avril). La plante est commune dans le Sahara algérien (El-Oued) (KHALDI, 2017).



Figure 10 : *Ammodaucus leucotrichus* (KHALDI, 2017).

**II.17.1. Géographique :**

*A. leucotrichus* habite les sables maritimes des pays sahariens et subsahariens d'Afrique du Nord, Maroc, Algérie et Tunisie, s'étendant à l'Egypte et à l'Afrique tropicale. Dans Le Maroc, connu localement sous le nom de « kammûn es-sofi ou akâman » (Manssouri et al., 2020).

**II.17.2. Systématique :**

Classification botanique d'*Ammodaucus leucotrichus* (KHALDI, 2017).

Règne : Plantae.

Sous-règne : Tracheobionta.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Apiales.

Famille : Apiaceae.

Genre : *Ammodaucus*

Espèce : *Ammodaucus leucotrichus*

**II.18. Description botanique d'*Ammodaucus leucotrichus* :**

Une petite plante annuelle, 10-12 cm. élevé, glabre, à tiges dressées, finement striées, rameuse. Les feuilles sont vertes très divisées en lanières fines, un peu charnues; ombelles à 2-4 rayons. Les fleurs sont de petite taille, avec 5 pétales libres, se transforme en un fruit très velus, oblong et comprimés de 8– 9 mm de long pour environ 4 de large. Les cotes latérales sont légèrement ailées, les bandelettes sont grossières. Ils sont surtout densément couverts de longs poils soyeux, plante à très forte odeur d'anis. Environ; Il fleurit habituellement au début du printemps (Février à Avril) . Le cumin velu est une plante endémique de l'Afrique du Nord (principalement Sahara), y compris les îles Canaries. Sa présence est également mentionnée à Nigeria, la Mauritanie et dans la Haute Vallée du Nil. Il se développe particulièrement dans les régions désertiques, souvent au pied d'une colline ou d'une dune (Khaldi, 2017).

### II.19. Propriétés thérapeutiques

Dans la médecine traditionnelle algérienne, *A. leucotrichus* est utilisé pour le traitement du rhume et fièvre, maladies de l'estomac, vomissements, douleurs et allergies. De plus, emménagogue, des propriétés abortives et aphrodisiaques sont attribuées à cette espèce (Naima et al., 2019). Les feuilles de cette plante sont utilisées comme aromatisants à base de plantes dans les thés et les fruits sont souvent utilisés comme épice lors de la préparation culinaire. Les feuilles et les graines sont consommées sous forme de décoction ou d'infusion pour plusieurs cas thérapeutiques, tels que l'hypertension, les douleurs thoraciques, les affections du foie et du système digestif, gastro-entérite, comme aussi pour le diabète. Au Tassili (Algérie), les fruits et les feuilles sont couramment consommés en infusion. La forme poudre est également une épice appréciée pour les denrées alimentaires. Les feuilles consommées pour leurs caractéristiques aromatisantes dans le thé, et les fruits pour leur capacité bioactive principalement dans le traitement des palpitations cardiaques. Les fruits de cette plante sont largement utilisés comme régulateur de sucre pour les diabétiques et pour l'estomac et maladies du côlon. Les graines sont utilisées pour traiter l'estomac maladies, plaies infections, allergies cutanées, génitales douleurs abdominales, pour les piqûres de scorpion, les morsures de serpent, et les maladies du foie. Les feuilles sont utilisées infusées ou utilisées comme poudre pour éviter l'indigestion, pour retrouver l'appétit et pour les affections thoraciques. *Ammodaucus leucotrichus* est également fréquemment utilisé dans le traitement des symptômes allergiques, diarrhée, indigestion, vomissements, spasmes et coliques, vers intestinaux, fièvre, constipation, toux et anorexie. De plus, aphrodisiaque, emménagogue et des propriétés abortives sont attribuées à cette espèce (Idm'hand et al., 2020).

### II.20. Composition chimique

L'huile essentielle d'*A. leucotrichus* contenait (tableau 1) 64,8% de monoterpènes oxygénés et 34,86% de hydrocarbures monoterpènes. Le constituant principal était le périllaldéhyde (64,66 %), suivi du D-limonène (26,99 %) et le pourcentage le plus faible a été attribué à l' $\alpha$ -pinène (5,8%). A de très

faibles concentrations (moins de 1%) d'autres composés ont été identifiés tels que ; $\beta$ -pinène 0,66 %,  $\beta$ -ocimène 0,65 % et camphène 0,4 %. Perillate de méthyle et acétate de bornyle ont été détectés dans une quantité limitée de 0,08 %. Par ailleurs, indiqué que l'huile essentielle marocaine d'*A. leucotrichus* est constituée principalement de perillaldéhyde 88,7% et limonène 8,26%, par rapport à nos résultats cette espèce contenait plus de périllaldéhyde et moins de limonène. De plus, d'autres études ont rapporté qu'*A. leucotrichus* huile essentielle extraite de graines récoltées en Algérie, contenait du perillaldéhyde 59,12% et limonène 23,89 % (Naima et al., 2019).

Une étude réalisée par Abu Zarga et al. (2013), montre que l'analyse chimique de l'huile essentielle hydro-distillée, d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. récolté dans la région Guerrara (Ghardaia), a révélé que cette essence est formée en majorité par les monoterpènes oxygénés (87,32%) avec une prédominance de perilla aldehyde (84.43 %). Alors que l'huile obtenue par la méthode d'extraction SPME (Solid Phase Micro-Extraction) est composée principalement de monoterpènes hydrocarbonés (87,40%) dont le terpinolène est le constituant principal de la fraction (69,21%) (Khaldi, 2017).

Components <sup>a</sup>	RI <sup>a</sup> <sup>b</sup>	RI <sup>p</sup> <sup>c</sup>	Al1	Al2	Al3	Identification mode
$\alpha$ -Pinene	930	1012	0.3	2.0	2.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
$\beta$ -Pinene	973	nd	0.1	tr	tr	RI, MS
Myrcene	980	1161	0.1	0.1	0.1	RI, MS
$\delta$ -3-Carene	1005	1150	0.5	0.4	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<i>p</i> -Cymene	1011	1271	0.1	0.1	0.1	RI, MS
Limonene	1021	1203	8.2	7.4	7.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
Cuminaldehyde	1220	1782	0.1	0.1	0.1	RI, MS
Perillaldehyde	1249	1782	87.0	87.9	87.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
Perillyl alcohol	1270	2010	tr	tr	0.1	RI, MS
Methyl perillate	1369	1866	0.6	0.5	0.5	RI, MS
$\gamma$ -Decalactone	1423	nd	0.1	0.1	0.1	RI, MS
Total (%)			97.1	98.6	98.8	

Tableau 2 : Composition chimique de l'huile de fruit d'*A. leucotrichus*

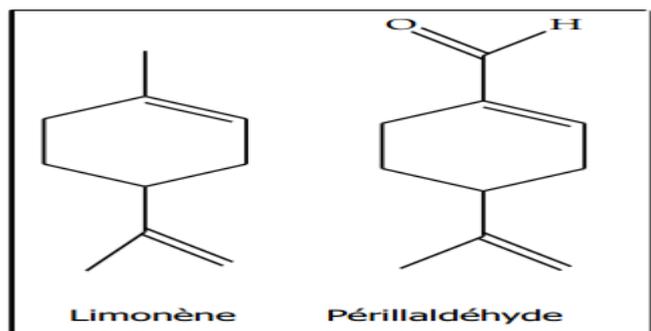


Figure 11 :structures des principaux constituants de d'A. leucotrichus (Manssouri et al., 2020).

### II.21. Phytochimie :

Divers composés bioactifs sont isolés à partir d'extraits aqueux, acétoniques, méthanoliques ou éthanoliques de la plante. Ils sont regroupés en monoterpènes et leurs dérivés, sesquiterpènes et leurs dérivés, tanins, composés anthracéniques, stérols, triterpènes, composés réducteurs, alcaloïdes, acides phénoliques, saponines, flavonoïdes et coumarines. De plus, des rapports sur l'isolement et l'identification des produits chimiques individuels constituants ont révélé la présence de périllaldéhyde et de limonène comme composés majeurs. Le nouveau la guainolide lactone, l'ammolactone et le nouveau monoterpénoïde 3-hydroxyperillaldéhyde, le méthylpérillate, le bornéolangélate et la  $\gamma$ -décalactone ont également été trouvés dans ce espèce .La présence de tels métabolites indique l'importance des extraits de plantes, par exemple les terpènes sont considérés comme des activateurs de pénétration appropriés dans industries pharmaceutiques , les alcaloïdes sont considérés être les principaux ingrédients actifs des médicaments dérivés des plantes , les flavonoïdes sont considérés comme importants en raison de leurs activités antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse, anti-VIH, anticoagulante, immunomodulatrice, antituberculeuse et anti-allergique ,Perillaldehyde, le composé majeur des extraits d'*Ammodaucus leucotrichus*, a le potentiel de conserver la qualité et la sécurité d'aliments et de produits frais. De plus, le périllaldéhyde est largement utilisé dans les arômes, les cosmétiques, la parfumerie et l'industrie pharmaceutique (Idm'hand et al., 2020).

### II.21.1. Activités pharmacologiques :

Des études ont montré que divers extraits d'*Ammodaucus leucotrichus* possèdent une gamme d'actions pharmacologiques, telles que des activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anticholinestérasiques et cytotoxiques soutenant son utilisation traditionnelle (Idm'hand et al., 2020).

### II.21.2. Activités antioxydantes

Louail et al. ont évalué les activités antioxydantes de l'huile essentielle de graines d'*Ammodaucus leucotrichus* en mesurant l'inhibition des hydroperoxydes de diènes conjugués résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. Il est apparu que l'huile essentielle obtenue à partir des graines d'*Ammodaucus leucotrichus* a démontré une activité antioxydante, en inhibant le blanchiment du  $\beta$ -carotène dû au retard/inhibition de l'acide linoléique dérivé de l'hydroperoxyde, qui attaque le chromophore- $\beta$ -carotène. La valeur de l'essentiel l'huile de graines a montré une meilleure activité antioxydante que celle montrée par l'acide ascorbique. Dans une autre expérience, Dahmane et al. ont évalué les activités antioxydantes de huiles essentielles obtenues à partir des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* utilisant du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) test et le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène. Huiles essentielles d'*Ammodaucus leucotrichus* présentait un faible pouvoir antioxydant capacité à réduire les radicaux DPPH. Lorsqu'on le compare à BHT et acide ascorbique, les huiles se sont révélées significativement moins efficaces que ces agents antioxydants ( $p < 0,05$ ). Cependant, les huiles essentielles présentent de manière significative inhibition plus faible contre l'oxydation de l'acide linoléique et faible capacités antioxydantes pour réduire les radicaux DPPH. Sebaa et al. ont évalué les activités antioxydantes des huiles extraits essentiels, aqueux et méthanoliques de fruits de *Ammodaucus leucotrichus* utilisant le pouvoir réducteur méthode et la méthode DPPH. Le résultat de l'activité antioxydante par la réduction ferrique a été détecté dans tous les extraits : faible en extrait aqueux, huiles essentielles et fort dans l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus*. Activité de piégeage des radicaux libres de tous les extraits et références antioxydants

augmentés avec l'augmentation de la concentration. Le dosage de l'activité antioxydante à l'aide du blanchiment DPPH évalue que le méthanol l'extrait a les meilleures performances. Tous les extraits sont gratuits capacité de réduction radicale. Concentrations requises pour neutraliser et stabiliser 50% de la concentration de DPPH va de 2 à 4 µg/ml [5]. Un effet antioxydant potentiel de l'extrait aqueux des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* a été mis en évidence, in vitro, par la méthode du piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (Idm'hand et al., 2020).

### **II.21.3. Activités antidiabétiques**

El-Ouady et al. ont évalué les activités antidiabétiques de l'extrait aqueux de fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* en rats diabétiques induits par la streptozotocine. La glycémie était significativement réduite après 15 jours d'administration orale de l'extrait de plante à la dose de 10 mg/kg. En outre, l'extrait aqueux de fruit d'*Ammodaucus leucotrichus* a pu avoir un effet bénéfique sur la structure histologique de foie et une influence remarquable sur la tolérance au glucose (Idm'hand et al., 2020).

### **II.21.4. Activités anti-inflammatoires**

L'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle extraite des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* a été démontrée à l'aide d'une dose de 100 mg/kg pour évaluer la réponse anti-œdémogène des huiles essentielles dans l'œdème de la patte arrière induit par le carraghénane chez la souris. L'activité inhibitrice des huiles essentielles a été comparée à celle du diclofénac utilisé comme médicament standard dans ce modèle. L'augmentation moyennedans le poids de l'œdème de la patte chez les souris du groupe témoin traité (Groupe I) était de  $31,06 \pm 0,27$  mg. Les groupes II, III, IV et V traités avec des huiles essentielles ont montré une inhibition similaire pourcentages (18,7 %, 21,6, 19,4 et 24,5 %) d'œdème induit par le carraghénane par rapport au groupe témoin. Dans une autre étude, Ziani et al. ont évalué anti-inflammatoire propriété de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de *Ammodaucus leucotrichus* par la détermination de la concentration de nitrite NO produit par les macrophages

murins stimulés par les lipopolysaccharides (LPS) RAW 264.7 lignées cellulaires en milieu de culture, traitées avec différentes concentrations des extraits de plantes. Les extraits de plantes, réduisent efficacement l'expression des anti-inflammatoires les enzymes iNOS dans les macrophages murins activés par le LPS, et cette réduction s'est accompagnée d'une diminution des niveaux d'oxyde nitrique (NO) (Idm'hand et al., 2020).

#### **II.21.5. Activités anticholinestésiques**

L'activité anticholinestésique d'*Ammodaucus leucotrichus* et des principaux composés individuels de l'huile essentielle a été comparée au Donepezil, utilisé comme médicament de référence contre la maladie d'Alzheimer. Huile essentielle et le périllaldéhyde n'ont pas montré d'activité contre l'acétylcholinestérase. En revanche, le limonène induit une activité inhibitrice élevée de l'acétylcholinestérase avec une IC<sub>50</sub> d'environ 51,6 µg/mL. L'huile essentielle s'est avérée efficace par rapport aux résultats d'inhibition du Donepezil. Pour l'activité anti-butrylcholinestérase, tous les échantillons ont une activité inhibitrice élevée et la valeur la plus faible de IC<sub>50</sub> était obtenue avec du périllaldéhyde suivi de limonène et huile essentielle (Idm'hand et al., 2020).

#### **II.21.6. Activités de cytotoxicité**

Ziani et al. ont évalué les activités de cytotoxicité de la décoction aqueuse et des extraits hydroéthanoliques de parties aériennes de *Ammodaucus leucotrichus*. L'activité inhibitrice de croissance de quatre lignées de cellules tumorales humaines : NCI-H460 (cancer du poumon non à petites cellules), HeLa (carcinome du col de l'utérus), HepG2 (carcinome hépatocellulaire) et MCF-7 (sein carcinome), a été déterminée par la sulforhodamine B dosage colorimétrique. L'hépatotoxicité a été déterminée à l'aide d'une culture primaire de cellules hépatiques non tumorales (PLP<sub>2</sub>), qui ont été préparées à partir d'un porc fraîchement récolté foie. Les valeurs IG<sub>50</sub> de l'extrait hydroéthanolique étaient en général inférieures à ceux présentés par les extraits de décoction, montrant un effet cytotoxique dose-dépendant significatif. Les lignées

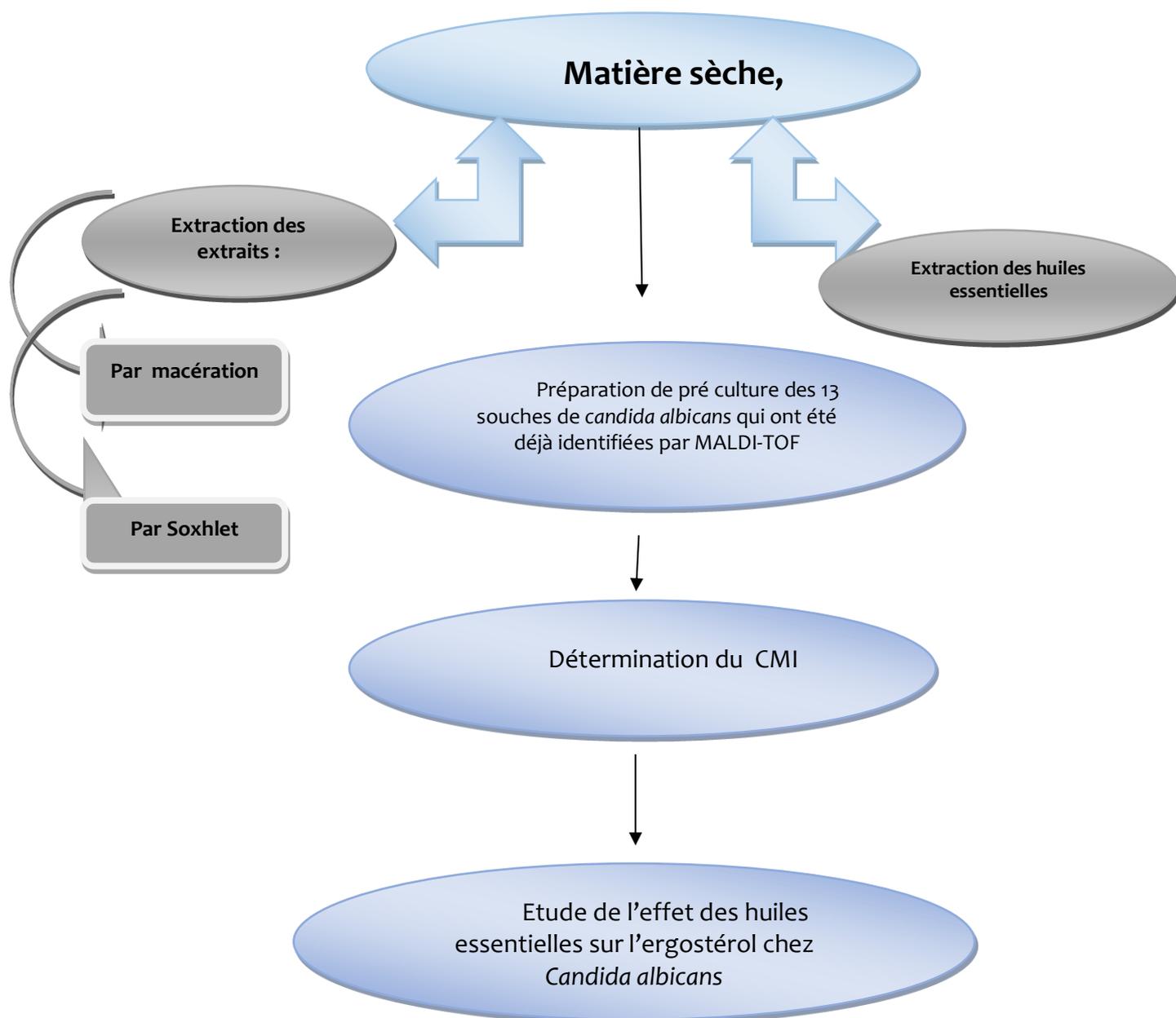
cellulaires MCF-7, HeLa et NCI-H460 étaient les plus sensibles à l'extrait hydroéthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (Idm'hand et al., 2020).

# **PARTIE III. MATERIEL ET METHODES**

### III.1. Matériel et méthodes :

#### III.1.1. Objectif et le plan de travail

Dans cette étude, notre travail a pour but d'extraire, d'analyser et d'évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits de la cannelle de Chine et de l'*Ammodaucus leucothricus*, dans lequel nous s'intéressons à étudier leur effet sur la synthèse de l'ergostérol chez *Candida albicans*. Pour cela, Notre travail consiste les étapes suivantes :



Ce travail a été effectué au niveau de laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université de Dr. Moulay Tahar de Saida.

### III.2. Matériel :

Le Matériel et les produits de laboratoire : les verreries et l'appareillage, les produits chimique et les solvants utilisés (Protocol de préparation des milieux et les produits sont motionnés dans l'annexe) et les milieux de culture au cours de la réalisation de ce travail sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : résume les Matérielles et les produits de laboratoire utilisé au cours de l'expérimentation.

<b>Verreries et appareille</b>	<b>Les Produits chimiques et les solvants</b>	<b>Les milieux utilisés</b>
Bain marie.	Glucose	Gélose Mueller Hinton
Balance.	Peptone de casiene	MH.
Etuve.	Extrait de levure.	Gélose sabouraud.
Centrifugeuse.	Mueller hinton .	GS Bouillon sabouraud
La cuve	Bleu de methylene.	BS.
Autoclave.	Agar –agar.	
Micropipette.	Koh.	
Hydro distillateur type	Ethanol.	
clevenger	Ether de petrole.	
Ampoule a decante.	Dpph.	
Plaque chauffante.	Dmso.	
Spectrophotometre.	Eau distillee.	
Becher.	Eau physiologique	
Fiole.		
Flacons		
Boite de petrie.		
Anse de platine.		
Micropipettes.		
Tubes a essai.		

### III.2.1. Matériel végétal :

#### III.2.1.1. *Cinnamomum cassia* :

La plante *Cinnamomum cassia*, qui fait l'objet de notre étude biologique, a été achetée chez un herboriste à Saida sous forme de bâtonnets d'écorce sèche et identifiée comme étant originaire du Chine. Cette plante se trouve sur le marché tout au long de l'année, pour leur importance majeure et leur usage quotidien dans la cuisine Algérienne ou en médecine. Pour la préparation de la poudre végétal, l'échantillon est broyé à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, jusqu'à son utilisation.



Figure 12 : Cannelle en bâtonnets et broyée

#### III.2.1.2. *Ammadocus leucotrichus* :

Le matériel végétal est constitué des fruits d'*Ammadocus leucotrichus*. La plante a été achetée aussi chez un herboriste à Saida. Elle est connue sous le nom de MASSOUFA ou MOUDRAYGA. Pour la préparation de la poudre végétale, la plante est déjà achetée sèche et les fruits sont nettoyés de divers artefacts et finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique avant d'être acheminé à l'extraction.



Figure 13 : fruits d'*Ammadocus leucotrichus*

### III.2.2. Matériel biologique :

Nous avons utilisé 12 souches de levures *Candida albicans* codées comme suit : A1, A2, A3, A5, A6, A7, A9, A10, A11, A12, A14, ATTC10251 (L'une diffère de l'autre par le pouvoir résistant vis-à-vis aux antifongiques) dont une collection appartient de laboratoire de l'université de Tlemcen (LAPSAB). Les souches purifiées sontensemencées sur gélose Sabouraud inclinée en tube puis incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures et mise ensuite dans le réfrigérateur à 8°C pour la conservation.

#### III.2.2.1. Préparation des précultures :

Pour réaliser chacune des pré-cultures fournies, une colonie isolée a été prélevée, mise en suspension dans 5 ml de Sabouraud liquide stérile, les tubes sont incubés à 30 C pondant 24h. À partir des tubes présentant un trouble, nous avonsensemencé par strie des boites de Pétri préalablement préparées avec le milieu Sabouraud gélose. Les boites sont mises à incuber à 30°C pendant 24 à 48 heures.



Figure14 : Ensemencement par stries des souches de *C. albicans*

### **III.3. Identification:**

#### **III.3.1. Examen macroscopique:**

Après l'incubation de 48 h, l'observation des boîtes Pétri qui contient de gélose Sabouraud a été faite par l'œil nu. L'examen macroscopique des boîtes montrent des colonies blanchâtres ou crémeuses et lisses brillantes.

#### **III.3.2. Examen microscopique :**

L'observation microscopique de *Candida albicans* a été effectuée à l'état frais. Une goutte de la suspension levurienne a été prélevée et puis versée sur une lame stérile et couverte par une lamelle afin de l'observer par microscope optique  $\times 40$ .

### **III.4. Extraction de l'huile essentielle :**

#### **III.4.1. *Cinnamomum cassia*:**

L'extraction de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia* a été réalisée par entraînement à la vapeur à température de  $150^{\circ}\text{C}$  (figure 15) au niveau de laboratoire pédagogique au département de biologie de Saida. La cannelle a été broyée à l'aide d'un mortier et pilon. Après, nous avons placé 625g de

matériel végétal (cannelle) et deux litres d'eau distillée dans le réacteur et ensuite placé sur une plaque chauffante. Ensuite l'ensemble est porté à l'ébullition pendant environ 2 heures et demi. Les vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant et se condensent puis elles sont récupérées sous forme de distillat.

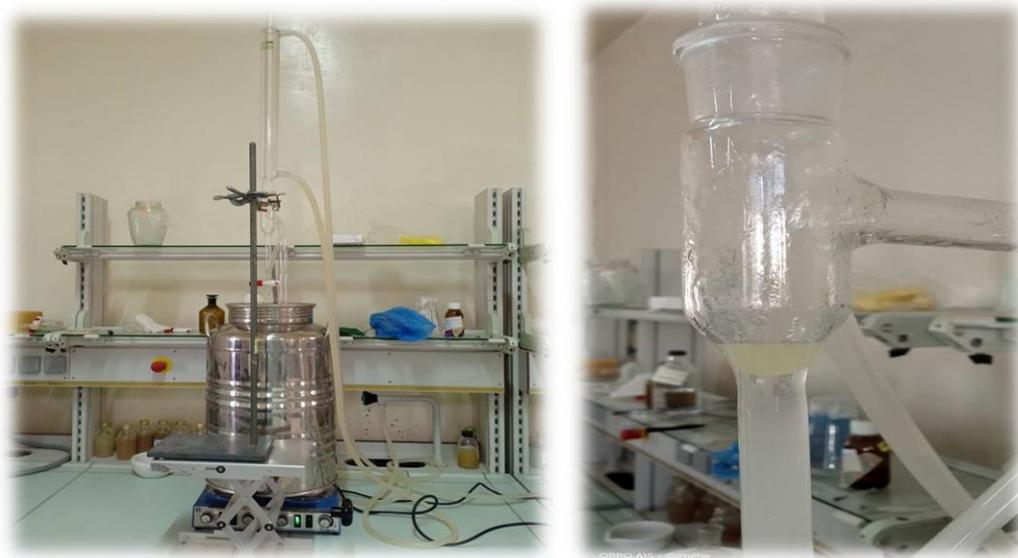


Figure 15 : montage utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia*

### III.5. *Ammaudocus leucotrichus* :

L'extraction de l'HE à partir des fruits d'*A. leucotrichus* a été réalisée par l'entraînement à la vapeur. En effet, l'extraction a été réalisée par ébullition de 600 g du matériel végétal imprégné d'une quantité de 2 L d'eau distillée pendant trois heures et 30 min. Les vapeurs chargées de substances volatiles traversent la partie réfrigérée par l'eau froide se condensent puis elles sont récupérées dans une ampoule à décantation. L'eau et l'huile essentielle se séparent par différence de densité. Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à 600 g de la matière sèche. Ensuite l'huile obtenue a été conservée dans un flacon sombre jusqu'à son usage.



Figure 16 : montage utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle d'*Ammaudocus leucotrichus*

### III.6. Décantation et conservation des huiles essentielles :

Après cela, nous avons décanté les huiles essentielles à l'aide d'une ampoule à décanter et puis les récupéré et conditionné dans un tube à essai protégé avec de papier d'aluminium. Ensuite, elles sont conservées jusqu'à son usage.

#### Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse de l'huile extraite et la masse de la plante à traiter. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$\text{RHE (\%)} = M'/M \times 100$$

RHE (%): Rendement de l'huile en pourcentage.

M': masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

M: masse de la plante utilisée en gramme

**III.7. Préparation des extraits éthanolique :**

Extraction par Soxhlet :

Mode Opérateur:

Le principe consiste à effectuer une extraction par un solvant organique à l'aide de dispositif Soxhlet d'une capacité de 500 ml. La poudre de la matière végétale des deux plantes (*Cinnamomum cassia* et *Ammadocus leucotrichus*) est épuisée en matière grasse par le passage des solvants. On estime qu'une extraction est totale après 1h10 min et 1h20 min d'*Ammadocus leucotrichus* et de *Cinnamomum cassia*, respectivement. Le solvant utilisé est l'éthanol 96 %. Une fois l'extraction terminée les solvants sont éliminés à l'aide d'un Rotavapor. Cette extraction repose sur le principe suivant : les composés apolaires sont insolubles dans les composés polaires comme l'eau, mais solubles dans les solvants organiques tels que l'éthanol. Le point d'évaporation de l'éthanol étant inférieur à celui des matières grasses à extraire, il est donc très facile de les séparer par chauffage.

Tableau 4 : résume le protocole de soxlet de deux plante (*Cinnamomum cassia* et *Ammadocus leucotrichus*)

	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Ammadocus leucotrichus</i>
<b>Etats</b>	<b>Poudre</b>	<b>Poudre</b>
<b>Masse traitée</b>	<b>50 g</b>	<b>37.7 g</b>
<b>Durée d'extraction</b>	<b>1 h 06min</b>	<b>1h 21 min</b>
<b>Nombres de cycles</b>	<b>7 cycles</b>	<b>7 cycles</b>
<b>Solvant utilisé</b>	<b>500 ml d'éthanol</b>	<b>300 ml d'éthanol</b>



Figure 17: préparation des extraits éthanoïques par Soxhlet

### III.8. Calcul le rendement de l'extrait

Le rendement de l'extrait est calculé par la formule suivante :

$$\text{MG (\%)} = \frac{\text{P1} - \text{P2}}{\text{ME}} \times 100$$

P2 : poids du ballon vide.

P1 : poids du ballon après évaporation.

ME : masse de la prise d'essai. MG : taux de la matière grasse.

100: pour le pourcentage

### III.9. Extraction par macération :

Le matériel végétal des deux plantes étudiées a été broyé et soumis à une extraction par macération dans l'éthanol pendant 24 heures sous agitation.

Tableau 5: résumé le Protocol de macération de deux plante *Cinnamomum cassia* et *Ammadocus leucotrichus*

	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Ammadocus leucotrichus</i>
Etat	Sec	Sec
Masse traité	20 g	20g
Ethanol	200 ml	200 ml



Figure 18 : préparation des extraits éthanoïques par macération.

**Filtration :**

Le mélange homogène obtenu Après 24 heure d'extraction est constitué du solvant (éthanol) et différentes molécules biologiques de la plante et qui sont solubles dans le solvant utilisé. Le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre, les filtrats sont concentrés à sec sous pression réduite et à une température de 60°C par un évaporateur rotatif. Les extraits obtenus sont conservés et recouverts par un papier aluminium.



Figure 19 : filtration du produit des soxhlet

### III.10. Dosage des métabolites secondaire

#### III.10.1. Dosage de la teneur en polyphenols totaux (TTP)

La TTP des extraits a été estimée par spectrométrie selon la méthode du Folin-Ciocalteu (FC) adopté par Afroz et al. (2014). Brièvement, une aliquote de la fraction d'échantillon diluée a été ajoutée à 0,5 mL d'eau distillée et à 0,125 mL de réactif de FC. Le mélange est ensuite agité et incubé pendant 6 min. avant d'ajouter 1,25 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7%). La solution est ensuite ajustée avec d'eau distillée jusqu'à un volume final de 3 mL. Après incubation dans l'obscurité (30 min), l'absorbance est lue à 765 nm par rapport à un blanc préparé.

#### III.10.2. Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT)

Tout d'abord, 100  $\mu\text{L}$  de l'extrait (1 mg/mL) est mélangé avec 0,3 mL de nitrite de sodium à 5%. Après environ 5 min, 0,3 mL d' $\text{AlCl}_3$  à 10% sont ajoutés. Puis, après 6 min, 2 mL supplémentaires d'hydroxyde de sodium 1M (NaOH) sont ajoutés. La solution est ensuite ajustée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 2,5 mL. L'intensité de la couleur du complexe flavonoïde-aluminium a été mesurée à 510 nm (Afroz et al., 2014).

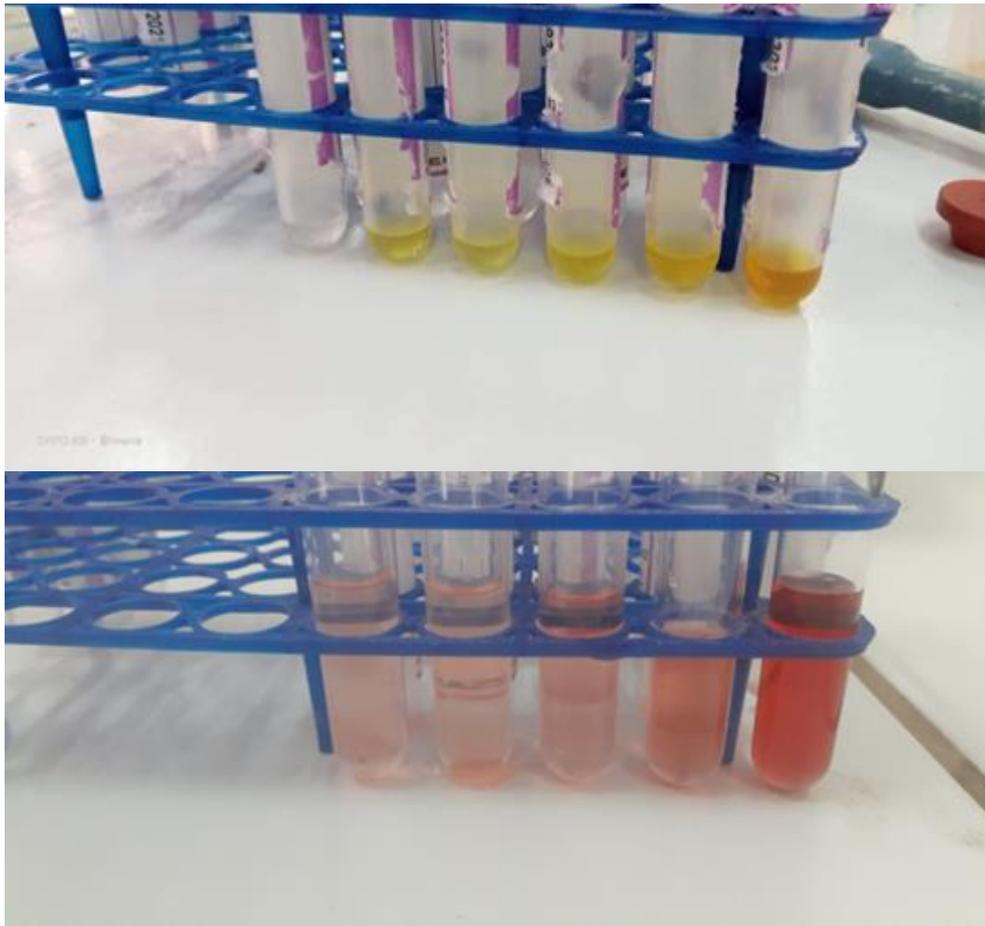
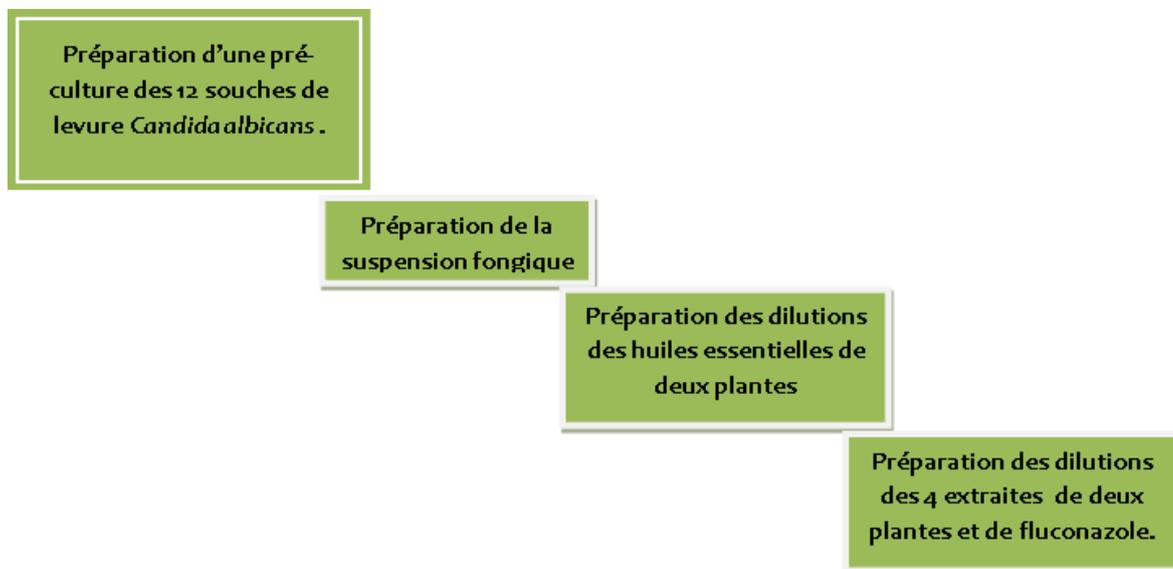


Figure 20: dosage des métabolites secondaire

### III.10.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI):

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antifongique nécessaire pour inhiber la croissance d'une levure. En fonction de la valeur brute de la CMI obtenue, l'isolat sera classé comme sensible, résistant ou intermédiaire. Ces valeurs brutes pouvant être influencées par le pH, l'inoculum, le milieu de culture, la durée d'incubation et la température.

Le schéma ci-dessous résume les étapes de protocole pour la détermination de la CMI :



### III.11. Préparation de pré-culture :

Détermination des CMI des huiles essentielles et des extraits doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de la phase exponentielle de la croissance. La réactivation des souches s'effectue par ensemencement dans un milieu de culture liquide (bouillon Sabouraud). Après incubation de 24 heures à 30°C, un deuxième repiquage est réalisé sur des boîtes de pétri contenant de la gélose Sabouraud, puis, incubées à 30°C pendant 48 heures (Hellal, 2011).



Figure 21 : préparation de la pré-culture des souches étudiés.

#### III.11.1. Préparation de la suspension fongique :

A partir des cultures jeunes sur gélose nutritive, nous avons prélevé 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml de solution salin 0.9%. Ensuite, nous avons agité au vortex pendant quelques secondes.

#### III.11.2. Préparation des dilutions des huiles essentielles :

Le CMI a été déterminée à l'aide de l'essai de dilution de l'agar, une série des dilutions des HA (huile essentielle d'*Ammadocus leucotrichus*) et HC (huile essentielle de *Cinnamomum cassia*) ont été préparés dans l'agar 0.2 % pour améliorer la solubilité ; dont la concentration mère de HC et HA étaient: 0.0503g/ml ; 0.046g/ml, respectivement.

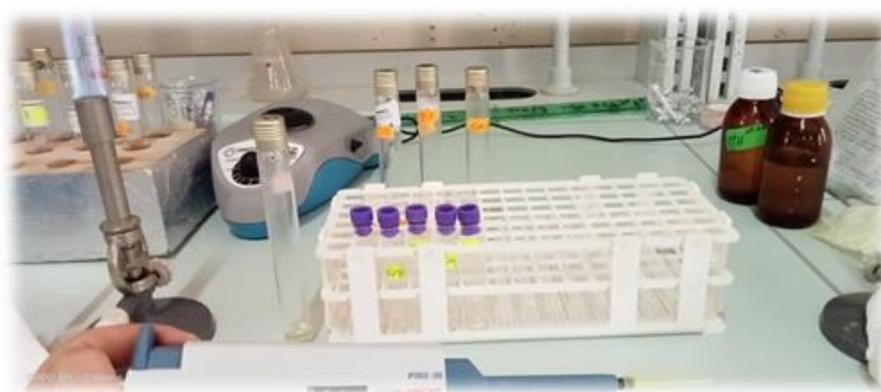


Figure 22 : préparation des dilutions des huiles essentielles.

### **III.11.3. Préparation des dilutions des extraites**

#### **III.11.4. Extraites de *Cinnamomum cassia*:**

Les extraits de macération et soxhlet de cannelle ont été dissoudre dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde), dont la quantité est de 1.5g pour chaque extrait. Le mélange est vortexé jusqu'à l'homogénéité. Ce mélange a été dilué par l'eau distillée stérile dont les solutions mères des extrais obtenus par macération et Soxhlet étaient : 0.23mg/ml et 0.46mg/ml, respectivement.

#### **III.11.5. Extraits d'*Ammadocus leucotrichus* :**

Les extraits de macération et soxhlet ont été dilués dans l'eau distillée stérile par dissoudre de 0.03 g de l'extrait dans 3 ml d'eau distillée stérile. Le mélange est vortexé jusqu'à l'homogénéité. Ce dernier va être dilué par l'eau distillée stérile où la solution mère des extraits obtenus par macération et Soxhlet était : 1 mg/ml.

#### **III.11.6. Préparation de dilution du fungizone :**

Fungizone est un médicament sous forme de suspension buvable à base d'Amphotéricine B (10 %). C'est un antifongique. Il permet d'éliminer certains champignons microscopiques présents dans le tube digestif (bouche et intestin). Il est utilisé dans le traitement des candidoses. Une dose de 9.6 µl a été homogénéisée dans 3ml d'agar 0.5 %.

### **III.12. Inoculation et détermination des CMI sur milieu solide :**

Une série de boîtes de Pétri est préparée avec des différentes concentrations des extraits, des huiles essentielles et du Fungizone (1ml de chaque dilution) et 19 ml de milieu Mueller-Hinton avec 2 % de glucose et bleu de méthylène (0.5%) avec un PH = 7.1 ± 0.2. Ce milieu est destiné à être utilisé comme moyen de différenciation de *Candida spp.* à base d'agar Mueller-Hinton. Le milieu est modifié par l'ajout d'un indicateur de glucose et de bleu de méthylène est le milieu recommandé pour les tests de sensibilité des levures selon le document CLSI M44-A2.

On homogénéise et laisse se solidifier. Puis les inoculum préparés sont déposés sous le même volume 2  $\mu$ l par spot (de l'ordre du microlitre) à la surface du gélose MH et laisse sécher.

Après avoirensemencé la série de boîtes, celles-ci sont incubées dans une étuve jusqu'au lendemain (les étapes des dilutions des HE et des extraits et du Fungizone sont motionnées dans l'annexe 02.



Figure 23 : la méthode de CMI par dilution d'agar sur milieu solide (MH).

#### **Détermination du taux de l'ergostérol :**

D'après les résultats de CMI obtenu, nous avons choisi 4 souches pour la détermination de l'ergostérol.

Une seule colonie de *C. albicans* à partir d'une culture Sabouraud gélose a été utilisée pour inoculer 50 ml de bouillon Sabouraud dextrose contenant une concentration en huiles essentielles égale à la CMI la plus faible. Les cultures ont été incubées pendant 16 h sous agitation à 35 °C.



Figure 24 : traitement des souches sélectionnées avec des concentrations en huiles essentielles égale à la CMI la plus faible



Figure 25 : incubation des cultures sous l'agitation.

Les cellules en phase stationnaire ont été récoltées par centrifugation à 2700 tours/min pendant 5 min et lavées une fois avec de l'eau distillée stérile. Le poids net humide du culot cellulaire a été déterminé.

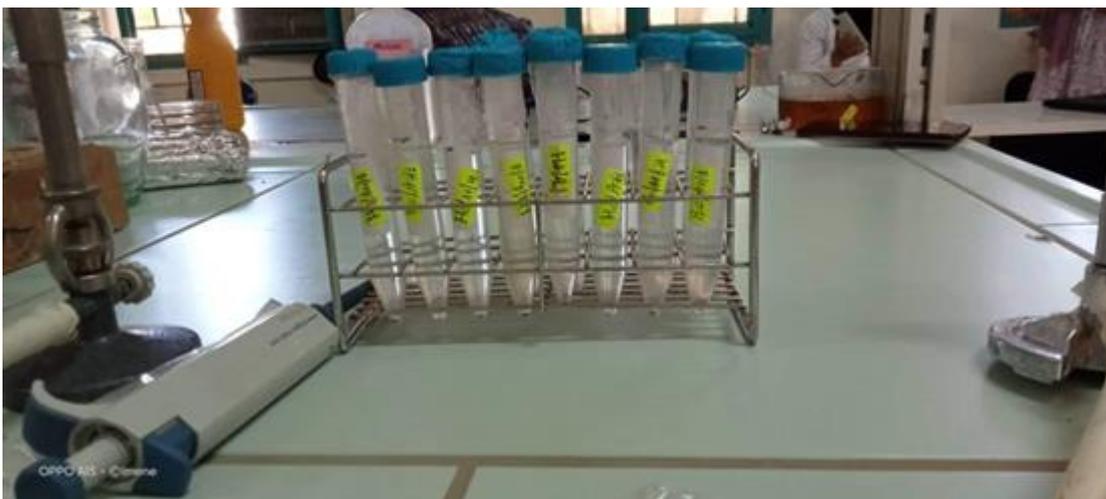


Figure 26 : centrifugation et lavage des cellules en phase stationnaire.



Figure 27 : détermination du poids net humide du culot cellulaire

Trois millilitres de solution d'hydroxyde de potassium alcoolique à 25% (25 g du KOH et 35 ml de l'eau distillée stérile, compléter à 100 ml avec l'éthanol à 100%), ont été ajoutés à chaque pastille et mélangés au vortex pendant 1 min.

Les suspensions cellulaires ont été transférées dans des tubes à essai stériles et ont été incubés dans un bain d'eau à 85 °C pendant 1 h.



Figure 28 : incubation dans le bain d'eau à 85°C pendant 1h.

Après incubation, les tubes ont été refroidis à température ambiante. Les stérols ont été ensuite extraits par l'addition d'un mélange de 1 ml d'eau distillée stérile et 3 ml d'éther de pétrole mélangés pendant 3 min. La couche d'éther de pétrole a été transféré dans un tube à essais et stocké à 4 ° C (24 H au maximum).



Figure 29 : extraction des stérols par l'addition du mélange d'eau distillée stérile et éther de pétrole.



Figure 30 : homogénéisation du mélange

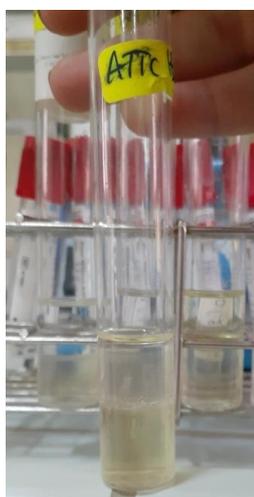


Figure 31 : la couche de n-heptane et stérol.



Figure 32 : transfert de la couche d'éther de pétrole.

Avant l'analyse, un aliquote de 20  $\mu$ l de stérol extrait a été diluée cinq fois dans l'éthanol à 100% et scanné par spectrophotométrie entre 230 et 300 nm (Beth et coll., 1999).



Figure 33 : dilution de stérol extrait dans l'éthanol



Figure 34 : la lecture des extraits de stérol diluée par spectrométrie UV-Visible entre 230 et 300.

La présence de l'ergostérol et les stérols intermédiaires dans les extraits se présente par 4 pics caractéristiques. La quantité de l'ergostérol est calculée comme un pourcentage de poids humide des cellules par l'équation suivante :

$$\% \text{ ergostérol} + \% 24(28)\text{DHE} = [(A_{281.5}/290) \times F] / \text{culot cellulaire}$$

$$\% 24(28)\text{DHE} = [(A_{230}/518) \times F] / \text{culot cellulaire}$$

$$\% \text{ ergostérol} = [\% \text{ ergostérol} + \% 24(28)\text{DHE}] - \% 24(28)\text{DHE}$$

F : facteur de dilution

24(28)dehydroergosterol[24(28)DHE, a late sterol pathway intermediate

**Etude de Docking sur la possibilité de l'effet inhibiteur des composés d'huile essentielle extraite de la plante *Ammaudocus leucotrchus* sur l'enzyme CYP51:**

Cette étude a été réalisée par Mr. Abdelkrim RACHEDI, MCA au département de biologie, faculté des sciences, université de Saida Dr Moulay Tahar. L'étude d'amarrage envisagée dans ce projet est destinée à étudier le potentiel inhibiteur pouvant être présent dans les composés extraits de la plante *Cinnamomum cassia* (Cc) contre l'enzyme lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylases (CYP51) des principaux agents pathogènes fongiques *Candida albicans*, par l'utilisation de l'outil SSFS(\*) du serveur de bioinformatique univ-saida, <https://bioinformatics.univ-saida.dz/>.

# **PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION**

---

#### IV.1. Calcul des rendements des huiles essentielle :

Le rendement est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$R\% = \frac{M_{HE}}{M_f} \times 100$  ; la masse de l'huile essentielle sur la masse de matière fraîche en gramme. Le rendement de HE de *C. cassia* et d'*A. leucotrichus* est déterminé selon l'équation précédente dans le tableau suivants :

Tableau 6: représente le rendement des huiles de *C. cassia* et d'*A. leucotrichus*

	Rendement d'HE de <i>C. cassia</i>	Rendement d'HE d' <i>A. leucotrichus</i>
La masse de l'huile essentielle (g)	2.8 g	2.6 g
La masse de matière sèche (g)	625 g	600 g
Le rendement (%)	0.44%	0.43%

#### IV.2. Le rendement de HE d'*A. leucotrichus* :

L'extraction de 600 g des fruits d'*A. leucotrichus* par entrainement à la vapeur a fourni une huile essentielle bleue à odeur très forte, avec un rendement faible d'environ 0.43% de la masse végétale sèche. La comparaison de ce rendement en HE avec ceux rapportés dans la littérature a révélé une valeur d'environ 1,8% par Naima (2019) et d'environ 2.3% par Manssouri (2020). Il est bien montré que le rendement de notre plante est très faible avec celui de ces auteurs. Cette variation de rendements en HE des fruits d'*A. leucotrichus* peut être attribuée aux plusieurs facteurs tels que : l'origine de la matière végétale, les exigences édapho-climatiques de la plante, la période de la cueillette, la génétique de la plante, l'âge de la plante, le mode de séchage de la plante et la méthode d'extraction utilisée (Manssouri, 2020).

#### Le rendement de HE de *C. cassia* :

Les huiles essentielles des échantillons d'écorce de cannelle ont été extraites par entrainement à la vapeur, qui résulte des huiles de cire jaune clair avec odeur forte avec un rendement d'environ 0.44%. Cette valeur est faible

avec celle obtenue par Li (2013) qu'était d'environ 0,72 à 3,08%. Le rendement et la composition chimique des HE dépendent de plusieurs facteurs citons parmi lesquels les conditions climatiques et environnementales, les conditions de croissance dans les différents sites de culture, la situation géographique, la période de la cueillette, la durée de séchage, les conditions de stockage de conservation et le procédé d'extraction (Li, 2013).



Figure 35 : l'huile essentielle de cannelle (A) et l'huile essentielle d'*Ammaudocus leucotrichus* (B)

**Calcul de rendements des extraits obtenus par Soxhlet et macération :**Tableau 7 : représente les rendements des extraits de *C.cassia* et d'*A.leucotrichus*.

	Macération		Soxhlet	
	<i>C. cassia</i>	<i>A. leucotrichus</i>	<i>C. cassia</i>	<i>A. leucotrichus</i>
<b>P1-P2</b>	2.4 g	3.01 g	2.8 g	6.5 g
<b>Me</b>	20 g	20 g	50 g	31.7 g
<b>Rendement</b>	12 %	15.05 %	5.6 %	20.50 %

Le rendement des extraits éthanoliques de *C. cassia* et *A. leucotrichus* ont été calculés par l'équation  $MG\% = P1-P2 / Me \times 100$  (les pesse P1 et P2 et Me sont mentionnée dans l'annexe. L'extrait final de *C. cassia* qui était obtenu par les deux méthodes c'était un liquide visqueux marron foncé avec pourcentage du poids sec de 12% (macération) et 5.6 % (Soxhlet). Cependant, l'extrait d'*A. leucotrichus* c'était sous forme un liquide visqueux et gras vert foncé avec un pourcentage du poids sec de 15.05 % (macération) et 20.50% (Soxhlet).

Figure 36 : l'extrait éthanolique de *C. cassia*

D'un autre côté, le rendement d'extrait éthanolique de *C. cassia* obtenu par macération est inférieur à celui de l'extrait d'*A. leucotrichus* sachant que on a pris le même poids de matière végétale poudre (20g) dans la même quantité d'éthanol (200ml).

En comparant entre le rendement obtenu par l'entraînement à la vapeur et celui de l'extraction par Soxlet et par macération, nous avons remarqué que les deux technique d'extraction (Soxlet et macération) confèrent un rendement plus important par rapport à celui de l'hydrodistillation.

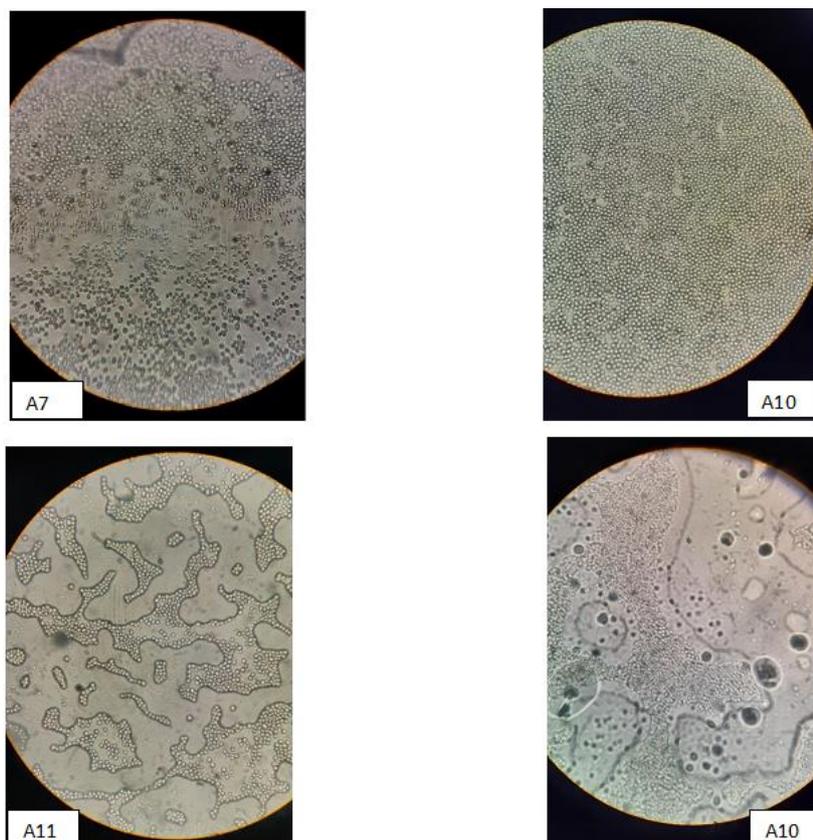
Examen macroscopique de la souche :

L'examen macroscopique montre une colonie blanche, crémeuse, lisse. Certaines souches sont plus rugueuses (Csank, 2000).



Figure 37 : Examen macroscopique de *C. albicans*

Examen microscopique :



Figures 38: l'observation microscopique de *C. albicans* (G x 100).

### IV.3. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes.

Le screening phytochimique au moyen des tests de coloration a permis de mettre en évidence les familles chimiques qui renferme les deux plantes étudiées *C. cassia* et *A. leucotrichus*.

### IV.4. Les polyphénols

Nous avons calculé la proportion des polyphénols dans *C.cassia* et *A. leucotrichus*. La teneur totale en phénol est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique :  $y = 0,0029x - 0,0376$  ( $R^2 = 0,9742$ ) et les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique par g d'échantillon séché (mg EAG/g MS).

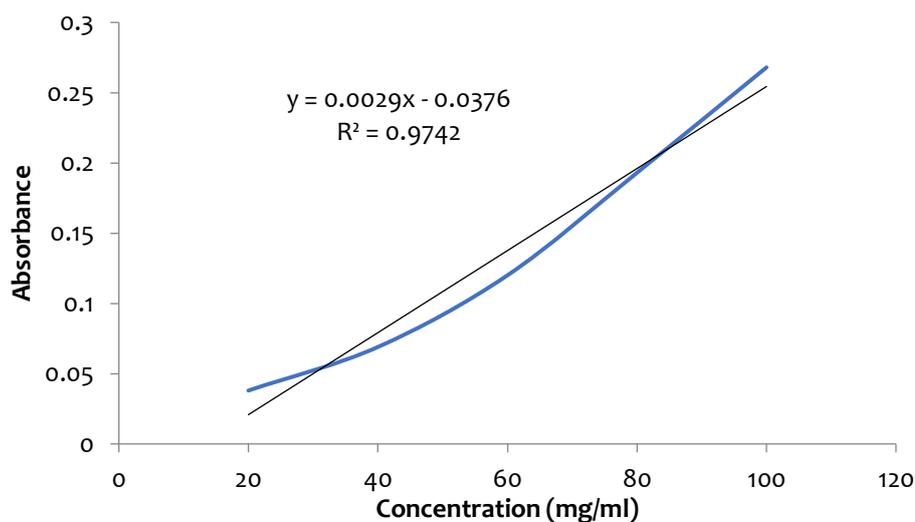


Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

L'extrait sec obtenu par Soxlet de la poudre de *C. cassia* et par macération et Soxlet de poudre de l'*A. leucotrichus* a fait l'objet de dosages colorimétriques des polyphénols. Nous résumons dans les tableaux suivants les résultats des composants actifs.

Tableau 8 : représente les polyphénols qui sont présents dans les extraits (CS, PS et PM).

Extraits	Abosrabnce1	Absorbance2	La moyenne	Taux des Polyphénols (mg EAG/g MS)
CS	0,494	0,503	0,499	184,862069
PM	0,102	0,123	0,113	51,7586207
PS	0,187	0,167	0,177	74

CS : Extrait de *Cinnamomum cassia* qui obtenu par soxlet.

PM : Extrait d'*Ammodaucus leucotrichus* qui obtenu par macération.

PS : Extrait d'*Ammodaucus leucotrichus* qui obtenu par soxlet.

### Les flavonoïdes :

Grâce à l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de Catéchine nous avons calculé la proportion des flavonoïdes dans *C. cassia* et *A. leucotrichus*.

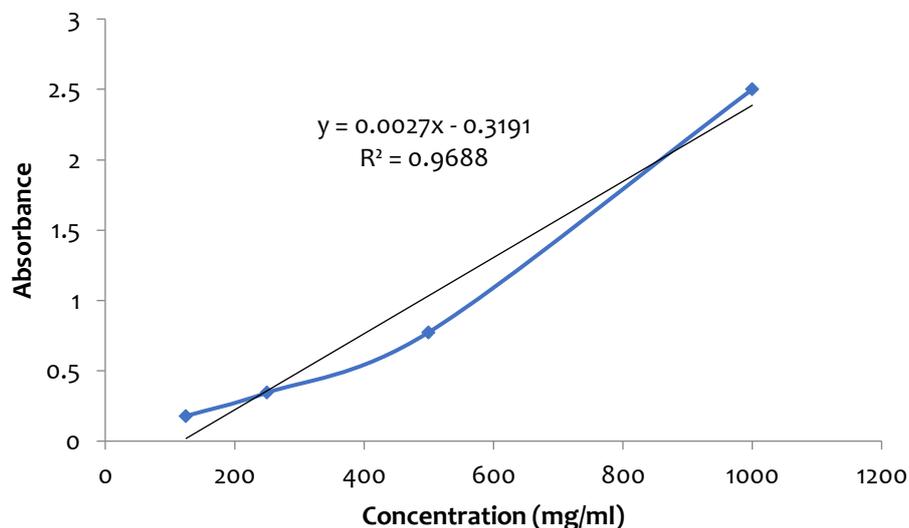


Figure 40: Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats de dosage des flavonoïdes dans les extraits CS, PM et PS sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : représente les flavonoïdes qui sont présents dans les extraits CS, PS et PM.

Extraits	Abosrabnce1	Absorbance2	La moyenne	Taux des flavonoïdes (mg EC/g MS)
CS	0,263	0,369	0,316	235,22
PM	0,211	0,188	0,200	192,07
PS	0,166	0,175	0,171	181,33

CS : Extrait de *Cinnamomum cassia* qui obtenu par soxlet.

PM : Extrait d'*Ammodaucus leucotrichus* qui obtenu par macération.

PS : Extrait d'*Ammodaucus leucotrichus* qui obtenu par soxlet.

Tableau 10 : tableau résume la présence d'un groupe de métabolites secondaires dans les trois extraits (CS, PM et PS).

	<b>CS</b>	<b>PM</b>	<b>PS</b>
Les flavonoïdes	+++	++	+
Polyphénol	+++	+	++

(+): Présence faible, (++) : Présence moyenne, (+++) : Présence forte

Le dosage spectrophotométrique des polyphénols et flavonoïdes nous a permis de mettre en évidence les métabolites secondaires présents dans les trois extraits qui nous avons préparés (CS, PM et PS) par des réactions de coloration, et des observations. Les résultats obtenus ont révélé la présence des flavonoïdes, des polyphénols dans les deux plantes étudiées qui sont en accord avec ceux de Merghache et al. (2012) des extraits de l'écorce de cannelier (*C. cassia*) et de Manssouri et al. (2020) qui ont enregistré la présence de polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de *A. leucotrichus*.

Sur la base des valeurs d'absorbance des différents extraits et d'après les résultats mentionnés dans les tableaux ci-dessus, nous avons trouvé que l'extrait de *C. cassia* obtenu par Soxlet est riche en polyphénols et flavonoïdes par rapport les deux extraits (PS et PM) d'*A. leucotrichus*. En revanche, l'extrait d'*A. leucotrichus* qui était obtenu par Soxlet possède une quantité élevée de flavonoïdes et petite de polyphénols par rapport l'extrait de ces derniers qui étaient obtenus par macération (PS).

#### **IV.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)**

Pour réaliser la CMI, nous avons utilisé le milieu de culture : Mueller-Hinton avec 2 % de glucose et bleu de méthylène (0.5%). Ce milieu est utilisé comme moyen de différenciation et il est recommandé pour les tests de sensibilité des levures telles que *Candida spp.* selon le document CLSI M44-A2. Le milieu est modifié par l'ajout d'un indicateur de glucose et de bleu de méthylène.

Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 11: les CMI des huiles essentielles et les extraits éthanolique de *Cinnamomum* et d'*Ammodaucus leucotrichus*; et du fungizone

Souche	CM	HA	HC	CS	F	PS	PM
A2	0,0575	0,0468	0,0125	0,023	/	/	/
A3	0,0575	0,0468	0,0125	0,023	/	/	/
A5	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/
A10	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/
A6	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/
A7	0,0575	0,0468	0,0125	0,023	0,23	/	/
A9	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/
A14	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/
A11	0,115	0,0234	0,0125	0,046	/	/	/
A12	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/
ATTC10251	0,115	0,0468	0,0125	0,046	/	/	/

#### IV.6. Les huiles essentielles :

L'HE d'*Ammodaucus leucotrichus* a un effet inhibiteur avec une concentration de 0.0468 mg/ml pour toutes les souches mentionnées à l'exception de *C. albicans* A11 qu'elle a présenté une CMI plus faible de l'ordre de 0.0234 mg/ml.

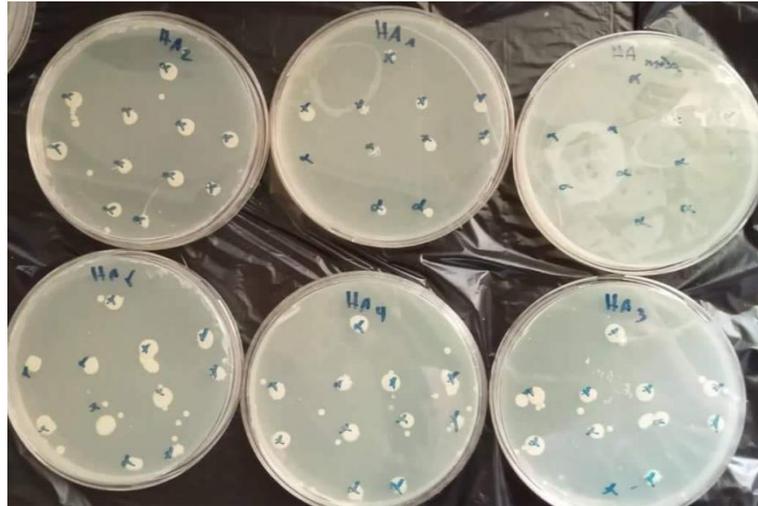


Figure 41 : CMI par dilution d'agar de l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus*

L'HE de *Cinnamomum cassia* a un effet inhibiteur puissant avec une concentration de 0.0125 mg/ml pour toutes les souches testées.

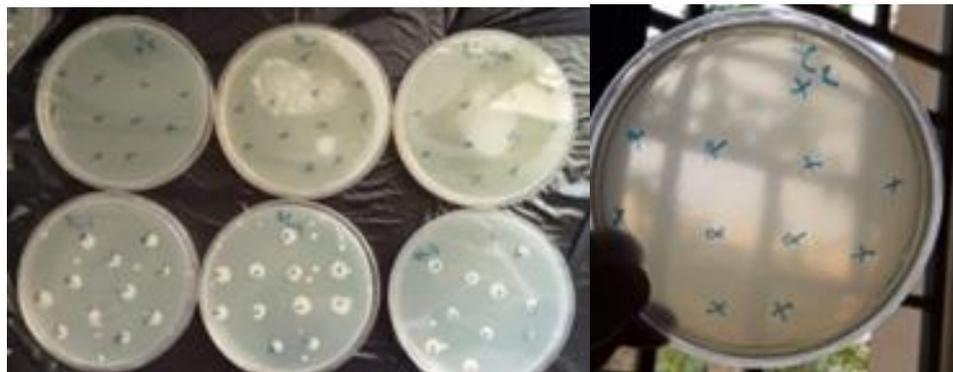


Figure 42 : CMI par dilution d'agar de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia*

Les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles testées du *C. cassia* et d'*A. leucotrichus* présentent des activités inhibitrices sur la croissance des *C. albicans*. Nous pouvons déduire que l'HE de *C. cassia* est plus forte et plus efficace dont, il nécessite une faible concentration (0.0125 mg/mg) pour inhiber la croissance de toutes les souches.

Aussi nous pouvons dire que la souche A11 est plus résistante à l'HE d'*A. leucotrichus* par rapport aux autres souches. Donc, il faudrait mentionner que la sensibilité des souches testées varie selon les dilutions.

D'autre part, la fraction volatile des huiles essentielles exerce une activité fongistatique ou fongicide sur la croissance des levures selon les différences de concentration. L'activité antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été donc confirmée par de nombreux auteurs (Badillet et al., 1975); (Bourrel et al., 1995).

#### IV.7. Les extraits éthanoliques (Sohxlet/macération) :

##### IV.7.1. Les extraits d'*A. leucotrichus*:

Les deux extraits quel que soit de macération (PM) ou de Soxhlet (PS) ne présentent aucun effet sur toutes les souches de *C. albicans*; ils ont un résultat négative dont les souches appariant sans croissance dans les boites de Pétri qui contiennent la concentration la plus forte des extraits (solution mère).

La négativité des résultats d'*A. leucotrichus* est peut-être due à la concentration qui n'était pas tellement forte pour inhiber les souches de *C. albicans* ; et aussi : l'origine de la matière végétale, les exigences édapho-climatiques de la plante, la période de la cueillette, la génétique de la plante, l'âge de la plante et la méthode d'extraction utilisée.



Figure 43 : CMI par dilution d'agar de l'extrait éthanolique obtenu par macération et Soxhlet d'*A. leucotrichus*.

##### Les extraits de *Cinnamomum cassia* :

Les extraits éthanoliques de *C. cassia* ont montrés de bonnes activités par l'inhibition de la croissance des souches de *C. albicans*; dont les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de *Cinnamomum cassia* obtenu par macération étaient de 0.115 mg/ml pour les souches : A5,

A10, A6, A9, A14, A11, A12 et ATTC12051 ; et de 0.0575 mg/ml pour les souche :A2, A3 et A7.

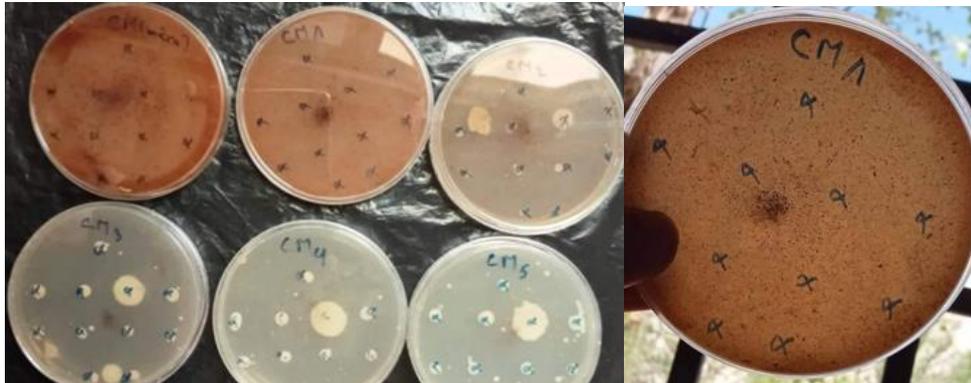


Figure 44 : CMI par dilution d'agar de l'extrait éthanolique obtenu par macération de *C. cassia*.

Cependant, la concentration minimale inhibitrice de l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet de *C. cassia* étaient de 0.046 mg/ml vis-à-vis des souches : A5, A10, A6, A9, A14, A12, A11 et de 0.023 mg/ml pour les souches : A2, A3 et A7.

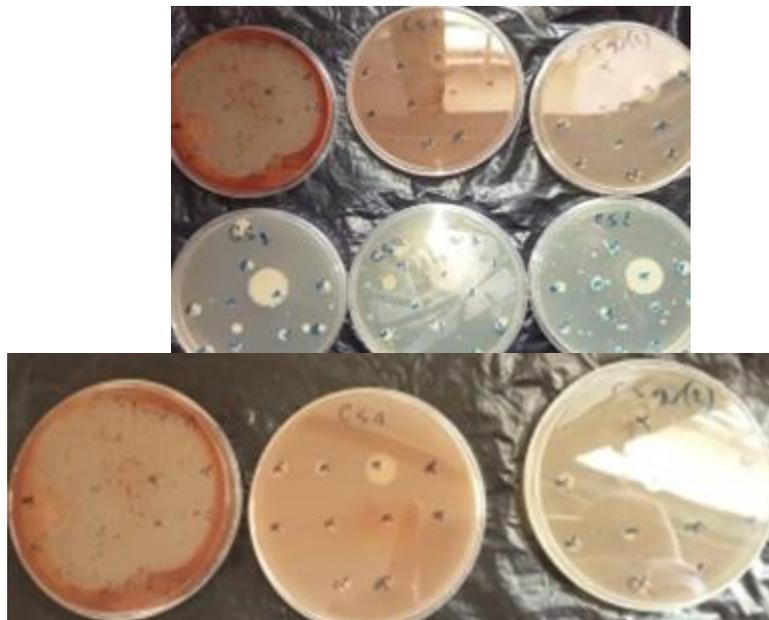


Figure 45 : CMI par dilution d'agar de l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet de *C. cassia*

#### IV.7.2. L'antifongique Fungizone :

Il était remarquable que les souches ne présentent aucune sensibilité à la concentration de la solution mère utilisée dont toutes les souches de *C. albicans* sont apparues dans les boîtes de Pétri qui contiennent la plus forte concentration à l'exception de la souche A7 qu'elle a une CMI de 0.23 mg/ml.

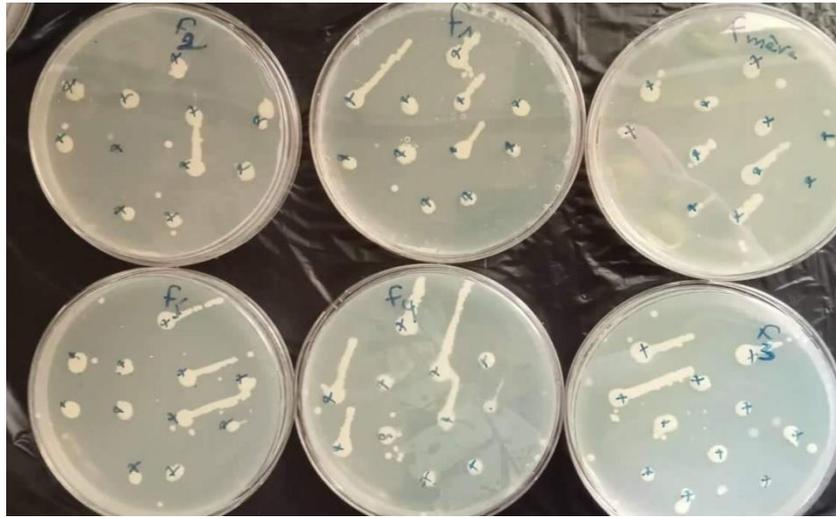


Figure 46: CMI par dilution d'agar de l'antifongique fungizone.

Si on fait une comparaison entre les huiles essentielles et les extraits pour avoir une idée sur l'agent le plus fort inhibiteur de la croissance de *Candida albicans*, nous observons que les extraits de *Cinnamomum cassia* sont les plus forts et plus précisément l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet.

D'autre part, les huiles essentielles des deux plantes étudiées montrent aussi une forte activité antifongique, dont nous remarquons que l'huile essentielle de *C. cassia* était la plus puissante que l'huile d'*ammodocus*, car il exige une faible concentration pour inhiber toutes les souches de *C. albicans* étudiés, contrairement à l'huile d'*A. leucotrichus* qui nécessite une concentration un peu plus élevée que l'huile de *C. cassia* pour inhiber les souches testées où la résistance est enregistrée jusqu'à la deuxième dilution.

Le graphe ci-dessous résume la comparaison entre les huiles et les extraits éthanoliques des plantes étudiées :

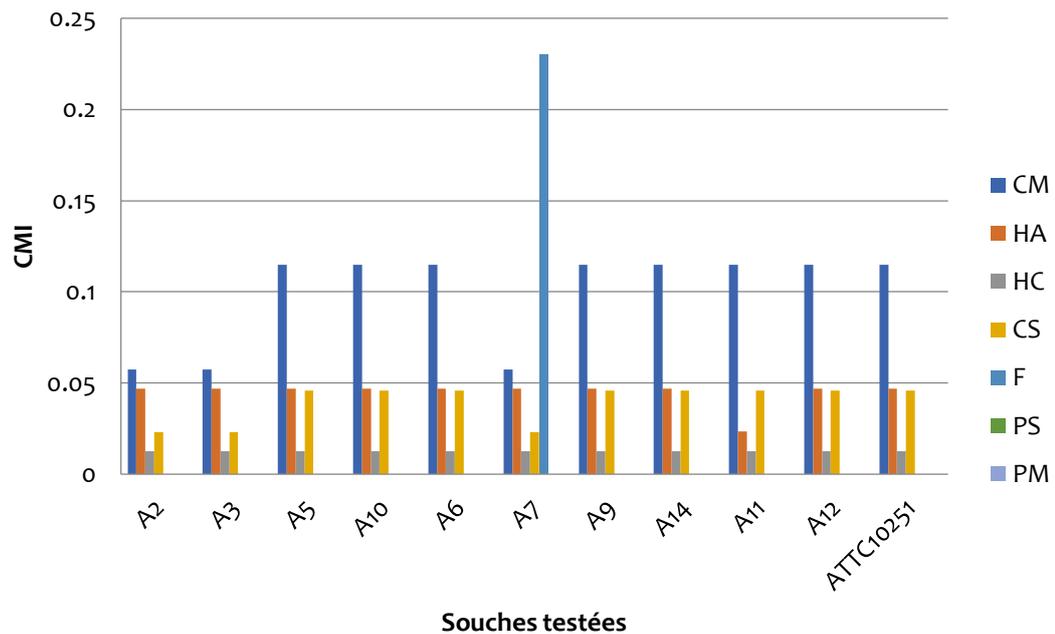


Figure 47 : Résultats des CMI des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de *C. cassia* et d'*A. leucotrichus* et ainsi que du fungizone contre les souches fongiques

Nishiyama (2013) ont également démontré que *Cinnamomum cassia* et le cinnamaldéhyde, qui est le principale composant de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia*, inhibent la croissance mycélienne de *C. albicans*. Bien que les activités antifongiques des huiles essentielles aient été bien identifiées, leurs modes d'action contre les champignons pathogènes restent largement inconnus (Nishiyama, 2013). Aussi selon Boucherit-Otmani (2013) qui a travaillé sur l'activité antifongique de différents extraits de l'écorce de *Cinnamomum cassia*, elle a trouvé qu'il a été suggéré que les extraits de cannelle chinoise ont une puissante activité antimicrobienne, en raison de ses constituants phénoliques, alcooliques et terpénoïdes.

En effet, cette activité antifongique était probablement due aux métabolites secondaires présents dans l'écorce de la cannelle et surtout à la composante majeure des terpénoïdes du cannelle de Chine, le trans-cinnamaldéhyde (92%) considérant que le trans-cinnamaldéhyde et l'omethoxy cinnamaldéhyde étaient connus pour leurs propriétés antifongiques. Ce résultat peut être comparé aux données antérieures

montrant que les aldéhydes aromatiques tels que le cinnamaldéhyde avaient de puissantes propriétés antibactériennes (Giordani, 2006).

En effet, selon Liao (2009), les études phytochimiques de cette plante ont montré la présence de monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, diterpénoïdes avec des propriétés antimicrobiennes, qui peuvent être d'une importance immense dans les traitements thérapeutiques. De nombreuses études ont été menées au cours des dernières années pour prouver une telle efficacité. En plus, tous les extraits organiques de l'écorce de cannelle chinoise étudiés ont montré une activité antifongique (Boucherit-Otmani, 2013).

En revanche, les résultats de nos recherches sont positifs et compatibles avec les résultats de recherches et d'études antérieures sur l'huile essentielle de graines d'*Ammaudocus leucotrachus* qui a été testé pour son activité antimicrobienne contre différents micro-organismes tel que *Candida albicans* qui a montré une forte action inhibitrice contre la plupart des organisme testés (Cherifi, 2020).

Contrairement aux résultats de nos extraits d'*Ammaudocus leucotrachus* qui étaient négatifs et qu'ils n'ont montré aucun effet contre la croissance de *Candida albicans*, des études antérieures montrent que les extraits ont un effet sachant qu'ils ont utilisé des différents solvants tels que l'acétone. Cette activité antimicrobienne pourrait être liée aux structures chimiques des molécules dans l'extrait d'acétone qui pourrait jouer un rôle important dans l'activité antimicrobienne en perturbant les structures cellulaires les rendre plus perméables, ce qui entraînera la mort cellulaire (Louail, 2017).

Donc, il est peut-être que les résultats négatifs de notre recherche étaient dus à l'absence d'un bon choix de concentrations qu'étaient insuffisantes pour inhiber la croissance des souches de *Candida albicans*.

#### IV.8. Résultats de la détermination de taux d'ergostérol par spectrophotomètre:

Calcul de pourcentage :

Selon l'équation  $\% 24(28)DHE = [(A_{230/518}) \times F] / \text{culot cellulaire}$  (culot cellulaire de chaque souche a été mentionné dans l'annexe 03) les résultats s'exprime dans le tableau suivants :

Tablau28 : les résultats de pourcentage de 12 dehydroergosterol de 4 souches de *C. albicans*.

	Souche ATTC		Souche A7		Souche A11		Souche A10	
	HA	HC	HA	HC	HA	HC	HA	HC
Culot cellulaire	0,21g	0,19g	0,21g	0,17g	0,21g	0,27g	0,29g	0,20g
A <sub>230</sub>	0,5	0,5	0,193	0,306	0,5	0,324	0,349	0,33
% 24(28)DHE	0,022%	0,025%	0,008%	0,017%	0,022%	0,011%	0,011%	0,015%

D'après le tableau nous remarquons que le pourcentage de 24(28) dehydroergosterol des souches ATTC, A7, A10 est faible pour l'huile essentielle de fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* par rapport l'huile essentielle de *C. cassia*. Ces résultats montrent que la souche la plus sensible aux huiles essentielles a le plus faible taux d'ergostérol qui peut signifier que leur effet est étroitement lié à la modification de taux d'ergostérol membranaire des levures.

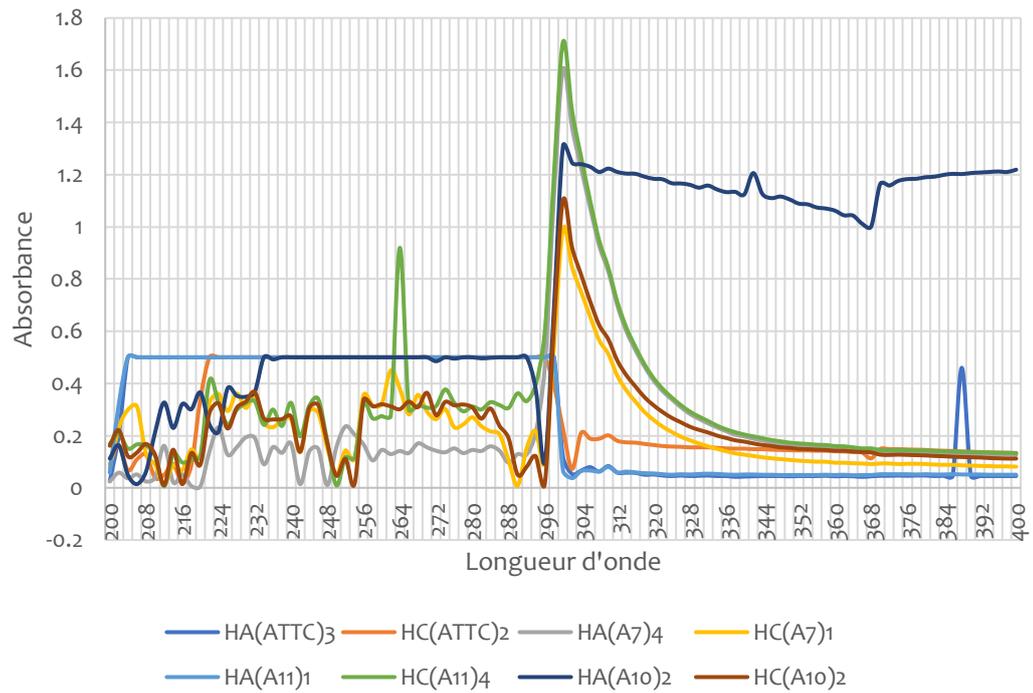


Figure 48: Courbe de dosage des stérols membranaires de *Candida albicans* traitées par les huiles essentielles d'*Ammaudocus leucotrchus* et *Cinnamomum cassia*

#### **IV.9. Etude de Docking sur la possibilité de l'effet inhibiteur des composés d'huile essentielle extraite de la plante *Ammaudocus leucotrchus* sur l'enzyme CYP51:**

L'utilisation de la bioinformatique pour avoir la possibilité de mener une étude d'amarrage sur les composés de l'huile essentielle de la plante *Ammaudocus leucotrchus* sur l'enzyme CYP51. Comme nous avons mentionné déjà dans la partie bibliographique que les dérivés azolés constituent la plus importante classe de médicaments antifongiques, comprenant une douzaine de composés différents. On distingue en fait deux types de médicaments azolés, selon leur structure chimique. Il y a d'abord les imidazoles, et les triazoles ont été découverts par la suite. Ces molécules inhibent l'enzyme lanostérol 14 $\alpha$ -demethylase, encodée par le gène ERG11 (aussi désignée CYP51). Cette enzyme fait partie de la classe des cytochromes P450 et contient donc une protoporphyrine de fer. L'inhibition de cet enzyme par les antifongiques azolés est basée sur la liaison entre un atome d'azote de l'anneau azolé et l'atome de fer contenu dans la partie hème de l'enzyme Ergi Ip (Gauthier, 2007).

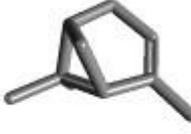
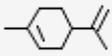
Nous avons essayé de chercher à l'aide de la bioinformatique si l'un de composant de l'huile essentielle d'*Ammaudocus leucotrchus* a la capacité d'inhiber cette enzyme clé de la biosynthèse de l'ergostérol fongique de *C. albicans*, L'étude a pour but d'avoir le potentiel inhibiteur des composés extraits de la plante d'*Ammaudocus leucotrchus* contre l'enzyme Lanosterol 14-  $\alpha$ -Demethylases (CYP51) des principaux pathogènes fongiques *Candida albicans*. Les résultats de la recherche sont les suivantes :

##### **IV.9.1. Nature des composés extraits :**

Les principaux composés considérés dans l'évaluation ont été les composants de l'huile essentielle d'*Ammaudocus leucotrchus* qui appartiennent à deux classes de petites molécules, comme le montrent les éléments suivants :

## A- Monoterpènes d'hydrocarbures :

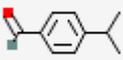
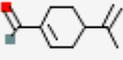
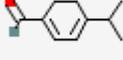
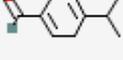
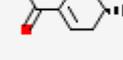
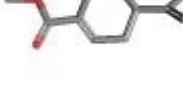
Tableau 13: les propriétés des principaux composés de Monoterpènes d'hydrocarbures de l'huile essentielle d'*Ammadocus leucotrchus*

Name / pct.	Molecular Formula	Structure 2D	Structure 3D	Property details in PubChem
$\alpha$ -Pinene /1.1%	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6654">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6654</a>
$\beta$ -Pinene /0.5%	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14896">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14896</a>
Myrcene /0.2%	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31253">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31253</a>
3-Carina /0.7%	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Carene">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Carene</a>
Limonene /12.5%	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22311">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22311</a>

..

## IV.9.2. Monoterpènes oxygénés :

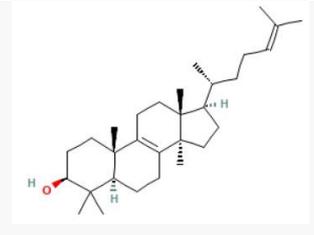
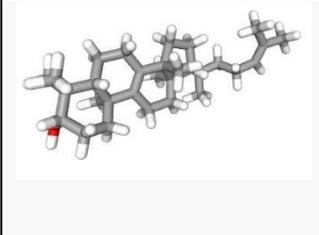
Tableau 14: les propriétés des principaux composés des Monoterpènes oxygénés de l'huile essentielle d'*Ammaudocus leucotrachus*

Name / pct.	Molecular Formula	Structure 2D	Structure 3D	Property details in PubChem
Cuminaldehyd e /1.6%	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/326">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/326</a>
Perillaldehyd e /73.5%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16441">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16441</a>
α-Terpinen-7-al /1.3%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/526762">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/526762</a>
γ-Terpinen-7-al /1.5%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6429112">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6429112</a>
Methyl perillate /1.8%	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14159029">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14159029</a>

#### IV.10. Comparaison chimique et structurale du substrat naturel et les inhibiteurs du CYP51 :

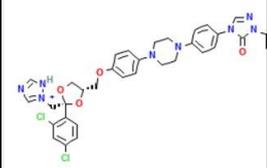
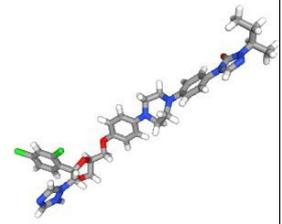
##### Le substrat Lanosterol :

Tableau 15 : la formule et structure 2Det 3D de Lanosterol

Name / pct.	Molecular Formula	Structure 2D	Structure 3D	Property details in PubChem
Lanosterol	<b>C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O</b>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/326">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/326</a>

#### IV.11. Inhibiteur de CYP51 : 1YN (basé sur une étude de recherche et 3D-structure PDB id 5v5z)

Tableau 16 : représente les inhibiteur de CYP51 : 1YN (basé sur une étude de recherche et 3D-structure PDB id 5v5z).

Name / pct.	Molecular Formula	Structure 2D	Structure 3D	Property details in PubChem
1YN or 2-[(2R)-butan-2-yl]-4-[4-[4-[4-[(2R,4S)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-2-ium-2-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-1,2,4-triazol-3-one	<b>C<sub>35</sub>H<sub>39</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub></b>			<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72710580">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72710580</a>

#### IV.12. Détails de liaison de l'inhibiteur 1YN :

Une étude structurale sur l'inhibition de l'enzyme CYP51 de *Candida albicans* et *Candida glabrata* montre les détails de la liaison de l'inhibiteur. Utilisation de l'outil SSFS(\*) du serveur de bioinformatique univ-saida, <https://bioinformatics.univ-saida.dz/>. Vous pouvez explorer la structure du boîtier de distribution électrique 5v5z comme indiqué dans l'image 1.

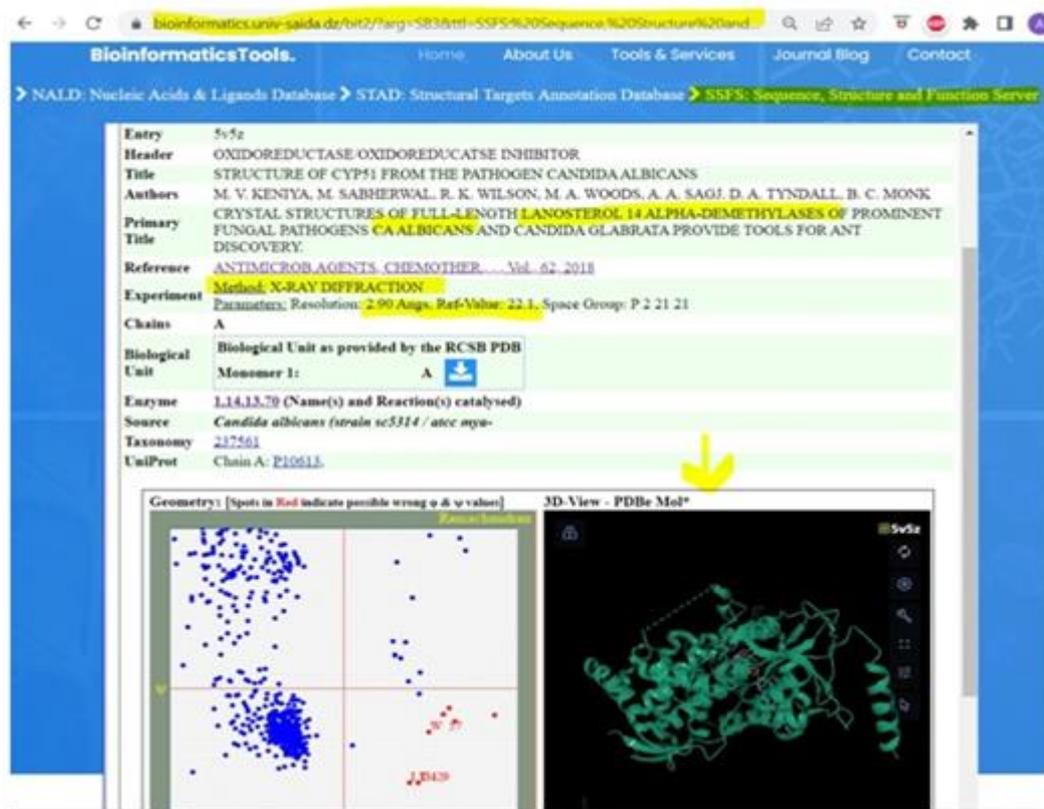


Figure 49 : Résumé des données sur la striction de l'enzyme CYP51 dans une structure complexe avec inhibiteur antifongique 1YN.

L'inhibiteur 1YN est représenté en Van Der-Waals et montre clairement les acides aminés de liaison en contact avec elle le long d'une poche de liaison assez longue. L'inhibiteur, via son anneau de Triazole, lie fortement aussi le groupe prothétique Heme à la base de la poche. Le groupe Heme prothétique (4 anneaux de pyrrole avec Fe au centre) sont des groupes importants nécessaires à la fonction des cytochromes et de nombreuses protéines globines telles que l'hémoglobine et la myoglobine.

Le groupe Heme est présent dans l'enzyme CYP51 parce que cette enzyme est en fait un cytochrome. La liaison de l'anneau de Triazole fait 1YN coller fortement au site de liaison donc compte dans l'efficacité de cet inhibiteur à utiliser comme un médicament antifongique. Voir aussi l'image 3, qui montre une représentation simplifiée.

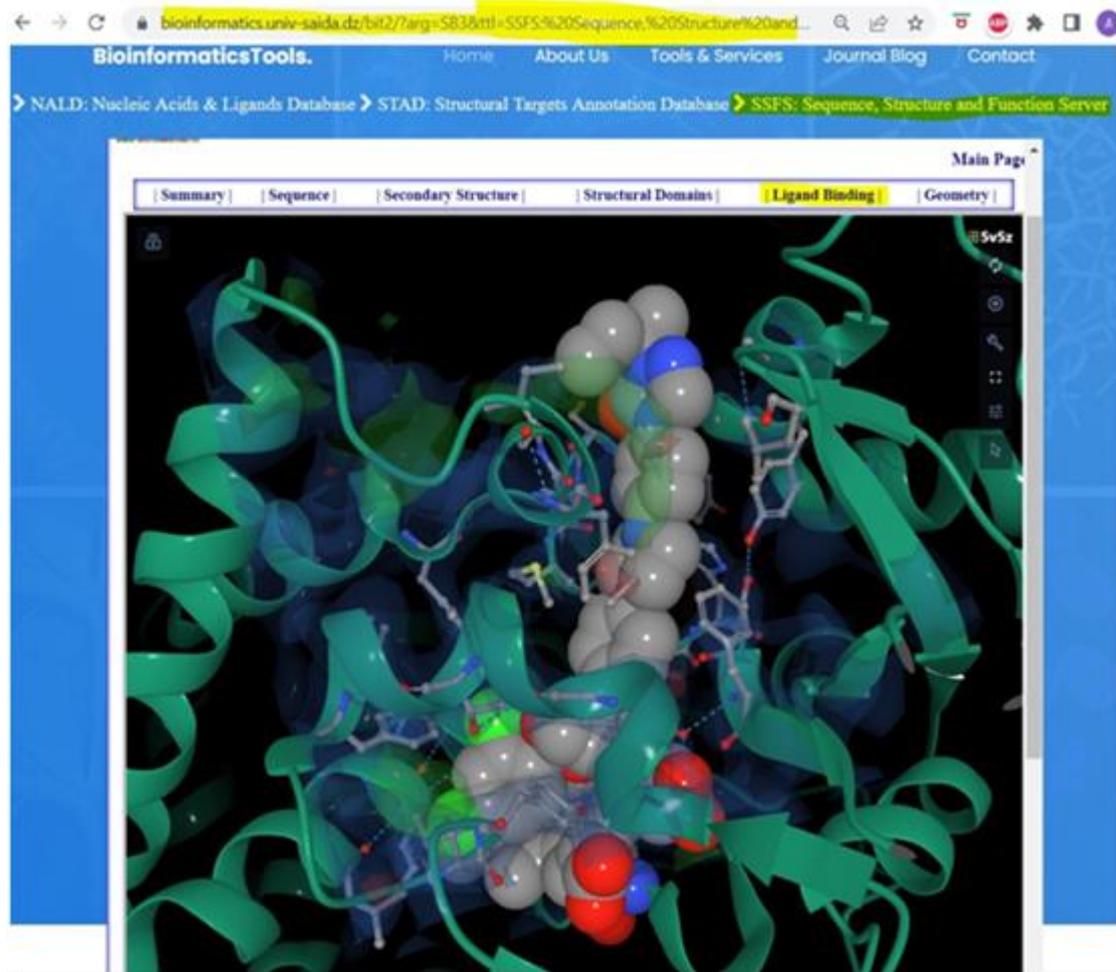


Figure 50: L'inhibiteur 1YN dans la poche de liaison entouré de résidus de contact. Au bas de la poche de liaison, l'inhibiteur lie le groupe Heme à travers l'anneau de triazole

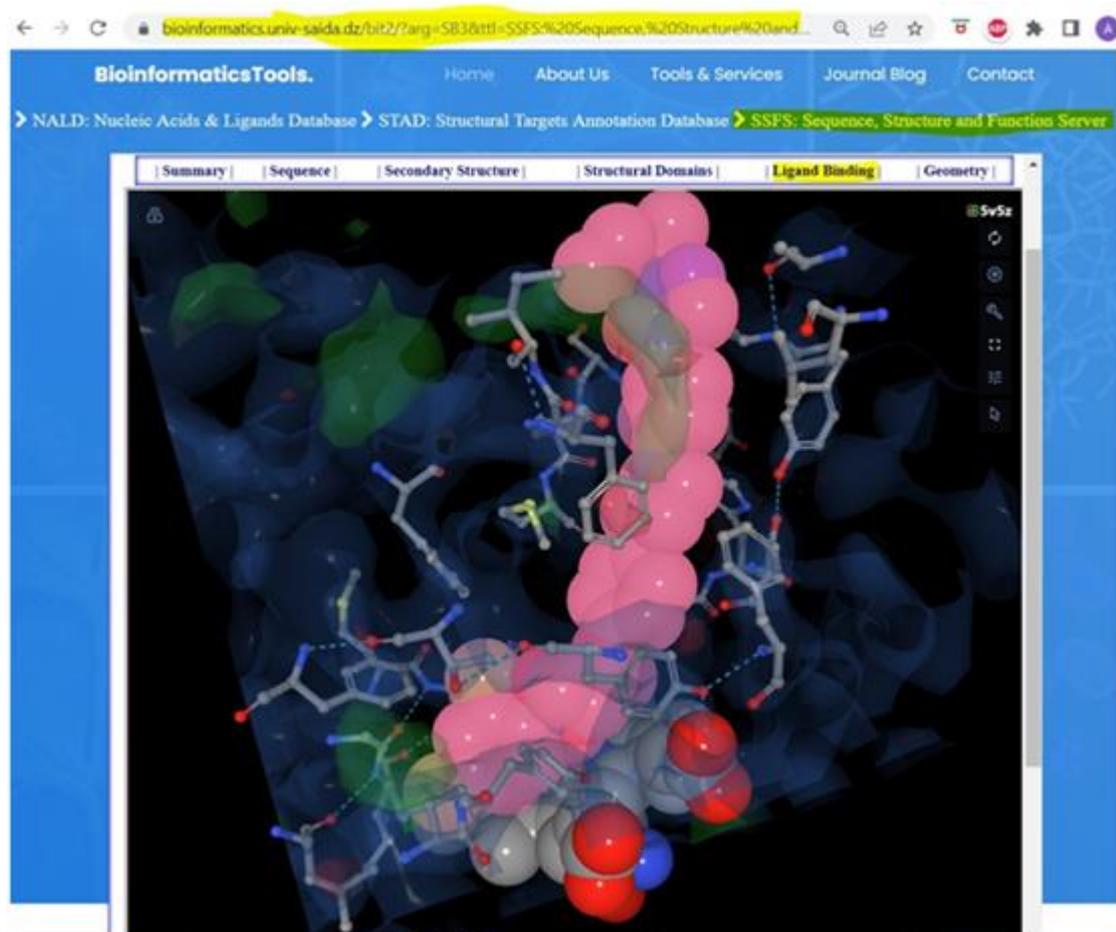


Figure 51 : En rose, l'inhibiteur 1YN est entouré de résidus de site de liaison. Le groupe Heme, laissé en couleur par type d'atome (cpk), de l'enzyme CYP51 est fortement lié à l'anneau triazole de l'inhibiteur.

Les tableaux générés dans les images ci-dessus donnent des détails sur les types de liaisons et de contacts non liés trouvés entre l'inhibiteur 1YN et les éléments de structure secondaire (et les boucles possibles) de l'enzyme CYP51.

Ligand ID	Chain	Residue No.	Full Name	Formula (Charge)	Explore Site	Ligand Chemistry
HEM	A	601	PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE	C34 H32 FE N4 O4	Environment	HEM
1YN	A	602	2-[(2R)-BUTAN-2-YL]-4-{4-[4-(4-[(2R,4S)-2-(2,4-DICHLOROPHENYL)-2-(1H-1,2,4-TRIAZOL-1-YLMETHYL)-1,3-DIOXOLAN-4-YLMETHOXY]PHENYL)PIPERAZIN-1-YL]PHENYL}-2,4-DIHYDRO-3H-1,2,4-TRIAZOL-3-ONE	C35 H38 CL2 N8 O4	Environment	1YN

Figure 52: Liste des ligands liés à l'enzyme; inhibiteur 1YN et groupe prothétique Heme (HEM). Cliquer sur le lien « Environnement » génère le tableau détaillé vu dans cette image

Protein or NA Residues		Ligand		Bonds			
Chain	SSelm	Name	Number	Atom	Distance/Å	Possible Bond Type	
A	60-65 H: 1	ALA	61	O	A 1YN 602 C09	3.47	van der Waals
A	60-65 H: 1	ALA	61	O	A 1YN 602 N10	3.31	H.Bond
A	60-65 H: 1	GLY	65	CA	A 1YN 602 N08	3.87	
A	60-65 H: 1	GLY	65	CA	A 1YN 602 C09	3.97	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CG	A 1YN 602 C30	3.95	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CG	A 1YN 602 C32	3.95	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CD1	A 1YN 602 C27	3.93	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CD1	A 1YN 602 C30	3.93	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CD2	A 1YN 602 C30	3.64	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CD2	A 1YN 602 C31	3.53	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CD2	A 1YN 602 C32	3.8	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CE1	A 1YN 602 C27	3.39	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CE1	A 1YN 602 C30	3.63	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CE2	A 1YN 602 C30	3.32	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CE2	A 1YN 602 C31	3.54	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CZ	A 1YN 602 C27	3.9	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	CZ	A 1YN 602 C30	3.31	van der Waals
A	114-127 H: 1	TYR	118	OH	A 1YN 602 C30	3.81	van der Waals
A	114-127 H: 1	THR	122	CG2	A 1YN 602 C32	3.98	van der Waals
A	114-127 H: 1	PHE	126	CE2	A 1YN 602 C44	3.98	van der Waals
A	114-127 H: 1	PHE	126	CZ	A 1YN 602 CL9	3.83	van der Waals
A	No SSE	ILE	131	CG1	A 1YN 602 CL8	3.86	van der Waals
A	No SSE	ILE	131	CG2	A 1YN 602 C45	3.92	van der Waals

Figure 53: Détails des types de liaisons et de contacts non liés trouvés entre l'inhibiteur 1YN et les éléments de structure secondaire (et les boucles possibles) de l'enzyme. La liste n'est pas citée dans cette image, mais les utilisateurs du SSFS peuvent faire défiler la liste et même enregistrer l'ensemble de la table.

Comme on le voit clairement ci-dessus, tous les composés extraits, données fournies dans les sections A et B, sont assez courts et ne possèdent pas les fonctions chimiques triazole/azole qui ont été associées à des inhibiteurs connus du CYP51 et à la liaison du groupe hémique prothétique.

Le lanostérol, substrat naturel, et les médicaments/inhibiteurs connus de l'enzyme CYP51 sont au moins trois molécules annelées ayant une fonction triazole/azole.

Les molécules courtes comme celles extraites de l'huile essentielle, dans ce projet, ne peuvent pas faire une forte liaison avec la grande poche de liaison allongée de l'enzyme CYP51 et donc l'étude d'arrimage est futile sur eux pour cette enzyme.

# **PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

## Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'objectif de notre travail consiste à faire une étude biologique de l'activité antifongique de *Ammaudocus leucotrochus* et de *Cinnamomum cassia* (les huiles essentielles et les extraits éthanoliques) vis-à-vis des isolats de *Candida albicans*.

Les valeurs du rendement des huiles essentielles d'*Ammaudocus leucotrochus* et de *Cinnamomum cassia* étaient de 0.43% et 0.44%, respectivement. Cependant, les rendements des deux extraits éthanoliques obtenu par macération et Soxhlet étaient de 15.05% et 20.5% (macération) et de 12% et 5.6% (Soxhlet), respectivement. Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus il apparaît que l'activité biologique des extraits *Cinamomum cassia* est caractérisée par un fort pouvoir antifongique vis-à-vis les souches pathogènes de *Candida albicans*. Les résultats ont indiqué que l'extrait éthanolique de *Ammaudocus leucotrochus* ne possède aucune activité antifongique contre les souches étudiées

L'activité antifongique des deux huiles essentielles (d'*Ammaudocus leucotrochus* et de *Cinnamomum cassia*) a montré une efficacité contre les souches testées. L'aptitude des huiles à inhiber la croissance des levures de *Candida albicans* est tout à fait différente ; cela est marqué par l'activité puissante de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia* par rapport à l'huile *Ammaudocus leucotrochus*. En raison de leurs activité antifongique, l'huile essentielle et les extraits du deux plantes étudiées possédait un très bon potentiel antifongique et peuvent être utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la production de nouveaux agents synthétiques dans le traitement des candidoses.

Depuis que nous avons prouvé l'activité antifongique des huiles essentielles in vitro, nous avons essayé de prouver qu'il se passait quelque chose au niveau moléculaire. Nous avons donc utilisé la bioinformatique pour avoir une idée si les composant de l'huile d'*Ammaudocus leucotrochus* ont un pouvoir inhibiteur de lanostérol 14C-déméthylase qui est l'enzyme clé de la biosynthèse de l'ergostérol comme les azolés l'inhiber. Nous avons

---

donc ouvert de nouveaux horizons à de nombreuses questions conduisant à des meilleurs résultats.

---

**Références bibliographiques**

- National Library of Medicine. (2021). Consulté le 14 03, 2022, sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/21>
- Almeida, F. e. (2019). the still underestimated problem of fungal diseases worldwide . *Front. Microbiol.* 10, 214.
- Barros, P. P. (2018). *Candida tropicalis* affects the virulence profile of *Candida albicans*: an in vitro and in vivo study. *Pathogens and disease*.
- Berman, J. (2012). . *Candida albicans*. *Current biology*, 22(16), R620-R622.
- Bertrand, B. (2007). *Spécificité antigénique de l'Als3p de Candida albicans et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte.*
- Beucher., B. (2007). *Spécificité antigénique de l'Als3p de Candida albicans et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte.*
- Bongomin, F. e. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi (Basel)* 3, 57.
- Bruchlen., D. (2016). *Candida albicans ribosome : structure, function, and inhibition. .*
- Candida Genome Database* . (s.d.). Consulté le 02 11, 2022, sur <http://www.candidagenome.org/>
- Caraës., N. (2016). *Épidémiologie des candidoses profondes au Centre Hospitalier* .
- Christina Tsui et al, †. E.-R. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *journals investing in science*.
- Cornu., A. (2010). Etude des gènes de la famille IFF dans les interactions de *C. albicans* avec son hôte. *Biologie moléculaire. AgroParisTech*.
- David, B. (2016). *Structure, fonction et inhibition du ribosome de Candida albicans* .

- DECHAMPS, L. e. (2016). Analyse de l'ergostérol dans des cultures fongiques par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. *Revue Scientifique des Ingénieurs Industriels* n°30.
- Edet. (2004).
- El Kirat, S. (2010). (2010). *Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions Candida-phagocytes; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez C. lusitaniae.*
- Fisher et al, M. G. (2020). Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. *mBio* 11,e00449–20.
- Florent MORIO et Patrice LE PAPE. (2014). Résistance de candida spp .aux antifongiques .
- Frédéric, B. (2013). *Les candidoses buccales: revue de littérature.* Genève.
- Garnaud., C. (2017). *Tolérance et résistance aux antifongiques chez Candida spp. : caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques.*
- Garnaud., C. (2017). *Tolérance et résistance aux antifongiques chez Candida spp. : caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie.*
- Gauthier. (2007).
- Gauthier, C. (2007).
- Gauthier, C. (2007). *Étude structure-fonction des transporteurs ABC de Candida albicans impliqués dans la résistance aux agents antifongiques.*
- Gigou-Cornet. (2006).
- Kali R. Iyer, Nicole Robbins, et Leah E. Cowen. (2022). The role of Candida albicans stress response pathways in antifungal tolerance and resistance. *iScience* 25, 103953.
- KHALDI. (2017).
- Kullberg, B.J., and Arendrup, M.C. . (2015). Invasive candidiasis. *New Engl. J. Med.* 373,1445–1456.

Laguerre. (2015).

M. J. McCullough, B. C. (1996). Candida albicans: a review of its history epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*.

R. Pereira et al, R. d. (2020). Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Robbins, N. C. (2017). Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 753–775.

Vandeputte, P. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*.

Youcef-Ali, M. (2014). Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides.

Zahia Boucherit-Otmani, D. M. (2013). Antifungal activity of different extracts of the bark of *Cinnamomum cassia* used in traditional medicine. *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*, Volume 8, N°32.

Amandine Cornu. Etude des gènes de la famille IFF dans les interactions de *C. albicans* avec son hôte. *Biologie moléculaire*. AgroParisTech, 2010.

Al-Samydai, A., Al-Mamoori, F., Shehadeh, M., & Hudaib, M. (2018). Anti-Diabetic Activity of Cinnamon: A Review. *International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, 1(5), 43-45.

Barros, P. P., Rossoni, R. D., Freire, F., Ribeiro, F. D. C., Lopes, L. A. D. C., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2018). *Candida tropicalis* affects the virulence profile of *Candida albicans*: an in vitro and in vivo study. *Pathogens and disease*, 76(2), fty014.

Berman, J. (2012). *Candida albicans*. *Current biology*, 22(16), R620-R622.

Bertrand Beucher. Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte. *Biologie cellulaire*. Université d'Angers, 2007. Français. fftel-00346346f.

BORN, Frédéric. *Les candidoses buccales: revue de littérature*. Thèse de doctorat : Univ. Genève, 2013, no. Méd. dent. 714.

Cécile Garnaud. Tolérance et résistance aux antifongiques chez *Candida* spp. : caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. ffNNT : 2017GREAS004ff. fftel-02092298ff .

David Bruchlen. *Candida albicans* ribosome : structure, function, and inhibition. Structural Biology[q-bio.BM]. Université de Strasbourg, 2016. English. ffNNT : 2016STRAJ111ff. fftel-01587774ff.

El-Haci, I. A., Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Mazari, W., Gherib, M., Bighelli, A., ... & Tomi, F. (2014). Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algerian Sahara. *Natural product communications*, 9(5), 1934578X1400900533.

El Kirat, S. (2010). Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida*-phagocytes; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *C. lusitaniae* (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).

Fabienne Edet. La cannelle de Ceylan et ses activités biologiques. Sciences pharmaceutiques. 2004.ffdumas-01225087ff

Gauthier, C. (2007). Étude structure-fonction des transporteurs ABC de *Candida albicans* impliqués dans la résistance aux agents antifongiques.

Idm'hand, E., Msanda, F., & Cherifi, K. (2020). Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Ammodaucus leucotrichus*. *Clinical Phytoscience*, 6(1), 1-8.

KHALDI, A. (2017). Etude des effets antifongiques et antimycotoxiques des extraits des plantes médicinales de la région de Béchar.

Landoulsi, A., Roumy, V., Rivière, C., Sahpaz, S., Benhamida, J., & Hennebelle, T. (2018). Composition chimique et activités pharmacologiques des espèces tunisiennes du genre *Eryngium* L.(Apiaceae).

Manssouri, M., Ansari, A., Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., & Costa, J. (2020). Phytochemical analysis and comparative study of volatile compounds of

Aaronsohnia pubescens subsp. pubescens aerial parts using hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). *J. Mater. Environ. Sci*, 11(10), 1574-1583

Naima, B., Abdelkrim, R., Ouarda, B., Salah, N. N., & Larbi, B. A. M. (2019). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of essential oil from *Ammodaucus leucotrichus* Cosson & Durieu (Apiaceae) growing in South Algeria. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 33(3), 541-549.

Murielle Gigou-Cornet. Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. Biochimie [q-bio.BM]. INAPG (AgroParisTech), 2006. Français. ffnnt : 2006INAP0037ff. fftel-00143611ff

Nicolas Caraës. Épidémiologie des candidoses profondes au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. Sciences pharmaceutiques. 2016. ffdumas-01323570ff.

Patrick Vandeputte. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Interactions entre organismes. Université d'Angers, 2008. Français. fftel-00433842ff

Virginie Laguerre. Huiles essentielles et 1,8-cinéole. Sciences pharmaceutiques. 2015. ffhal-01770640ff

Yucef-Ali, M. (2014). Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides

Zaidi, S. F., Aziz, M., Muhammad, J. S., & Kadowaki, M. (2015). Diverse pharmacological properties of *Cinnamomum cassia*: A review. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28(4).

Boucherit-Atmani, Z., Merghache, D., Merghache, S., & Boucherit, K. (2013). Antifungal activity of different extracts of the bark of *Cinnamomum cassia* used in traditional medicine. *Les technologies de laboratoire*, 8(32).

Li, Y. Q., Kong, D. X., & Wu, H. (2013). Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 41, 269-278.

Mehmood, M. A., Sehar, U., & Ahmad, N. (2014). Use of bioinformatics tools in different spheres of life sciences. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 5(2), 1.

# **PARTIE VI. ANNEXES**

---

## VI.1. Annexe 1

### Préparation d'un bouillon sabouraud :

- 1,5 g d'extrait de levure.
- 5 g peptone de caseine.
- 10 g glucose.
- Ph=5,8.
- 500 ml d'eau distillée.

### Préparation d'une Gélose sabouraud :

- 1,5 g d'extrait de levure.
- 5 g peptone de caseine.
- 10 g glucose.
- 20g agar-agar.
- Ph=5,8.
- 500 ml d'eau distillée.



Figure : préparation d'un milieu de culture bouillon sabouraud

**Préparation d'une Gélose Mueller Hinton :**

- 10g Glucose
- 10.5g Muller Hinton.
- 20g Agar
- 0.5 ml Bleu de méthylène.
- 1 Léau distillée.
- Ph=5,8

**Tableau 01:** caractéristiques physico-chimiques des produits utilisés au cours de l'expérimentation.

Produit	Forme	Formule Chimique	Caractéristiques Masse molaire (g/mol)	Pureté (%)
Ethanol	Liquide	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	46 g/mol	96
DMSO	Liquide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	78,133	/
Eau physiologique	Liquide	Na Cl	/	/
Ether de pétrole	/	/	/	95

**Les cycles de L'extraction par Soxhlet :**

Les cycles	La durée de La plante1 : cannelle	La durée de La plante2 : <i>Ammadocus leucotrichus</i>
1 <sup>er</sup> cycle	25 min	25 min
2eme cycle	15 min	9 min
3eme cycle	10 min	9 min
4eme cycle	10 min	9 min
5eme cycle	10 min	9 min
6eme cycle	09 min	9 min
7eme cycle	06 min	6 min

VI.2. Annexe02 : n'observation microscopique des souches de candida albicans





**VI.3. Annexe :03****Détermination de Culot cellulaire de chaque souche :**

	Souche ATTC		Souche A7		Souche A11		Souche a10	
	HA	HC	HA	HC	HA	HC	HA	HC
Poids des tubes vide	21,58g	21,30g	21,58g	21,56g	21,43g	26,8g	21,51g	21,63g
Poids des tubes remplié	21,79g	21,49g	21,79g	21,73g	21,64g	27,07g	21,80g	21,83g
Culot cellulaire	0,21g	0,19g	0,21g	0,17g	0,21g	0,27g	0,29g	0,2g