



UNIVERSITE de TLEMCCEN



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

**Département : Biologie**

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à  
l'Environnement « LAMAABE »

**MEMOIRE**

**Présenté par**

**Melle *BERRAHOU Imene***

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie**

**Option : Microbiologie**

**Thème**

**Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur *Candida albicans***

Soutenu le 28/06/2016 devant le jury composé de :

<b>Présidente :</b> Mme BOUBLENTZA Lamia	<b>Maître de conférences</b>	<b>Université de Tlemcen</b>
<b>Encadreur :</b> Mr KHADIR Abdelmounaim	<b>Maître assistant</b>	<b>Université d'Oran</b>
<b>Examineur :</b> Mr BENDAHOU Mourad	<b>Professeur</b>	<b>Université de Tlemcen</b>

**2015/2016**



## *Dédicaces*

**Avec l'aide d'ALLAH, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :**

**Mon cher père qui m'a pousser toujours devant et m'a appris l'optimisme pendant tous les conditions.**

**Ma chère mère pour leur encouragement, leur soutien et leur tendresse.**

**Mes chers frères : Toufik, Aissa et Moulay Walid.**

**Ma grand-mère**

**Mon grand-père**

**Mes tantes et mes cousines.**

**Ma grande famille.**

**Toutes la famille BERRAHOU et BAHBAH.**

**A mes amis(es) et mes camarades.**

**A toutes la promotion de Microbiologie 2015/2016**

**A toutes la promotion de Biologie 2011/2016.**

**A tous personne qui m'a aider de pris ou de loin.**

**Optimista Imene**



## Remerciement

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mon promoteur Monsieur KHADIR Abdelmounaim maître assistant à l'université d'Oran 1 , Ahmed Ben Bala, qui a su, à sa façon, me conseiller et m'orienter tout au long de la réalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements et mes respects à madame BOUBLENZIA Lamia maître de conférences à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur BENDAHOU Mourad professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen (laboratoire LAMAABE) pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie également tous les doctorants de LAMAABE, laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédicale et à l'environnement (université ABOU BEKR BELKAID (ABB) de Tlemcen en particulier Melle Medjahdi Khadidja et Mr Benamer Ibrahim.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Sommaire

Introduction.....	1
Partie I. Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : <i>Candida albicans</i> .....	3
1. Description général sur l'espèce <i>Candida albicans</i> .....	3
2. Habitat.....	3
3. Forme et morphologie .....	3
4. Reproduction .....	5
5. Caractères biologiques et physiologiques.....	6
7.Systématique .....	7
8.Structure cellulaire .....	7
9. Pathogénicité et Facteurs de virulence :.....	8
10. Les infections .....	9
11. Les molécules antifongiques .....	10
11.3.1-Le kétoconazole .....	11
12. Résistance de <i>Candida albicans</i> aux antifongiques .....	12
CHAPITRE 2 : Les produits naturels et recherche d'antibiotique .....	13
1. L'intérêt de la recherche des substances antimicrobiennes d'origine naturelles.....	13
2. Produit naturelle et activité antibactérienne .....	13
3-Recherche de substances naturelles anti <i>candida albicans</i> .....	14
4-Les huiles essentielles et leurs activités antimicrobiennes .....	15
5-Combinaison des HE avec des substances antifongiques.....	17
6-Les plantes utilisées.....	17
1- <i>Origanum glandulosum</i> .....	17
2- <i>Thymus fontanesii</i> .....	18
3- <i>Ammoides verticillata</i> .....	19
4- <i>Daucus crinitus</i> .....	21
Partie 2 Matériels et méthodes .....	25
1. Matériels utilisés.....	26
2. Provenances des souches.....	26
3. Coloration du <i>Candida albicans</i> .....	26
4. Aspect des colonies.....	27
5. Récolte du matériel végétal.....	27
6. L'extraction des huiles essentielles.....	27
7. Etude du pouvoir antimicrobien .....	28
7.2. Méthode de disque (Vincent) .....	28
7.3. Méthode de microplaque à 96 puits .....	28
7.4. Détermination du CMI des HEs et du Kétoconazole vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .....	30
7.5. Détermination de la CMI des HEs et du Kétoconazole combinés .....	30
Partie III Résultats et discussion.....	32
1. Aspect des colonies .....	33
2-Observation microscopique.....	33
3. Résultat de l'activité antifongique des huiles essentielles et du kétoconazole .....	33
4. Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	36
Conclusion générale .....	41
Références bibliographiques.....	43
Annexe	

### Liste des abréviations :

*C.albicans* : *Candida albicans*

Ca : *Candida albicans*

nm : nanomètre

ml : millilitre

mm : millimètre

µl : microlitre

µg : microgramme

l : litre

Ø : diamètre

C° : degré Celsius

CMI : concentration minimale inhibitrice

D.O : densité optique

DMSO : diméthyle Sulfoxyde

h : heure

HE : huile essentielle

Ktz : kétoconazole

SM : solution mère

UFC : Unité Formant Colonie

HD : hydrodistillation

LAMAAB : Laboratoire de microbiologie appliqué à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement

*O.glandulosum* : *Origanum glandulosum*

*T. fontanesii* : *Thymus fontanesii*

*A.verticillata* : *Ammoïdes verticillata*

ICFI : Index de la concentration Fractionnelle inhibitrice

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Différentes morphologie de <i>C.albicans</i> .....	4
<b>Figure 2</b> : Les loci MTL de <i>candida albicans</i> (9 kb).....	5
<b>Figure 3</b> : Organisation moléculaire de la paroi de <i>Candida albicans</i> .....	8
<b>Figure 4</b> : Cibles des déférents antifongiques.....	10
<b>Figure 5</b> : Structure du Kétoconazole.....	11
<b>Figure 6</b> : <i>Origanum glandulosum</i> .....	17
<b>Figure 7</b> : <i>Thymus fontanesii</i> .....	19
<b>Figure 8</b> : <i>Ammoïdes verticillata</i> .....	20
<b>Figure 9</b> : <i>Daucus crinitus</i> .....	21
<b>Figure 10</b> : Extraction des HEs par hydrodistillation.....	25
<b>Figure 11</b> : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boite de Pétri.....	26
<b>Figure 12</b> : Aspect des colonies du <i>Candida albicans</i> .....	33
<b>Figure 13</b> Observation microscopique du <i>Candida albicans</i> sous un microscope optique.....	33
<b>Figure 14</b> : Diamètres d'inhibition en mm par les quatre HEs el le Ktz.....	34
<b>Figure 15</b> : Les zones d'inhibitions de déférents HEs testés .....	35
<b>Figure 16</b> : Zone d'inhibition du kétoconazole.....	36
<b>Figure 17</b> :CMI des huiles essentiels et du Ktz pour les deux souches.....	37

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : quelques exemples de grandes classes de composés antimicrobiens provenant des plantes médicinales.....	13
<b>Tableau 2</b> : Les résultats des CMI des HEs et du Ktz.....	37
<b>Tableau 3</b> : CMI de l'HE de <i>Thymus fontanesii</i> et du Ktz combinés.....	38
<b>Tableau 4</b> : CMI de la combinaison du <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis du Ktz.....	38
<b>Tableau 5</b> : CMI de l'HE de <i>Daucus crinitus</i> et du Ktz combinés .....	39
<b>Tableau 6</b> : Index de concentration fractionnelle de l'HE de <i>Daucus crinitus</i> et du Ktz.....	40



# **Introduction**

# *Introduction*

### Introduction :

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

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

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

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

Ce travail a pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne de quatre huiles essentielles issues de plantes médicinales de l'Ouest algérien : *Origanum glandulosum* , *Thymus fontanesii*,

*Ammoïde verticillata*, *Daucus crinitus* contre deux souches de références de *Candida albicans* ainsi que d'étudier des combinaisons d'huiles essentielles avec des antifongiques tels que le Kétoconazole.

# **Synthèse**

# **Bibliographique**

## Chapitre1 : *Candida albicans*

### 1. Description général sur l'espèce *Candida albicans* :

Le genre *Candida* apparaît actuellement comme un groupe complexe, hétérogène des levures.

Une dizaine d'espèces sont habituellement rencontrées en pathologie, principalement *Candida albicans* qui est en cause de 70- 80 % des cas et un moindre degré *C.tropicalis* , *C.pseudotropicalis* , *C.Krusie* , *C.parapsilosis* (**Bouchet et al, 1989**).

*Candida albicans* est une levure polymorphique commensale qui peut entraîner des infections sévères particulièrement chez les patients immunodéprimés. Ce champignon possède ou peut exprimer plusieurs facteurs de pathogénicité (**Marot-Leblond et al, 1993**)

En milieu hospitalier, la levure *Candida albicans* représente la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique (**Raoult, 1998**).

### 2. Habitat :

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

### 3. Forme et morphologie :

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

*Candida albicans* a une capacité de croître sous des formes morphologique varies (figure 01) (**Kumamoto et Vines, 2005**) :

#### a. Les blastospores ou blastoconidies :

C'est la forme la plus courante de multiplication de *C. albicans*.

Elles se présentent sous forme de petites cellules ovoïdes de 3,5 à 6 micromètres sur 6 à 10 micromètres. Cette cellule peut émettre un bourgeon qui donnera une cellule fille identique à la cellule mère (**Guignard et al, 1989**)

**b. Pseudo –mycélium :**

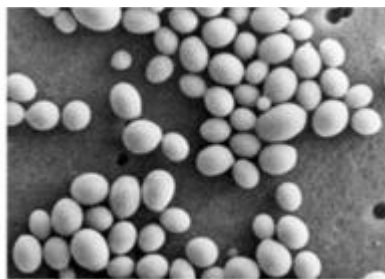
Il se forme par croissance tubulaire à partir du blastospore mesurant de 500 à 600  $\mu$  m de longueur et de 3 à 5  $\mu$  m de largeur (**Bouchet et al, 1989**).

**c. Le mycélium:**

Il s'agit de blastospore qui a donné naissance à un tube germinatif pour former un vrai mycélium (**Senet et Robert, 1995**).

**d. Chlamydospores :**

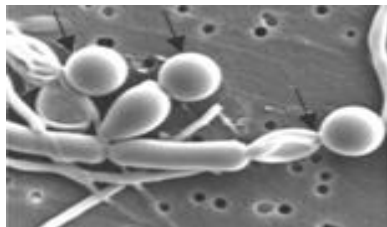
Les chlamydospores sont des structures terminales ou latérales arrondies, mesurent deux fois la taille du blastospore et possèdent une paroi plus épaisse (**Coste et al, 2002**)



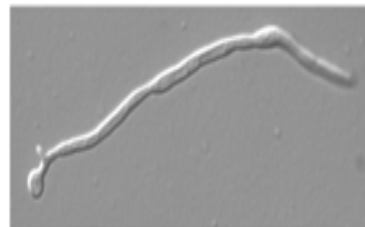
Blastospore



Pseudo-hyphe



Chlamydospore



Hyphe

**Figure 01 : Différentes morphologies de *C.albicans* (C.Munro;**

**Aberdeen University, Ecosse)**

## 4. Reproduction :

### 4.1. Reproduction asexuée

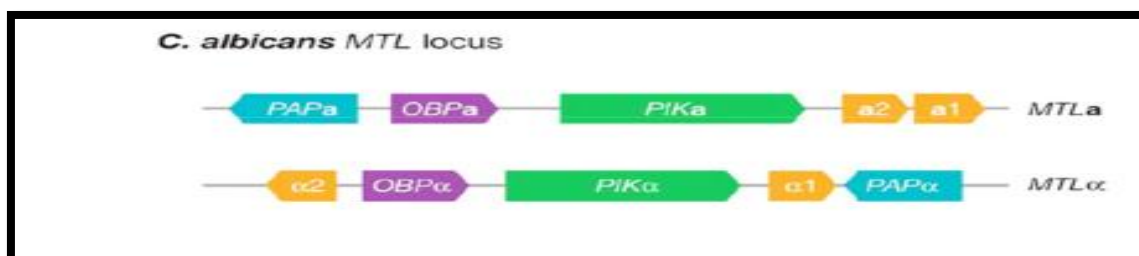
Le mode de multiplication de *C. albicans* est principalement de type asexué. La multiplication est assurée par bourgeonnement de la blastospore à un pôle particulier de la cellule, donnant naissance, après division du noyau par simple mitose et septation de la cellule, à une blastospore fille qui se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

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

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

### 4.2. Reproduction sexuée :

Contrairement à la plupart des levures, *C. albicans* est un organisme diploïde pour lequel aucune phase haploïde n'a été observée. Le découvert en 1999 de l'existence d'un locus MLT (Mating-Type Like) chez *C. albicans* (figure 2), a remis en question le mode de reproduction de cette levure qu'avait toujours été décrite comme asexuée (**Hull et Johnson, 1999**). Le génome de *C. albicans* semble contenir les gènes nécessaires à la reproduction sexuée des champignons.



**Figure 2:** Les loci MTL de *Candida albicans* (9 kb). Issu de Bennet et Johnson (**Bennet and Jhonson , 2005**).

## **5-Caractères biologiques et physiologiques de *Candida albicans* :**

### **5.1. Milieu de vie :**

Toutes les espèces du genre *Candida* sont aérobies.

### **5.2. pH :**

La croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7.

### **5.3. Température :**

Croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures.

### **5.4. Caractères physiologiques :**

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

- Elle est incapable de réduire les sels de tétrazolium et de les transformer en un composé coloré (la colonie restera blanche).

- *C. albicans* n'élabore pas d'uréase.

- *C. albicans* produit une protéase kératolytique, capable de digérer la couche cornée de l'épiderme, d'où la pathogénicité du champignon lorsqu'il est présent à la surface de la peau (**Segretain et al, 1987**).

## **6. Milieux de culture :**

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

**6.1. Milieux riches :** sérum humain ou animal (*Candida albicans* est la seule espèce du *Candida* à donner en 3 heures à 37 °C, un court filament ou tube germinatif (test de blastèse) (**Bouchet et al, 1989**).

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

### **6.2. Colonies :**



En culture, l'aspect macroscopique de *C.albicans* est celui d'une colonie blanche à crème, lisse et crémeuse, à bords nets. (Morio, 2012).

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

Règne : Eumycota

Phylum : Ascomycota

Sous embranchement : Saccharomycota

Classe : Saccharomycètes

Famille : Saccharomycetaceae

Genre : Candida

Espèce : *Candida albicans*

### **8- Structure cellulaire :**

*C. albicans* possède tous les organites intracellulaires caractéristiques des eucaryotes : un noyau, délimité par une double membrane nucléaire, et renfermant huit chromosomes, un nucléole ; un réticulum endoplasmique (Chu et al, 1993), une membrane plasmique est recouverte d'une paroi qui donne à la levure sa forme et sa stabilité mécanique.

#### **8.1. La paroi :**

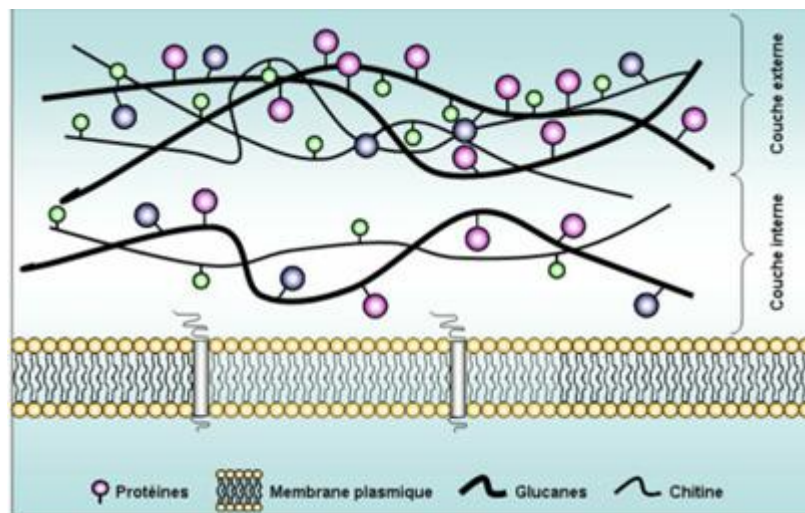
*C.albicans* possède une paroi qui exerce des fonctions essentielles telles que la protection contre les stresses physiques extérieurs et contre la lyse de la cellule par turgescence. De plus, cette structure rigide est dotée d'une grande plasticité ce qui permet à la cellule de se maintenir sous différentes morphologies.

La paroi de *C. albicans* (figure 3) est une structure en perpétuelle évolution d'environ un cinquième de micron d'épaisseur protégeant la cellule, lui conférant sa forme et par laquelle passe la majorité des régulations avec l'hôte. La couche interne de la paroi est constituée principalement de polysaccharides :  $\beta$  -glucanes (Ils comptent pour 50-60 % de la masse totale de la paroi) (Ruiz-Herrera et al, 2006) et chitine (composant mineur de paroi) qu'est un polysaccharide linéaire fait de plus de 2 000 unités de N-acétylglucosamine (Reiss et al, 1992).

La couche externe de la paroi est constituée en grande partie de différents types de mannoprotéines se sont nombreuses à la surface de la paroi de *C. albicans*, ainsi qu'au niveau de la cicatrice de bourgeonnement (Horisberger et al, 1988), (Ruiz-Herrera et al, 2006).

La paroi contient également un certain nombre de protéines (6-25 %) ayant une activité enzymatique. En particulier la N-acétylglucosamidase, la phosphatase acide, la protéinase, la glucanase et la chitinase (Poulain et al, 1995).

La paroi contient aussi des lipides qui représentent que 5 à 17 % du poids total de la paroi, la présence de phospholipides, de triglycérides et de stérols libres ou estérifiés a ainsi été observée. Un lipide intéressant de la paroi de *C. albicans* est le phospholipomannane (Mille et al, 2004)



**Figure 3** : Organisation moléculaire de la paroi de *Candida albicans* (Ruiz-Herrera, FEMS Yeast Res, 2006)

### 9. Pathogénicité et Facteurs de virulence :

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

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

- a) **Le dimorphisme** : elle est capable d'échanger entre deux morphologies principales : cellule blastospore de levure et des cellules hyphes (Walther et Wendland, 2008).
- b) **L'adhérence à l'hôte** : elle peut se faire au niveau des muqueuses (adhésines) (Hoyer et al, 1998). Elle peut se faire aussi à partir de la formation de biofilm à l'occasion d'un traumatisme de façon iatrogène ou chirurgicale par l'introduction de matières plastiques telles que les cathéters et les sondes urinaires.

c) **Sécrétion d'enzymes** : la sécrétion d'enzyme hydrolytique au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires (**Schaller et al, 2005**). Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps) (**Monod et Borg-von ,2002**), des phospholipases (**Ghannoum, 2000**) et des lipases (**Fu et al, 1997**).

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

## **10- Les infections :**

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

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

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

### **10-1 Les candidoses :**

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

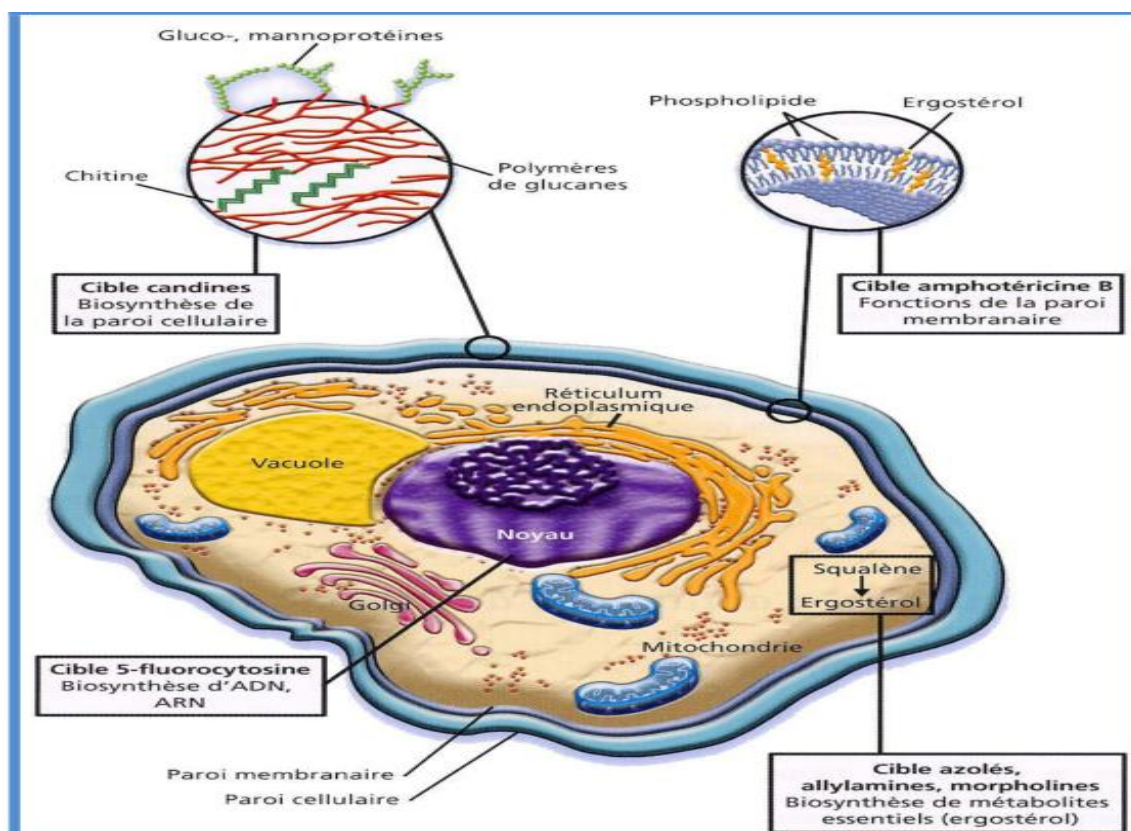
Il existe différents types de candidose : les candidoses digestives, qui regroupent les candidoses buccales, oropharyngées, oesophagiennes et gastro-intestinales, les candidoses vaginales, les candidoses cutanées et les onychomycoses (pathologies de l'ongle) (**Odds, 1987; Jarvis, 1995; Elewski, 1998; Mathews et al, 2002**).

### **10 -2 Les infections nosocomiales :**

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

## 11- Les molécules antifongiques :

Les antifongiques comprennent un groupe important et diversifié de médicaments utilisés pour traiter les infections fongiques. Les antifongiques doivent pénétrer dans la cellule fongique intacte et se fixent sur ses cibles pour perturber le fonctionnement cellulaire et parvenir à un effet fongistatique (figure04) (Ghannoum et Rice, 1999). Leur mécanisme d'action varie, ils inhibent la membrane fongique et la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse de l'acide nucléique, les microtubules et inhibent aussi les altérations des membranes fongiques) (Niimi et al ,2010)



**Figure04** : Cibles des différents antifongiques (Hulin et al, 2005)

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

### 11-1. Les polyènes

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

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

### 11-2. Les échinocandines

Les échinocandines sont des métabolites fongiques secondaires. Elles sont constituées d'un hexapeptide cyclique avec des chaînes aliphatiques de différentes tailles (**Turner et al, 1997**).  
Les échinocandines se différencient des autres antifongiques par leur mode d'action original. En effet, elles inhibent la synthèse de la paroi fongique (**Odds, 2003**)

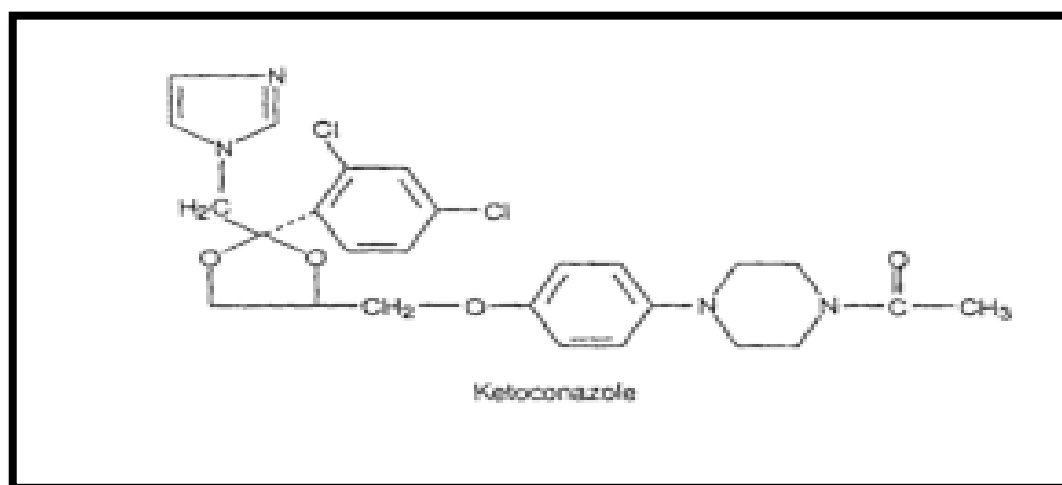
### 11-3. Les dérivés azolés :

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

#### 11.3.1-Le kétoconazole :

##### A. Définition :

Le kétoconazole est un antifongique imidazole caractérisé par la présence d'un noyau azolé (Figure 5), il est lipophile, pratiquement insoluble dans l'eau (**Winnicka et al, 2012**), soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol, DMSO, DMF (diméthyl formamide) (**Rotstein, 1992**). Sa formule chimique est :  $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$  (**Waugh, 2008**).



**Figure 5** : structure du Kétoconazole (**Perry et al, 2003**)

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

L'efficacité du kétoconazole est limité dans le traitement de la méningite et faible pour les patients immunodeprimés ((Odds 2003)

### **B.Mécanisme d'action :**

Il bloque l'activité d'enzyme lanostérol 14 $\alpha$ -demethylase(cytochrome).Il inhibe la biosynthèse du l'ergostérol qu' est nécessaire à la formation du membrane fongique(Odds, 2003).

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

### **12- Résistance de *Candida albicans* aux antifongiques :**

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

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

(Coste et al, 2007).

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

## CHAPITRE 2 : Les produits naturels et recherche d'antibiotiques

### 1-L'intérêt de la recherche des substances antimicrobiennes d'origine naturelles :

La recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est devenue une nécessité. Les composés qui présentent des activités biologiques et qui sont dérivés de sources naturelles, par exemple, les plantes, les animaux et les microorganismes sont définis comme étant des produits naturels (Baker et al, 2007).

Les produits naturels d'origine végétale constituent une source importante de molécules thérapeutiques à activité antimicrobienne utilisées depuis l'antiquité, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les huiles essentielles (Cowan, 1999).

L'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et antioxydant. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (Bruneton, 1999; Teuscher et al, 2005).

### 2-Produit naturelle et activité antibactérienne :

Les recherches actuelles sur les molécules antimicrobiennes d'origine naturelle se concentrent principalement sur les plantes, car ils peuvent être achetés plus facilement et seront sélectionnés sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle (Verpoorte et al, 2005).

La plupart des substances synthétiser par les plantes ayant des activités inhibitrices des microorganismes sont des métabolites secondaires (Cowan, 1999)

Les virus sont généralement sensibles aux molécules aromatiques. (Zhiri, 2006)

**Tableau : Quelques exemples de grandes classes de composés antimicrobiens provenant des plantes médicinales (Cowan, 1999)**

Classe	Exemple	Mécanisme d'action
Les composés phénoliques	phénols simples (épicatéchine) Quinones (hypéricine)	privation de Substrat  Lier aux adhésines, forme un complexe avec la paroi cellulaire, inactiver les enzymes

	Les flavonoïdes (Chrysin)  Coumarines (warfarine)	Lier aux adhésines, forme un complexe avec la paroi cellulaire, inactiver les enzymes  Interaction avec l'ADN eucaryote (activité antivirale)
Terpènes, les huiles essentielles	(Carvacrol)	rupture de la membrane
Alcaloïdes -	(Berberine) (La pipérine)	S'intercaler dans la paroi cellulaire et / ou de l'ADN

### 3-Recherche de substances naturelles anti *Candida albicans* :

Il existe beaucoup de recherches et de travaux qui montrent l'effet des huiles essentielles extraites à partir de différents espèces des végétaux avec une activité remarquable anti *Candida albicans*.

En effet, les huiles essentielles de la famille lamiacées et les molécules phénoliques possède une activité forte vis-à-vis *C. albicans* (Dorman et Deans, 2000; Tepe et al, 2004 ; Alves et al, 2014).

Il existe aussi d'autres types d'espèces qui ont une activité anti *C. albicans* tel que : *Syzygium aromaticum* (la famille des Myrtaceae)(Raina, Srivastava et al, 2001), *Cymbopogon martinii var. motia* (Prashar, Hili et al. 2003), *Melaleuca alternifolia*((Hammer, Carson et al. 1998), *Juniperus oxycedrus* (Karaman, Şahin et al. 2003).



## **4-Les huiles essentielles et leurs activités antimicrobiennes :**

### **4.1-Définition :**

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (**Wichtel et Anthon, 1999**) (**Valnet, 1984**). Connue par leur effet antiseptique (bactéricide, viral, fongicide) (**Bakkali et al, 2008**)

La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme: «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero, 1996**).

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques, (**Bruneton, 1999**). Il existe plusieurs familles : Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées,

### **4.2. Propriétés des huiles essentielles :**

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

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles.

Elles ont une composition assez complexe (**Azevedo et al, 2001**). On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Cosentino et al, 1999**).

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

#### **4.3.Principes actifs antibactériens des huiles essentielles :**

Les phénols sont les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre : thymol, carvacrol. Les phénols sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. **(Naeini, Khosravi et al. 2009)**

Les alcools avec 10 atomes de carbone ou monoterpénols (géraniol, terpinéol, menthol...), elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes.

Les aldéhydes sont quelque peu bactéricides exemple : néral , géranial , le cuminal ..ect.

De nombreuses familles de molécules ont montré une activité antivirale (in vitro) comme les monoterpénols et les monoterpénales**(Bouhdid et al. 2006)**

#### **4.4. Utilisation :**

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

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

#### **4.5. Mode d'action :**

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large due principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à leur nature hydrophobe **(Dorman et Deans, 2000)**.

Les composés terpéniques (les phénols et les aldéhydes) réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membranaire plasmique des levures **(Knobloch et al, 1989)**

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

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

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

#### **4.6. La conservation des huiles essentielles :**

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet, 1984 ; Sallé et Pelletier, 1991).

#### **5-Combinaison des HE avec des substances antifongiques**

Du fait de l'augmentation continue de la résistance aux antibiotiques, il devient encore plus évident de tester les combinaisons d'huiles essentielles ou de leurs composants avec des antibiotiques (Schwalbe et al, 2007).

#### **6-Les plantes utilisées :**

##### **1-*Origanum glandulosum* :**

Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des Lamiaceées, comporte 38 espèces qui sont largement répandues dans les régions euro-sibérienne et irano-sibérienne, environ 75 %, sont concentrées dans les régions méditerranéennes de l'Est.

*Origanum glandulosum* est une plante odorante (Boulos, 1983), qui pousse spontanément dans tout le nord de l'Afrique, en particulier dans les montagnes, à une altitude de 300 à 1600 m, surtout dans les endroits rocheux (Ietswaart ,1980).

Selon Quezel et Santa, l'espèce *Origanum glandulosum* est une plante à tiges toutes dressées. L'inflorescence est en épis denses, à fleurs restant contiguës après la floraison. La corolle a une lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure.



**Figure6 :** *Origanum glandulosum*(Bouchikhi Tani Zoheir,2011).

**1.1-Systématique :(Quezel et Santa ,1963) :**

**Embranchement :** Phanérogames ou Spermaphytes

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Eudicot

**Sous-classe :** Astéridées

**Ordre :** Lamiales

**Famille :** Lamiacées

**Genre :** Origanum

**Espèce :** *Origanum glandulosum* (Desf.)

**2- *Thymus fontanesii***

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées qui sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualités médicales intéressantes (Yakhlef et al, 2011), localisé à la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales, 2002) elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques (Amiot, 2005).

Les plantes du genre *Thymus* sont des plantes basses sous-ligneuse, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes (Soto-Mendivil et al, 2006).

*Thymus fontanesii* (thym) est une plante aromatique, répandue en Algérie et très utilisée par les populations locales pour ses vertus médicinales (Haddouchi et al, 2009).

*Thymus fontanesii* est un sous arbrisseau à tiges dressées et robustes.

Elle a un calice à 5 dents écartées, à feuilles oblongues-lancéolées entières et glabres, fleurs blanches ou pâles à peine plus longues que le calice (Quézal et Santa, 1963).

Appelée communément Zaâteur par les populations locales, la plante entière est très utilisée en médecine traditionnelle comme antispasmodique, carminatif, antiseptique (Ghannadi et al, 2004).



**Figure 7:** *Thymus fontanesii* (Mebarki, 2010)

### **2.1-Systématique : (Quézel et Santa, 1963)**

<b>Embranchement :</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe :</b>	Métachlamydées
<b>Ordre :</b>	lamiales
<b>Famille :</b>	Lamiaceae
<b>Genre :</b>	Thymus
<b>Espèce :</b>	<i>Thymus fontanesii</i>

### **3-Ammoïdes (ou Ptychotis) verticillata (Nounkha) :**

*Ammoïdes verticillata* est une plante odorante qui pousse spontanément dans le Nord de l'Afrique (Algérie, Maroc, Tunisie) ainsi qu'en Nord d'Asie (Inde, Pakistan) (**Guenther, 1950**)

Les deux grandes qualités d'*Ammoïdes verticillata* sont sa forte action stimulante et son remarquable pouvoir antimicrobien. Elle est considérée principalement comme une plante médicinale pour traiter les maladies du tube digestif (**Quézal et Santa, 1963**).

C'est une plante annuelle grêle à souche filiforme, à tige très ramifiée de 10 à 40 cm, sans rosette de feuille bazales. Feuilles inférieurs pétiolées à nombreux segment multifides verticillées .Fruits ovoïdes de moins de 1 mm de long.

Autre nomenclature : Nounkha (**Merad, 1973**).

Nounkha est une plante fortement aromatique et piquant ; son odeur est très agréable, diffusible et intense fortement balsamique et persistante (**Bekhechi, 2002**).



**Figure 8** : *Ammoides verticillata* (photo originale)

**1. Systématique : (Quézel et Santa, 1963)**

<b>Embranchement :</b>	Phanérogame
<b>Sous classe embranchement :</b>	Angiosperme
<b>Classe :</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe :</b>	Dialypétales
<b>Ordre :</b>	Ombellales
<b>Famille :</b>	Ombellifères
<b>Genre :</b>	Ammoides (ou Ptychotis)
<b>Espèce :</b>	<i>Ammoides verticillata</i>

**4-Daucus crinitus (bouzafor , Eurq Sidi Messaoud) :**

Le genre *Daucus* comprend environ 30 espèces. Il est largement distribué en Algérie , Maroc , Espagne et Portugal. Elle croît sur les monts Atlas et sur les collines incultes, aux environs de Mascara et de Tlemcen.

Elle est caractérisée par des feuilles radicales étalées en rosette, glabre, les supérieures conformes. Ombelles fructifères à rayons inégaux, fruits finement pubescents à côtes toutes munies d'une rangée d'aiguillons mous, jaunes ou rosés, égalant 1,5 à 2 fois le diamètre du fruit (Quézel et Santa, 1963)



**Figure 9:** *Daucus crinitus*( Keddar Miloud,2009)

**1. Systématique : (Quézel et Santa, 1963)**

<b>Embranchement</b>	:	Tracheophyta
<b>Sous-Embranchement</b>	:	Euphyllophytina
<b>Classe</b>	:	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	:	Cornidae
<b>Ordre</b>	:	Araliales
<b>Famille</b>	:	Apiaceae
<b>Sous-Famille</b>	:	Apioideae
<b>Genre</b>	:	<i>Daucus</i>
<b>Espèce</b>	:	<i>Daucus crinitus</i>





**Matériel**  
**Et**  
**Méthodes**

**1. Matériel utilisé : (voir l'annexe 1)**

**2. Provenances des souches :**

Pour l'étude du pouvoir antifongique nous avons utilisé deux souches de référence de *Candida albicans* : IPP 444 (Institut Pasteur Paris) et ATCC 10231 (American Type Culture Collection).

. Les souches sont conservées à 4 C° dans des tubes à gélose inclinée.

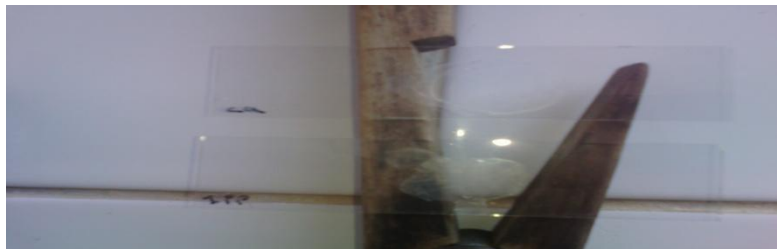
**3. Coloration du *Candida albicans* :**

On a utilisé deux colorants : le bleu de méthylène et le lugol pour deux lames.

Les étapes de coloration :

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile, puis prélever à l'aide de l'anse de platine une colonie du *C. albicans* à partir de gélose Sabouraud.
- Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.
- Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur au moins 2/3 de la lame.
- Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen par le passage de la lame dans la flamme 3 ou 4 fois une demi-seconde.

..



**Figure** : Les lames de frottis après le séchage

- Recouvrir la lame de bleu de méthylène pendant 1 minute, pour la 2ème lame à la place du bleu de méthylène, la lame est recouverte par le lugol pendant 30 S.
- Rincer à l'eau du robinet
- Sécher entre deux feuilles de papier absorbant
- Observation sur microscope optique.

#### **4. Aspect des colonies :**

Pour l'obtention d'aspect macroscopique des colonies du *C.albicans*, on a ensemencé des boîtes de pétri qui contiennent gélose Sabouraud par ensemencement par strie à l'aide d'un lanceur de platine. Après incubation à 37°C/24h.

#### **5. Récolte du matériel végétal :**

La récolte de l'*Origanum glandulosum* a été faite à Lala Setti (début de juin 2014), *Thymus fontanesii* à Koudia (en 2016), *Daucus crinitus* à Bensakren (en 2015) et *Ammoides verticillata* (en 2015) à Béni Snous.

Après la récolte, les parties aériennes sont isolées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré, puis sont conservées jusqu'à leur utilisation pour l'extraction.

#### **5. L'extraction des huiles essentielles :**

L'obtention d'HEs a été faite par hydrodistillation au Clevenger. Cette méthode consiste à mettre les plantes en contact direct avec l'eau dans un ballon placé au-dessus d'une source de chaleur pendant 3 h. Le ballon est lié à une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargées de gouttelettes d'HE. L'huile est recueillie dans une burette graduée ou le volume est lu directement. Les huiles obtenues ont été stockées dans des petits flacons à 4 °C



**Figure 10:** Extraction des HEs par hydrodistillation

## 6. Etude du pouvoir antimicrobien :

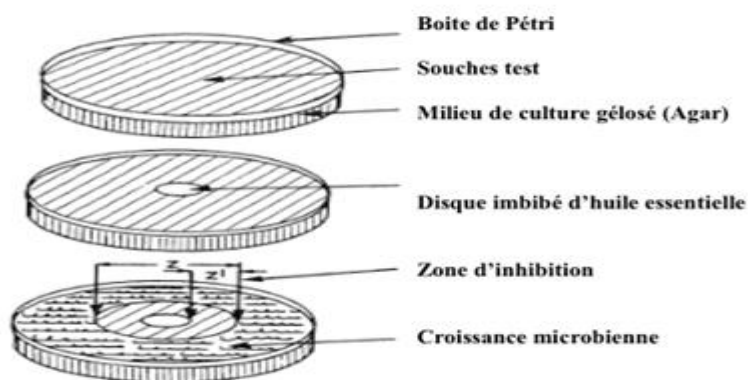
### 6.1. Préparation d'inoculum :

-Ensemencement des souches se fait dans 5 ml de milieu Sabouraud à partir de gélose inclinés, après incubation à 37 °C /24 h.

-La standardisation de l'inoculum a été faite avec du bouillon Sabouraud en utilisant un colorimètre réglé à 590 nm pour obtenir une D.O de 0.08 à 0,1

### 6.2. Méthode de disque (Vincent) :

Cette méthode consiste à déposer un disque de 6 mm de Ø imprégné d'un volume de 5 µl ou d'un volume de 10 µl Ktz à une concentration de 86.6µg/ml au centre de la boîte de Pétri déjà ensemencé (ensemencement par écouvillonnage) par l'inoculum standardisé (**Bauer et al, 1966**). Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du Ø de la zone d'inhibition en mm à l'aide d'une règle graduée.



**Figure 11** : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (Pibiri, 2005)

### 7.3. Méthode de microplaque à 96 puits :

Cette méthode permet d'évaluer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) à l'œil nu. La microplaque contient 96 trous (puits), 12 puits horizontaux et 8 verticaux. La lecture des résultats se fait après incubation à 37 °C pendant 24h par l'absence ou la présence de culture (**Cuenca-Esterella et al, 2003**).

### **7.3.1. Préparation de l'inoculum :**

Dans un tube à hémolyse on met quelques gouttes solution mère d'inoculum (qui est déjà incubé avant 24 h ou 48h), on ajoute Sabouraud bouillon.

- Standardisation de l'inoculum à  $10^8$  UFC/ml (DO = 0,1- 0,08 à 590nm)

- Réalisation d'une série de dilution de 1/10, dans un tube contenant Sabouraud bouillon afin d'obtenir un inoculum de  $10^5$  UFC/ml

### **7.3.2. Préparation des solutions mères des HEs et de Ktz :**

Les dilutions seront préparées dans des tubes à hémolyse stériles.

#### **❖ Pour les huiles :**

L'huile essentielle a subi des dilutions successives au  $\frac{1}{2}$  dans le bouillon Sabouraud en ajoutant le Tween 80 pour une concentration de 1% dans le but d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon Sabouraud et le Tween 80 avec une même concentration de 1%. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contiennent l'huile essentielle et afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1% dans les différentes concentrations préparées (*Khadir et al, 2016*)

#### **➤ Pour chaque Huile on a préparé :**

- SM : 410  $\mu$ l Sabouraud bouillon + 80  $\mu$ l d'HE+10 $\mu$ l Tween 80 (solution du 16%).
- Dans 10 tubes, on dépose 250  $\mu$ l de diluant (Sabouraud bouillon+Tween 80 1%).
- A partir de la SM, on fait la préparation des dilutions décroissantes à raison  $\frac{1}{2}$  jusqu'à 10<sup>ème</sup> tube.

❖ Les concentrations obtenues sont de 16 % jusqu'à 0.032%(160  $\mu$ l/ml- 0.32 $\mu$ l/ml)

#### **❖ Pour le KTz :**

- SM : 1 mg de Ktz + 11.54 ml d'eau distillé stérile.
- Dans 9 tubes, on dépose 500  $\mu$ l d'eau distillé stérile.
- A partir de la SM, préparation des dilutions décroissantes à raison de  $\frac{1}{2}$  jusqu'au 10<sup>ème</sup> tube.
- Les concentrations obtenues sont de 86.9  $\mu$ g/ml jusqu'à 0.15  $\mu$ g/ml.

#### **7.4. Détermination du CMI des HEs et du Kétoconazole vis-à-vis de *Candida albicans* :**

##### **i. Pour les HEs :**

Pour chaque souches, on dépose horizontalement dans une rangée de la microplaque 180  $\mu$ l d'inoculum standardisé pour la souche étudié dans chaque puits .Puis on ajoute 20  $\mu$ l de chaque dilution du HE déjà préparés dans des tubes à hémolyse.

On dépose dans les deux derniers rangés le contrôle positif (200  $\mu$ l d'inoculum seulement) et le control négatif (200  $\mu$ l de bouillon Sabouraud seulement).

##### **ii. Pour le Kétoconazole :**

C'est la même chose que pour les HEs, sauf qu'on a remplacé les concentrations d'HE par les concentrations de KTZ.

#### **7.5. Détermination de la CMI des HEs et du Kétoconazole combinés :**

##### **a. Principe de combinaison :**

Le test de combinaison a été effectué en combinant les huiles essentielles avec un antifongique qu'est le kétoconazole selon la méthode de **Vitale et al, (2005)**, sur microplaques de 96 puits.

Pour chaque huile on a préparé une série de dilutions dans 10 tubes à hémolyse avec des concentrations décroissantes de 160  $\mu$ l/ml jusqu'à 0.312 $\mu$ l/ml.

On a utilisé huit concentrations, 20 $\mu$ l de chaque dilution sont déposés dans chaque puits de microplaque horizontalement. Pius on ajoute 20 $\mu$ l de chaque dilution de Ktz qui ont débutent par une concentration du 69.2  $\mu$ g/ml jusqu'au 0.54  $\mu$ g/ml, déposé verticalement.

Ensuite on ajoute 160 $\mu$ l d'inoculum ( $10^5$  UFC/puits) dans chaque puits, après incubation à 37°C pendant 24h.

##### **Interprétation :**

L'interprétation des résultats se fait en calculant la concentration fractionnelle inhibitrice CFI en Anglais FIC pour « Fractional Inhibitory Concentrations »

$$\text{CFI de l'huile} = \frac{\text{CMI de l'huile combiné avec le kétoconazole}}{\text{CMI de l'huile seul}}$$

$$\text{CFI du kétoconazole} = \frac{\text{CMI de la Kétoconazole combiné avec l'huile}}{\text{CMI du kétoconazole seul}}$$

$$\text{CFI} = \text{CFI de l'huile} + \text{CFI du kétoconazole} \text{ (Mahboubi et Ghazian Bidgoli, 2010)}$$

**Résultats**

**Et**

**Discussion**



### 1. Aspect des colonies :

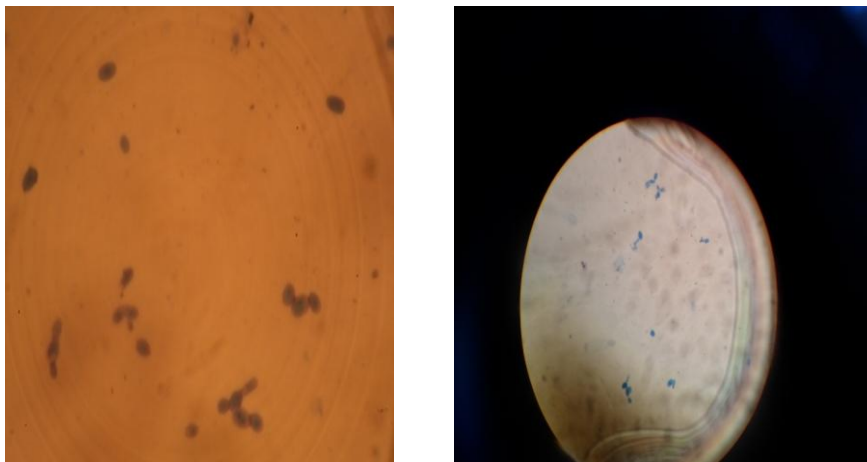
L'aspect macroscopique de *C. albicans* présente des colonies blanches à crème, lisses et crémeuses.



**Figure 12 :** aspect des colonies .

### 2-Observation microscopique :

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



**Figure 12 :** Observation microscopique du *Candida albicans* sous un microscope optique de grossissement  $\times 40$ .

### 3. Résultat de l'activité antifongique des huiles essentielles et du kétoconazole :

#### 3.1-Méthode de disque :

Les résultats des zones d'inhibitions des HEs de l'*Origanum glandulosum*, du *Thymus fontanesii*, d'*Amoïdes verticillata*, du *Daucus crinitus* et du kétoconazole sont présentés sous forme d'histogramme dans la figure 13.

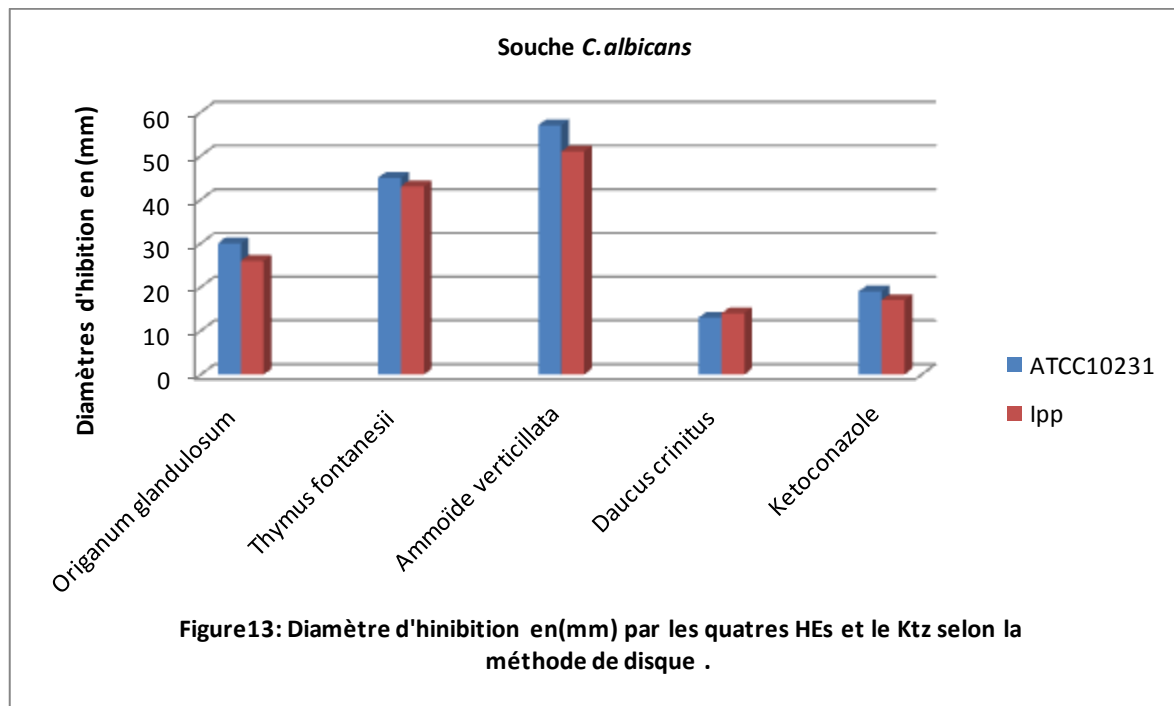


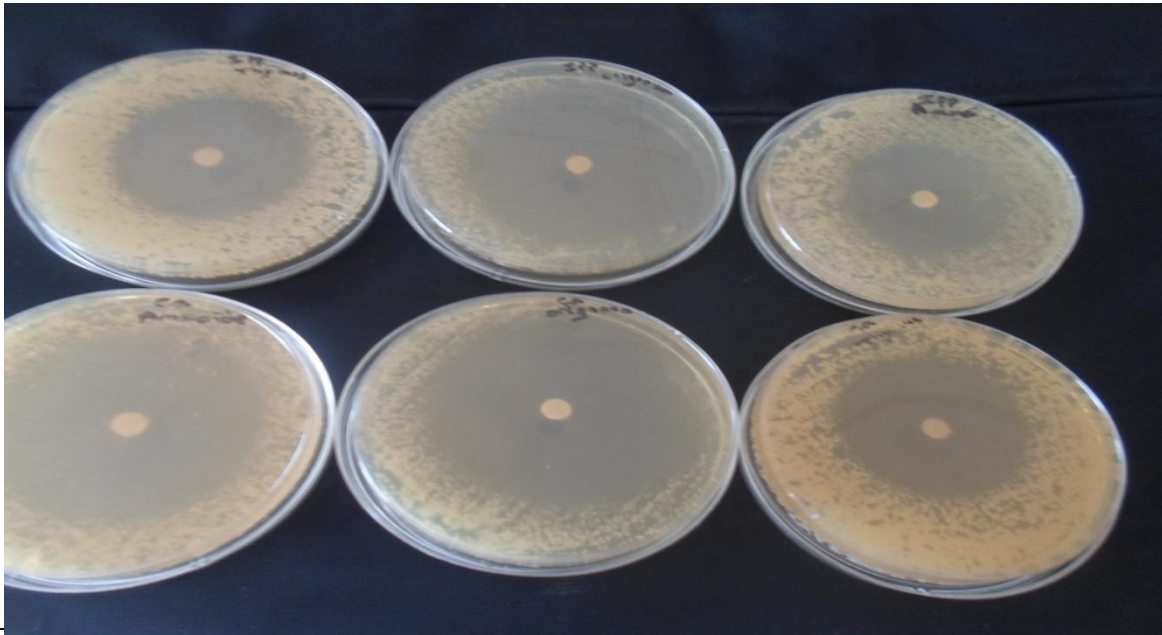
Figure13: Diamètre d'inhibition en(mm) par les quatres HEs et le Ktz selon la méthode de disque .

Les résultats obtenus représentent une activité très importante des huiles essentielles utilisées sur les deux souches de *Candida albicans*.

L'HE de *A. verticillata* a montré plus d'activité sur la souche ATCC10231 que le thym et l'origan. La zone obtenue pour la souche ATCC10231 est de 57 mm alors que pour IPP444 elle est de 51mm. (Annexe 2, photo 3). En comparant nos résultats avec celle obtenus par **Abdelouahid et Bekhechi (2004)** ou ils ont trouvé des zones d'inhibition de 36 -41 mm contre des souches de *Candida albicans*.

Tandis que pour la souche IPP444, l'huile d'origan était plus active que les autres HEs.

Les zones d'inhibition varient d'un HE à un autre et même d'une souche à une autre.



**Figure 15 :** Les zones d'inhibition de différents HEs testés.

L'HE d'*Origanum glandulosum* a montré plus d'activité sur la souche IPP 444(55mm) que pour la souche ATCC10231 (30 mm) (annexe 1, photo 1). Nos résultats sont compatibles avec celles obtenues par **Bendahou et al, (2007)**.

Concernant L'HE de *Thymus fontanesii* la zone d'inhibition obtenue avec la souche ATCC10231 était de 45 mm, alors que pour la souche IPP444 nous avons enregistré un diamètre de 43mm (annexe 1, photo 2), nos résultats sont compatibles avec les résultats de **Haddouchi et al, (2009)** ou ils ont obtenue des diamètres de 39 mm.

L'HE de *Daucus crinitus* a montré une activité modérée sur les deux souches puisque l'effet était moins que celui obtenu avec les deux HE de *T. fontanesii* et d'*O. glandulosum*, cette HE a permis d'obtenir des zones de 14mm avec IPP444 et de 13mm avec ATCC10231.

On peut résumer l'effet antimicrobien des quatre HE en les classant du plus fort vers le plus faible vis-à-vis des deux souches :

➤ Souche ATCC10231 :

*Ammoides verticillata* > *Thymus fontanesii* > *Origanum glandulosum* > *Daucus crinitus*.

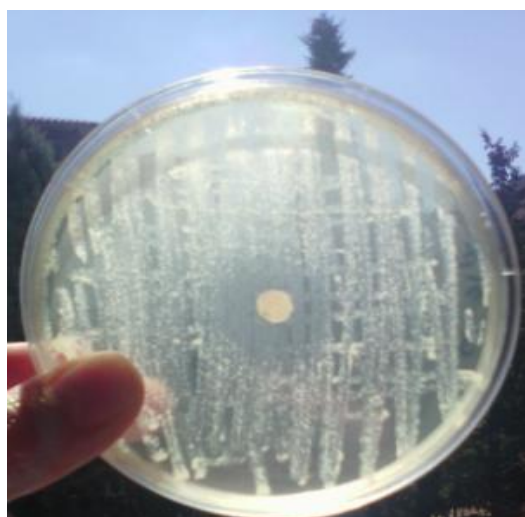
→ Plantes phénoliques ←

➤ Souche IPP444 :

*Origanum glandulosum* > *Ammoïdes verticillata* > *Thymus fontanesii* > *Daucus crinitus*.

On remarque que les plantes phénoliques ont une activités plus important que *Daucus crinitus*.

Les résultats ont montré aussi que nos deux souches de *Candida albicans* sont sensibles au kétoconazole (Annexe 2 : Photo4). Les zones d'inhibition se rapproches entre les souches, ATCC10231 (19 mm) et (17 mm) pour IPP444, nos résultats sont compatibles avec ceux de Carrilo-Munoz et al (1996) ou ils ont trouvé une zone d'inhibition supérieur à (20 mm).



**Figure 14 :** Zone d'inhibition du kétoconazole.

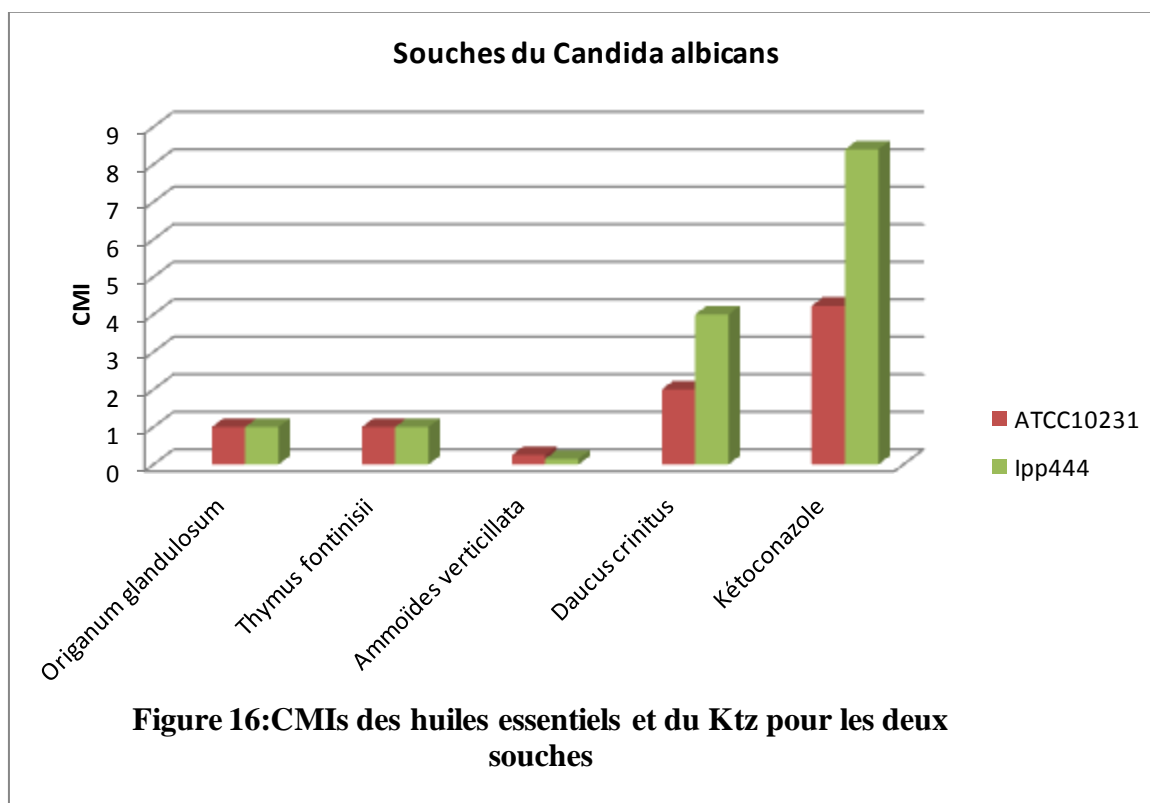
#### **4. Résultats du CMI :**

##### **4.1-Résultats de la CMI des HEs et du Kétoconazole :**

Les résultats des CMI des HEs de l' *Origanum glandulosum*, du *T. fontanesii*, d'*Ammoïdes verticillata*, du *Daucus crinitus* et du kétoconazole sont présentés par le tableau 3 et par la figure 16(Voir annexe 2, photo 5, 6, 7, 8, 12)

**Tableau 2** : résultats du CMI des Hes et Ktz

Huile	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Thymus fontanesii</i>	<i>Ammoïdes verticillata</i>	<i>Daucus crinitus</i>	Kétoconazole
Souches	( $\mu\text{l/ml}$ )	( $\mu\text{l/ml}$ )	( $\mu\text{l/ml}$ )	( $\mu\text{l/ml}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>ATCC10231</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>2.5</b>	<b>20</b>	<b>4.23</b>
<b>Ipp444</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>2.5</b>	<b>40</b>	<b>8.4</b>



D'après la figure 16, nous remarquons que les CMI varient d'une H.E. une autre, nous remarquons aussi que la CMI la plus faible a été obtenue par l'HE d'*Ammoïdes verticillata*, à la concentration 2.5  $\mu\text{l/ml}$  pour ATCC10231 et la même pour IPP444.

Aussi, la même CMI a été obtenue vis-à-vis des deux souches par l'HE d'*O.glandulosum* et *Thymus fontanesii* à la concentration de 10  $\mu\text{l/ml}$ .

Alors que, pour l'HE de *Daucus crinitus* la CMI est obtenue à la concentration de 20 µl/ml pour ATCC10231, alors qu'elle est de 40 µl/ml pour IPP444.

La CMI de l'antifongique kétoconazole est obtenue à la concentration du 4.23 µg/ml pour la souche IPP444 et 8.4 µg/ml pour ATCC10231, nos résultats sont compatibles avec **Amber et al, (2010)** qui ont trouvé la CMI du kétoconazole entre 5-9 µg/ml contre différentes souches de *Candida albicans*.

#### **4.2-Résultats de la CMI des HEs et du Ktz combinés :**

On a fait la combinaison des deux HEs seulement pour les HEs de *Thymus fontanesii* et de *Daucus crinitus*, avec le Ktz.

##### **a) Combinaison de l'HE de *Thymus fontanesii* et Ktz :**

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 03. (Voir annexe, photo 9)

**Tableau 03 :** CMIs de l'HE de *Thymus fontanesii* et du Ktz

Souche	CMI pour le KTz seul (µg/ml)	CMI pou l'HE <i>T. fontanesii</i> %	CMI pou le ktz combiné %	CMI pour l'HE combiné %
<b>ATCC10231</b>	8.4	1	4.32	0.25
<b>IPP44</b>	4.23	1	2.16	0.25

D'après le tableau 03, on constate que les CMIs de la combinaison de l'HE de *T. fontanesii* est de l'ordre de 0.25 % et du KTz est de 2.16 µg/ml vis-à-vis de ATCC10231 et IPP444, de ce fait on remarque que, les CMI sont moindre que les CMIs de l'HE(1) et du Ktz testés séparément. Par conséquent, il existe un effet de synergie. (**Vital et al, 2005**).

Afin de vérifier le type d'effet observé, on a calculé la Concentration Fractionnelle Inhibitrice (CFI). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 05 pour les deux souches :

**Tableau 5 :** index de concentration fractionnelle inhibitrice de l'HE de *T. fontanesii* et du kétoconazole

Combinaison	CFI	ICFI
<i>Thymus fontanesii</i>	0.0025	0.502
<b>Ktz</b>	0.50	

Selon Cantón et al , (2005) :

- $ICFI \leq 0.5 \Rightarrow$  effet de synergie
- $0.5 < ICFI < 4 \Rightarrow$  effet d'addition
- $ICFI > 4 \Rightarrow$  effet d'antagonisme

Notre ICFI calculé est de 0.502 qui est  $\leq 0.5$ , donc il y a un effet de synergie entre l'HE de *Thymus fontanesii* et du Ktz .

### 2.3- Résultats de la CMI de l'HE de *Daucus crinitus* et du Ktz combinés :

Pour la détermination de la CMI de *D.crinutus* et Ktz combinés, on a testés seulement sur la souche ATCC10231. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 06 et la figure 17.(Voir annexe ,photo10)

**Tableau 6 :** CMI de l'HE de *Daucus crinitus* et du Ktz combinés

Souche	CMI pour le KTz seul (µg/ml)	CMI pou l'HE seul (µl/ml)	CMI pou le ktz combiné (µg/ml)	CMI pour l'HE combiné (µl/ml)
ATCC10231	8.4	20	8.4	20

D'après le tableau 6, on remarque que les CMI de la combinaison de l'HE de *Daucus crinitus* et du Ktz vis-à-vis de ATCC10231 sont équivalentes aux de l'HE et du Ktz testés séparément, donc il y a un effet d'addition (**Khan et Ahmad, 2011**).

Afin de vérifier l'effet d'addition, on a calculé l'ICFI. Les résultats sont données le **tableau 7**

**Tableau 7:** index de concentration fractionnelle inhibitrice de l'HE de *Daucus crintus* et du kétoconazole

Combinaison	CFI	ICFI
<i>Daucus crintus</i>	1	2
KTz	1	

ICFI est égale de 2 qui  $0.5 < ICFI < 4$ , le résultat confirmé qu'il ya un effet d'addition entre l'HE de *Daucus crintus* et le KTz combiné.

L'effet anti *Candida* des HE est dû à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure.

En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (Cox et al, 2000).

Concernant les combinaisons des huiles essentielles de *T. fontanesii* et de *D. crinitus* avec le Kétoconazole, Des résultats similaires ont été observés par Khan et al,( 2011) lorsque il a démontré l'effet synergique de l'HE de *S. aromaticum* avec le Fluconazole, de même, Shin et Kan 2003 ont testé l'effet la combinaison du Kétoconazole avec l'HEs de *A. rugosa* vis-à-vis un champignon *Agastache rugosa* le résultat était un grand effet de synergie.

L'usage de HES pour combattre les infections causé par l'espèce *C. albicans* semble un bon moyen puisque ce pathogène a montré toujours des sensibilités au essences végétales, de plus jusqu'à présent, les huiles essentielles ne sont utilisées en aromathérapie que pour usage externe et l'espèce *C. albicans* est connue comme un agent incriminé dans les infections de la peau et les tissus mous et d'autre endroit externe du corps, par conséquent les huiles essentielles constituent une bonne solution pour ces infections surtout avec l'augmentation accrue des résistance au antifongiques





# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

L'objectif assigné à cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur des huiles essentielles d'ouest d'Algérie sont d'*O. glandulosum*, *A. verticillata*, *D. crinitus* et *T. fontanesii* sur des souches de *C. albicans*, ainsi que d'étudier la combinaison entre certains de ces H.E et l'antifongique le kétoconazole.

Les HE ont montré des activités fortes mais différentes d'une huiles a une autre, l'HE de *A. verticillata* a montré un effet très remarquable suivi par *O. glandulosum*, *T. fontanesii* et *D. crinitus* respectivement. Les combinaisons de *T. fontanesii* et de *D. crinitus* avec Kétoconazole ont donné des effets de synergie et d'addition respectivement.

Ces résultats sont encourageants en terme de lutte contre ce pathogène nosocomiale puisque les effets des huiles était très fort d'un côté et d'un autre coté aucun antagonisme n'a été décelé des deux huiles testé d'ans le teste de combinaison. Cela confirme l'usage de ces plantes aromatiques et médicinales par les populations anciennes comme un moyen efficace pour lutter contre les muqueuses.

Vu les résultats obtenus, il serait intéressant de valoriser ces plantes aromatiques par

L'élaboration des produits pharmaceutiques à base d'huiles essentielles telle que les pommades, les lotions, les gels pour le traitement des infections et des aéro-sols pour la désinfection atmosphérique des établissements de santé ; faire des tests *in vivo* pour savoir la réponse de l'organisme vis-à-vis de ces huiles essentielles et la pharmacocinétique de ces derniers dans l'organisme, et en fin d'élargir l'étude sur d'autres huiles essentielles des plantes locales et d'autre antifongiques.

1. Abdelouahid, D.E., Bekhechi, C (2004). Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*( Nûnkha ). *Biologie & Santé* vol. 4, n° 2.
2. Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., Khan, L.A (2010). Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microb. Pathog.* 48, 35–41.
3. Alves, C. T., I. C. Ferreira, et al. (2014). "Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species." *Future microbiology* 9(2): 139-146.
4. Alix Coste, Anna Selmecki, Anja Forche, Dorothée Diogo, Marie-Elisabeth Bognoux, Christophe d'Enfert, Judith Berman, and Dominique Sanglard (2007). Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* Isolates. *Society for Microbiology* Vol. 6, No. 10.
5. Almirante, B., D. Rodríguez, et al. (2005). "Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003." *Journal of Clinical Microbiology* 43(4): 1829-1835.
6. Amber, K., A. Aijaz, et al. (2010). "Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole." *Phytomedicine* 17(12): 921-925.
7. Association Française de Normalisation, (1986,) "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. NF T 75-006.
8. Baba Aissa, F. (1999). "Encyclopédie des plantes utiles." *Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident*", Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alge
9. Bakkali, F., S. Averbek, et al. (2006). "Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP

- plus UVA and MMS." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **606**(1): 27-38.
10. Bauer, A., W. Kirby, et al. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." *American journal of clinical pathology* **45**(4): 493.
11. Bennet , R.J ., and Johnson, A.D.(2005) Mating in candida albicans and the search for sexual cycle. *Annu Rev Microbial* **59** : 233-255.
12. Bouchikhi Tani, Z. (2014). Lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles.
13. Bouhdid, S., M. Idaomar, et al. (2006). "Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities." *Biochimie, Substances Naturelles et Environnement Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc*: 9-12
14. Boulos L., 1983. *Medicinal plants of North Africa*. Ed. Algonac, MI, pp: 109-175.
15. Brajtburg, J. and J. Bolard (1996). "Carrier effects on biological activity of amphotericin B." *Clinical Microbiology Reviews* **9**(4): 512-531
16. Brown A. Odds F. and Gow N. (2007) Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*; **10**: 307-13.
17. Bruneton J. (1999) - *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
18. Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M., Viudes, A., Espinel, I.A., (2005). Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and etest methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (4), 1593–1596.
19. Carrilo-Munoz, A., C. Tur, et al. (1996). "In-vitro antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole, and miconazole against yeasts of the *Candida* genus." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**(4): 815-819.

20. Christine D. Waugh (2008). Le kétoconazole. xPharm: La référence complète Pharmacologie Pages 1-6
21. Coste, A., M. D. Linas, S. Cassaing, J. Bernad, S. Chalmeton, J. P. Seguela, and B. Pipy(2002). A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 49:731-740.
22. Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 88:170-175.
23. Daniel Poulaina(2013.). *Candida albicans*, plasticité et pathogénie.
24. D'Enfert C. (2009) Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogen in the human host. *Current Opinion in Microbiology*; 12: 358- 364.
25. Donlan R.M., (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8:881-890.
26. Dorman H.J.D, and Deans H.J.D. (2000) - Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88. 308–316.
27. Douglas L.J. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista de Micología*; 19: 139-143.
28. Douglas, L. J (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiology* 11: 30.
29. Dupont B. (1985). *L'écobiologie des Candida*. Laboratoire Squibb.
30. Elewski, B. E. (1998). "Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management." *Clinical Microbiology Reviews* 11(3): 415-429.

31. Errol Reiss, Jean Schadomy. H, Marshall Lyon(2011). *Fundamental Medical Mycology*. ISBN 978-0-470-177791-4.
32. Euzeby J. *Mycologie médicale comparée*. Collection Mérieux.(1994), Fondation manuel, Tome II, 88-251.
33. Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A. D., Berman, J., & Bennett, R. J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol*, 6(5), e110.
34. Ghannadi, A., S. E. Sajjadi. (2004). *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut.-A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa." *Zeitschrift für Naturforschung C* 59(3-4): 187-189.
35. Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501-517.
36. Giordani, R. and J. Kaloustian (2006). "Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques." *Phytothérapie* 4(3): 121-124.
37. Gow NAR, Henderson G, Gooday GW (1986) Cytological interrelationships between the cell cycle and duplication cycle of *Candida albicans*. *Microbios* 47:97.
38. Guignard J.L., Bouchet P., Madulo G., Regli p (1989). *Mycologie générale et médicale*. Abrégé Masson., , 107-120,108-109.
39. Haddouchi, F., H. A. Lazouni, et al. (2016). "Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut." *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* .

40. Hammer, K. A., C. F. Carson, et al. (1998). "In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**(5): 591-59
41. Horisberger, M., and M. F. Clerc. 1988. Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* 46:444-52.
42. Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. (1998) .Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'aromes. *Sciences des aliments*, 18: 563-582.
43. Hull , C.M and Johnson , A.D. (1999) Identification of a mating type –like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans* . *Science* 285: 1271-1275.
44. Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. and Jouault, T(2000). *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock* 14: 278-283.
45. Ietswaart, J. H. and J. Ietswaart (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), Leiden University Press The Hague.
46. Karaman, I., F. Şahin, et al. (2003). "Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L." *Journal of ethnopharmacology* **85**(2): 231-235.
47. Kiswa Kabha, Liat Nissimov , Abed Athman , Yona Keisari, Haralambos Parolis , Leseley A. S.Parolis , RuTh M. Grue, Jutta Schlepper-Schafer , Alan R.B. Ezekowitz Dennis E. Ohman, and Itzhak Ofek (1995). Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in *Klebsiella pneumonia*. *INFECTION AND IMMUNITY* .p.847-852 Vol.63.
48. Khadir, A., M. Sobeh, et al. (2016). "Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Thymus lanceolatus*." *Zeitschrift für Naturforschung C* 71(5-6): 155-163.



49. Keddar, M. (2014). Compositions chimique activité antibactériennes, antioxydants des huiles essentielles de quelque Daucus
50. Knobloch, K., A. Pauli, et al. (1989). "Antibacterial and antifungal properties of essential oil components." *Journal of Essential Oil Research* **1**(3): 119-128.
51. Kumamoto, C.A., and Vines ., M.D.(2005) Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to candida albicans virulence. *Cell Microbial* **7**:1546-1554.
52. Lanternier, D (2013) travaux pratiques de biologie des levures .Ellipses :43-49.
53. Mahboubi, M. and F. G. Bidgoli (2010). "In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*." *Phytomedicine* **17**(10): 771-774.
54. Mallory and craven (2012), *Candida albicans* Dap1 p promotes Ergosterol synthesis via the P450 Protein Erg11/Cyp51 p , Regulating Susceptibility to Azole Antifungal Drugs , Morphogenesis and Damage Resistance .*Pharmacologia* **3** (7) : 179-189.
55. Manning, M., and T. G. Mitchell (1980). Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol* **144**:258-73.
56. Mathews, H. and L. Witek-Janusek (2002). Host defense against oral, oesophageal, and gastrointestinal candidiasis. In *Candida and Candidiasis*. R. A. Calderone: 179-192. *Pathol Oral Cir Bucal*, **16**, e139-143.
57. Mebarki noudjoub, (2010), extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanisii* et application à la formulation à une forme médicamenteuse-antimicrobienne thèse de magister en technologie des hydrocarbures, département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, université M'Hamed Bougara-Boumesdes.

58. Merad Chiali, R. (1973). "b. Plantes thérapeutiques: traditions, pratiques officinales, science et thérapeutique." Tec. Doc.
59. Mille, C., G. Janbon, F. Delplace, S. Ibata-Ombetta, C. Gaillardin, G. Strecker, T. Jouault, P. A. Trinel, and D. Poulain. (2004). Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem* 279:47952-60. and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* 1998. 33: 451-459.
60. Mohd Sajjad Ahmad Khan & Iqbal Ahmad (2011). Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90:1083–1094
61. Naeini, A., A. Khosravi, et al. (2009). "Anti-*Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine." *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* **19**(3): 168-172.
62. Niimi, Masakazu, Firth, Norman A., et Cannon, Richard D, (2010). Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* vol. 98, no 1, p. 15-25.
63. Odds, F. C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12:45-93.
64. Odds, F. C. (1979). *Candida and Candidosis*, Leicester University Press ed, London.
65. Odds, F. C. (1994). "Candida species and virulence: The study of virulence attributes in *Candida albicans* has come of age, and the host-fungus interplay may be more complex than previously realized." *ASM News* 60(6): 313-318.

66. Odds, F. C. (2003). "Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication." *Mycologist* **17**(02): 51-55.
67. Perry C.M et Coll (2003) phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem.* 278: 13086-13093.
68. Poulain, D. and Feuilhade-de-Chauvin, M., (1995) Candidoses et levures diverses: propriétés and therapeutic use in vaginal candidiasis. *Drug evaluation*, 1995,49 984 - 1006.
69. Prashar, A., P. Hili, et al. (2003). "Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*." *Phytochemistry* **63**(5): 569-575.
70. Quezel P., et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris.
71. Raoult , D.(1998) .Dictionnaire de maladies infectieuses : épidémiologie, diagnostic . 2-84299-036-6.
72. Reiss, E., V. M. Hearn, D. Poulain, and M. G. Shepherd. (1992). Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1:143-56.
73. Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM, Mitchell AP (2005) *Candida albicans* biofilms defective mutants. *Eukaryot Cell* 4: 1493-1502.
74. Ruhnke , M., and Maschmeyer, G.(2002) Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer –review of the literature. *Eur J Med Res* 7:227-235.
75. Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentin, and R. Sentandreu (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 6:14-29.

76. Sanon, A., M. Garba,(2002). Analysis of the insecticidal activity of methylisothiocyanate on *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani)(Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research* 38: 129-138.
77. Sallé, J.-L. and J. Pelletier (1991). *Les huiles essentielles: synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie*, Ed. Frison-Roche.
78. Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., Busciolano, M., Milillo, L., Guida, A., Petruzzi, M., Serpico, R. (2011). Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral*.
79. Samaranayake L.P, Fidel P.L., Naglic J.R., Sweet S.P., Teanpaisan R., Coogam M.M., Blignaut E. and Wanzala P., (2002) fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*; 2:151-160.
80. Senet J.M., Robert R. (1995) *Physiopathologie des candidoses* . *Jour. Mycol. Méd.* , Vol5, 145-166.
81. Soto-Mendivil E.A , Moreno-Rodriguez J.F, Estarron-Espinosa M, Garcia- Fajardo JA et Obledo- Vazquez E.N.( 2006).Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri* – E- Gnosis[online]; Vol.4 ; N° 16.
82. Staebell, M., and D. R. Soll(1985). Temporal and spatial differences in cell wall expansion during bud and mycelium formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 131:1467-80.
83. S. Shin and C.-A. Kang. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 111-115

84. Sugar, A., S. Alsip, et al. (1987). "Pharmacology and toxicity of high-dose ketoconazole." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31(12): 1874-1878.
85. Teuscher E., Anton R. et Lobstein A. (2005) – plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc éditions, Paris.
86. Uppuluri P. Dinakaran H., Thomas D. P., Chautuverdi A. K. and Lopez-Ribot J. L. (2009) Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. *J Clin Microbiol*; 47(12): 4078-4083.
87. Valnet J. (1984) .Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544.
88. Vaubour Doll , M( 2006 ).Parasitologie et mycologie (tome 3) .978-2-915585-40-7.
89. Wichtel M. et Anton R. (1999) .Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
90. Winnicka, K., M. Wroblewska, et al. (2012). "Hydrogel of ketoconazole and PAMAM dendrimers: Formulation and antifungal activity." *Molecules* 17(4): 4612-4624.
91. Yamamoto, Y., T. W. Klein, et al. (1997). "Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages." *Infection and immunity* 65(3): 1077-1082.
92. Zaoutis T , E., Argon J., Chu J., Berlin J. A., Walsh T . J. and Feudtner C .(2005) The epidemiology and attributable outcomes on candidemia in adults and children hospitalized in the united states : A propensity analysis . *Clin infect Dis* ; 41:1232-1239.



# **Annexes**

---

**Annexe 1**

**Matériels et produits utilisés :**

- ❖ Boîtes de pétri
- ❖ Anse de platine
- ❖ Autoclave
- ❖ Baro- magnétique
- ❖ Bec de bunsen
- ❖ Becher
- ❖ Bouillon Sabouraud liquide
- ❖ Colorimètre (spectrophotomètre)
- ❖ Disque de papier Whatman
- ❖ Eau distillé stérile
- ❖ Eau physiologique stérile
- ❖ Ependorf
- ❖ Eprouvette
- ❖ Incubateur 37C°
- ❖ Micropipette
- ❖ Microplaque à 96 trous
- ❖ Milieu de culture Sabouraud
- ❖ Tube à hémolyse
- ❖ Vortex
- ❖ Plaque chauffante
- ❖ Ecouvillons
- ❖ Poupinelle (four pasteur)
- ❖ Tubes à vis

Le matériel doit être stérilisé avant chaque manipulation.



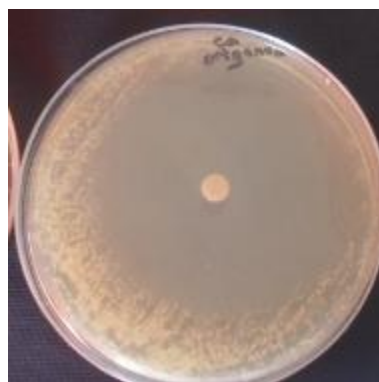
## Annexe 2

**Tableau 01** : Les diamètres des zones d'inhibition des HEs et du kétoconazole.

Les souches	ATCC 10231	Ipp444
<b>Les HEs et Ktz</b>		
<i>Origanum glandulosum</i>	30 mm	55 mm
<i>Thymus fontanesii</i>	45 mm	43mm
<i>Ammoïdes verticillata</i>	57 mm	51mm
<i>Daucus crinitus</i>	13 mm	14 mm
<b>Kétoconazole</b>	19 mm	17 mm

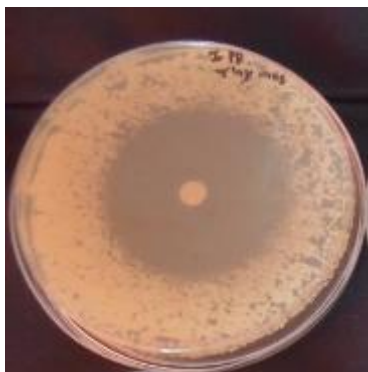


Souche IPP444

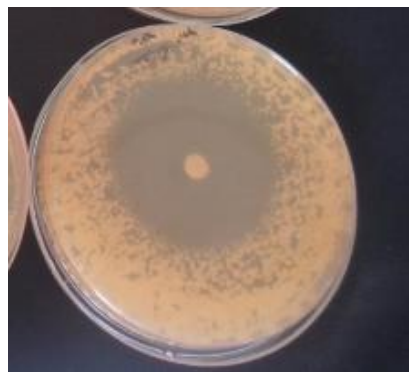


Souche ATCC10231

**Photo 1** : Aromatogramme de l'HE d'*Origanum glandulosum*

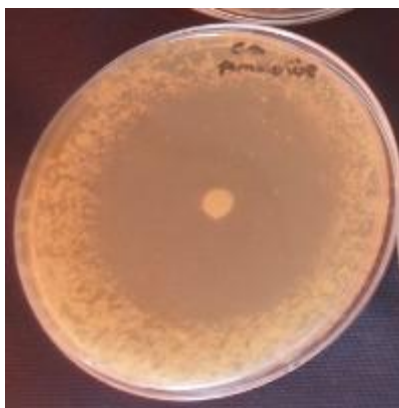


Souche IPP444

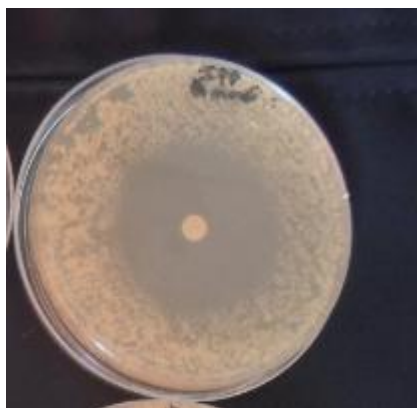


Souche ATCCC10231

Photo 2 : Aromatogramme de l'HE de *Thymus fontanesii*

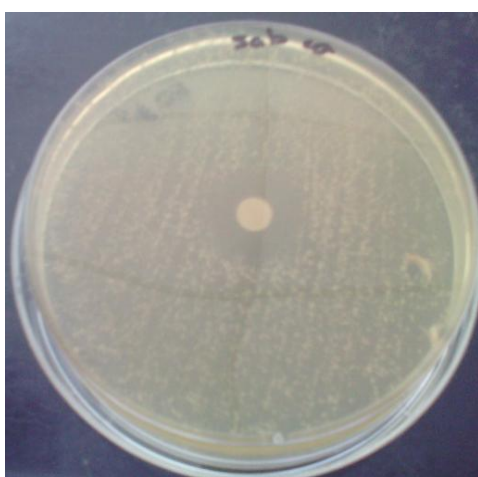


Souche ATCC10231

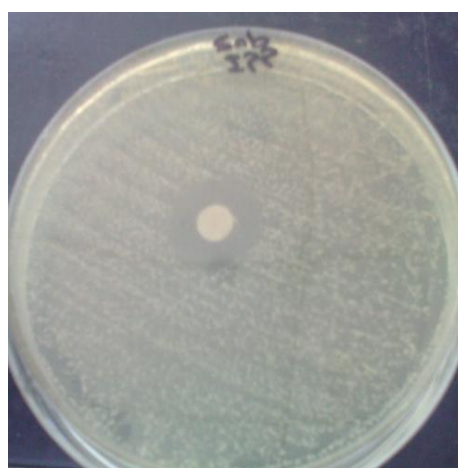


Souche IPP44

Photo 3 : Aromatogramme de l'HE d'*Ammoïdes verticillata*



Souche ATCC10231



Souche IPP44

Photo 4 : Aromatogramme du Kétoconazole



Photo 5 : CMI du PHE d'*Origanum glandulosum*

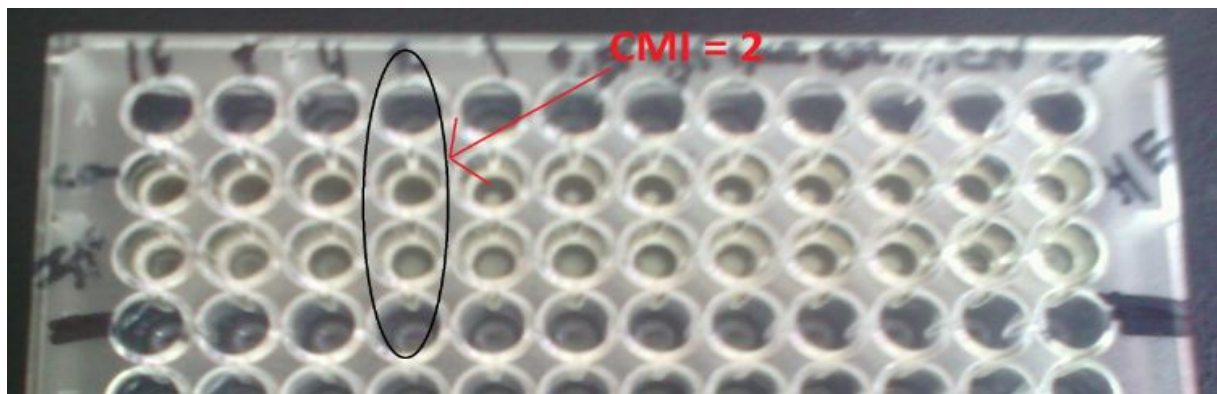


Photo 6 : CMI du PHE d'*Ammoïdes verticillata*

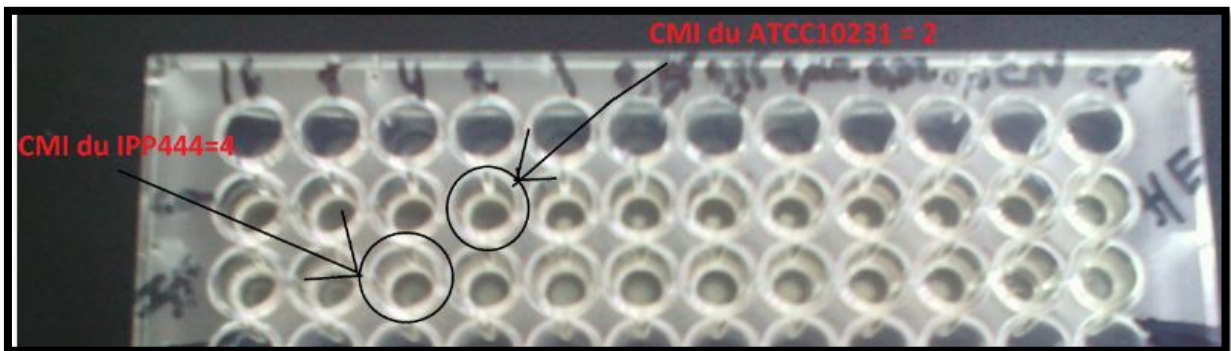


Photo 7 : CMI du PHE de *Daucus crinitus*



Photo 8 : CMI du PHE de *Thymus fontanesii*



Photo 9 : Combinaison du *Thymus fontanesii* avec le Ktz.

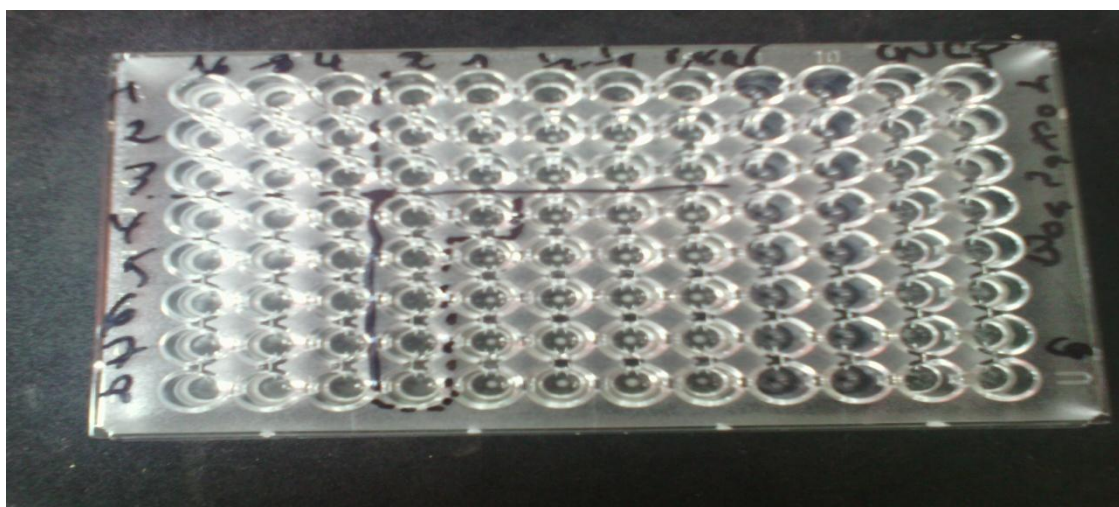


Photo 10: Combinaison du *Thymus fontanesii* avec le Ktz



Photo 11 : Aromatogramme de l'HE du *Daucus crinitus*

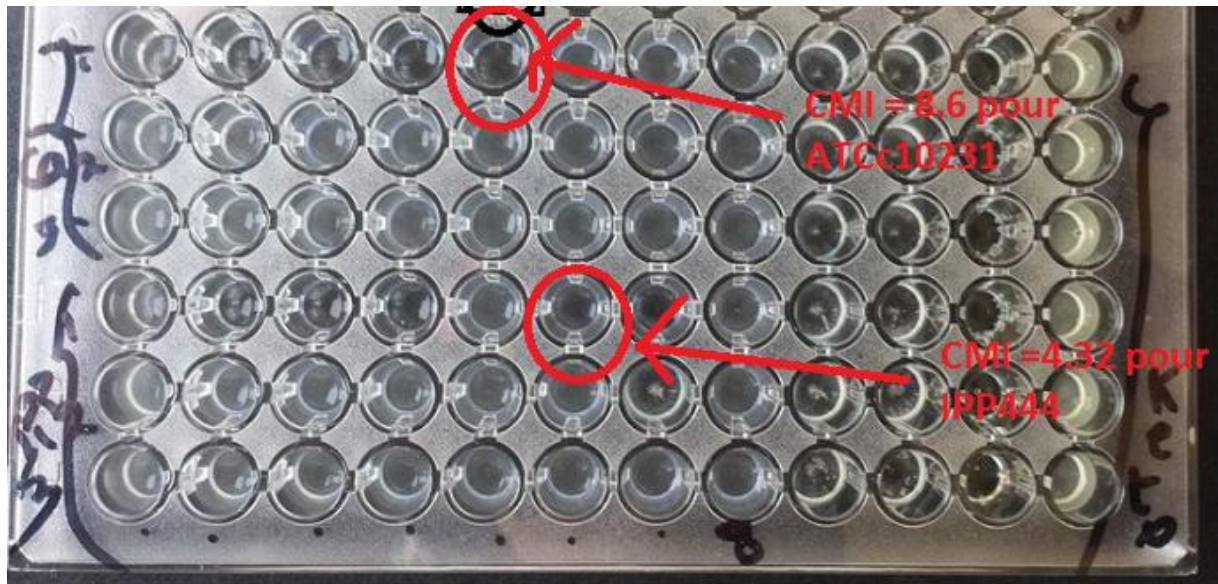


Photo 12: CMI du Kétoconazole

## الملخص

### العنوان: التأثير المثبط لبعض الزيوت الطيارة على خميرة *Candida albicans*

تعتبر خميرة *Candida albicans* انتهازية و ممرضة و تعد سببا للكثير من انواع الالتهابات. في هذا العمل قمنا باختبار حساسية عينتين متمثلتين في ATCC10231 و IPP444 لأربع زيوت طيارة مستخلصة من نباتات عطرية متواجدة بالغرب الجزائري و هي: *Ammoïdes verticillata*, *Origanum glandulosum*, *Thymus fontanesii*, *Daucus crinitus*.

النتائج اظهرت أن الزيت المستخلصة من *A. verticillata* لها أثر فعال و قوي مقارنة بالزيوت الاخرى. كما قمنا أيضا باختبار إدماج نوعين من الزيوت المستخلصة المتمثلة في الزعتر و بوزفور مع المضاد الحيوي الكيتوكونازول. و أظهرت النتائج أن هناك تآزر بين الزعتر (*Thymus fontanesii*) و الكيتوكونازول بينما يوجد اثر اضافة بين بوزفور (*Daucus crinitus*) و الكيتوكونازول.

**الكلمات المفتاحية:** زيوت طيارة، *Candida albicans*، الكيتوكونازول. نشاط مضاد للفطريات، *Origanum glandulosum*, *Thymus fontanesii*, *Daucus crinitus*

## Résumé :

### **Titre : Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur *Candida albicans***

*Candida albicans* est un pathogène opportuniste nosocomial impliqué dans de nombreuses infections. Dans ce travail nous avons évalué la sensibilité de deux souches de références ; ATCC 10231 et IPP 444 à quatre huiles essentielles (HEs) issues de plantes aromatiques de l'ouest de l'Algérie sont ; *Origanum glandulosum*, *Thymus fontanesii*, *Daucus crinitus* et *Ammoïdes verticillata* par deux méthode : la méthode de disque et . Nous avons évalué également la combinaison des HEs de *T. fontanesii* et *D. crinitus* avec l'antifongique Kétoconazole.

Les résultats ont montré que l'HE de *A. verticillata* a présenté plus d'effet que les autres HE suivi par *O.glandulosum*, *T. fontanesii* et *D. crinitus* respectivement. Les combinaisons de *T. fontanesii* et de *D. crinitus* avec Kétoconazole ont donné des effets de synergie et d'addition respectivement.

**Mots clés :** *Candida albicans*, activité antifongique, huile essentielle, *Ammoïdes verticillata* *Thymus fontanesii*, *Origanum glandulosum* , *Daucus crinitus*, kétoconazole.

## Abstract:

### **Title: Inhibitory effect of some essential oils against *Candida albicans***

*Candida albicans* is pathogenic opportunist implied in many nosocomial infections. In this work we evaluated the Sensibility of two references strains; ATCC 10231 and IP 444 to four essential oils (HEs) resulting from aromatic plants of the west of Algeria are; *Origanum glandulosum*, *Thymus fontanesii*, *Daucus crinitus* and *Ammoïdes verticillata*. We also evaluated the combination of HEs of *T. fontanesii* and *D. crinitus* with antifungal Kétoconazole. The results showed that the HE of *A. verticillata* presented more effect than other HE S. The combinations of *T. fontanesii* and *D. crinitus* with Kétoconazole gave effects of synergy and addition respectively.

**Keywords:** *Candida albicans*, antifungal activity, ketoconazole, essential oil , *Ammoïdes verticillata* *Thymus fontanesii*, *Origanum glandulosum* , *Daucus crinitus*,

