

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA - Béjaïa

Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité Pharmaco-toxicologie



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

***L'activité anti-Candida albicans des extraits
de feuilles de Centaurea calcitrapa***

Présenté par :

Slimanou Wissam & Sendjakeddin Meriem

Soutenu le : 30 Septembre 2021

Devant le jury composé de :

Mme Cheraft Epse Bahloul N.	MCB	Président
Mr. Belkacem N.	MAA	Examineur
Mme Kendi Epse Kara S.	MAA	Encadreur
Mme Ayouni K.	MCB	Co- Encadreur

Année universitaire : 2020/2021

Dédicace :

*Je dédie ce mémoire
Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

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

*A ma mère Messaouda,
Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier
comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me
guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de
force pour affronter les différents obstacles.*

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

*A mes très chers frères Houssem Eddin et Younes
Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout
réussite.*

*A toute ma famille.
A tous mes amis qui m'ont encouragé dans les moments
difficiles.*

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenue.

Wissam

Dédicace :

A mes chers parents

*Ma mère zahoua,
Qui a œuvré pour ma réussite, son soutien, son amour, tous les
sacrifices consentis et ses précieux conseils.*

*Mon père Omar,
Qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de
sacrifices et de privations.*

*Vous m'avez toujours soutenue et eu confiance en moi. Merci
pour votre éducation, les valeurs nobles, vos encouragements,
votre présence et votre amour depuis toujours, votre patience
sans fin, puisse Dieu tout puissant vous préserver du mal, vous
combler de santé, de bonheur, vous procurer longue vie, je vous
aime mes chers parents.*

*A mes sœurs Manel, Hanane, Malika, Radja, Maya
Et mon frère Malek,
Je vous souhaite toute la réussite et le bonheur que vous méritez.
Bon courage à vous, que Dieu vous bénisse et vous protège et
sachez que je serai toujours là pour vous !*

*A toute ma famille,
A mes amis ...
Merci pour ces beaux moments passés ensemble.
A toute personne qui me connais.*

Meriem

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH, le tout puissant, de nous avoir donné la force, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nous remercions notre encadreur Mme Kendi-Kara S. pour son soutien, sa compréhension et son encouragement et ses conseils qu'elle nous a apportés dans la réalisation de ce travail.

Un remerciement spécial et chaleureux à Mme Ayouni K. notre Co-encadreur pour son encadrement et d'assurer la direction de ce travail, et pour nous apporter la rigueur scientifique nécessaire à son bon déroulement, qu'elle soit rassurée de notre profonde gratitude.

Nous remercions les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire :

Mme Cheraft-Bahloul N. qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté la présidence du jury de ce mémoire ainsi que, Mr Belkacem N. d'avoir accepté d'examiner ce travail, qu'ils trouvent ici toute l'expression de notre profonde reconnaissance et notre respect.

Nos vifs remerciements à la doctorante Atia A. pour sa générosité et les nombreuses facilités qu'elle n'a cessé d'accorder, ainsi que son grand soutien pour l'accomplissement de ce travail.

Nous remercions également les doctorants, les enseignants et les techniciens des laboratoires de Génétique et de Biologie Physico-Chimique pour leur aide tant par leur soutien moral que par leurs conseils précieux.

Nous remercions tous nos collègues et amis de la promotion Master «pharmaco-toxicologique» de l'année 2020-2021.

Enfin, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

AC : acide caféique

ALS: agglutinin-like sequence

BN : Bouillon nutritif

C. albicans: *Candida albicans*

C. calcitrapa : *Centaurea calcitrapa*

CMI : concentration minimale inhibitrice

DMAPP : dimethylallyl pyrophosphate

ECBU: examen cytobactériologique des urines

ESCMID: société européenne de microbiologie clinique et maladies infectieuses

Extrait EFF : extrait éthanolique feuilles fraîches

Extrait EFS : extrait éthanolique feuille sèches

FLC: fluconazole

FPP: farnesyl pyrophosphate

GI: gastro-intestinal

GPP: géranyl pyrophosphate

HMGSCoA : β -hydroxy- β -methylglutaryl –CoA

Hwp1: Hyphal Wall protéine 1

IPP: Pyrophosphate d'isopentenyle

LIP: Lipases

MEC : matrice extra cellulaire

MVA : acide mévalonique

PLB: phospho lipases B

R : radical

Saps : protéases aspartiques sécrétées

SM : solution mère

UFC : unité fondamentale des colonies

Figure N°	Titre	Page
01	Photographie originale de <i>C. calcitrapa</i> .	04
02	Structure de base des flavonoïdes	08
03	Les différentes structures des flavonoïdes de <i>Centaurea calcitrapa</i> .	09
04	Les différentes structures des sesquiterpène lactones de <i>C. calcitrapa</i> .	10
05	Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux réalisée par différentes concentration de l'acide caféique.	27
06	Teneurs en composés phénoliques pour les deux extraits de <i>Centaurea calcitrapa</i> .	28
07	Les zones d'inhibitions de <i>Candida albicans</i> sous l'action de la quercétine.	30
08	Photographies originales montrant le pouvoir antifongique des extraits des feuilles sèches est fraîches de l'espèce végétale <i>Centaurea calcitrapa</i> comparés aux témoins antifongique, le fluconazole.	31
09	Résultats sur microplaque montrant la CMI pour la souche fongique <i>Candida albicans</i> après 24h et 48h d'incubation.	33
10	Histogramme des pourcentages de croissance de <i>C. albicans</i> en présence de différentes concentrations des extraits de <i>C. calcitrapa</i> , le Fluconazole et l'acide caféique après 24h d'incubation.	34
11	Histogramme des pourcentages de croissance de <i>C. albicans</i> en présence de différentes concentrations des extraits de <i>C. calcitrapa</i> , le Fluconazole et l'acide caféique après 48h d'incubation.	35
12	Histogramme de pourcentage d'inhibition de <i>C. albicans</i> en présence de différentes concentrations des extraits de <i>C. calcitrapa</i> , le Fluconazole et l'acide caféique après 24h d'incubation.	36
13	Histogramme de pourcentage d'inhibition de <i>C. albicans</i> en présence de différentes concentrations des extraits de <i>C. calcitrapa</i> , le Fluconazole et l'acide caféique après 48h d'incubation.	37

N° Tableau	Titre	Page
I	Liste des produits chimiques et matériel de laboratoire utilisé	19
II	Les rendements des deux extraits éthanoliques de <i>Centaurea calcitrapa</i>	26
III	Résultats d'évaluation de l'activité antifongique selon la technique de la diffusion en milieu solide.	30

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des principales abréviations

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur <i>Centaurea calcitrapa</i>	03
I.1.1 Famille des Astéracée	03
I.1.2 Présentation du genre <i>Centaurea</i>	03
I.1.3 Présentation de l'espèce <i>Centaurea calcitrapa</i>	04
I.1.4 Classification de <i>Centaurea calcitrapa</i>	05
I.1.5 Utilisation de la plante	05
I.1.6 Métabolites secondaires des plantes	07
I.1.7 Composition chimique de <i>C. calcitrapa</i>	07
I.1.7.1 Flavonoïdes	07
I.1.7.2 Sesquiterpènes-lactones	09
I.1.8 Activités biologiques de <i>Centaurea calcitrapa</i>	10
I.2 Antifongiques.....	11
I.2.1 Mécanismes d'action antifongique	11
I.3 <i>Candida albicans</i>	12
I.3.1 Facteurs de virulence	13
I.3.2 Résistances chez <i>C. albicans</i>	16
I.4 Activité antifongique des plantes médicinales.....	18

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1 Matériel.....	19
II.1.1 Matériel biologique.....	19
II.1.2 Matériel non biologique.....	19

II.2 Méthodes	20
II.2.1 Méthode de préparation des extraits	20
II.2.2 Dosage des polyphénols totaux	21
II.2.3 Méthode microbiologique.....	21
II.2.4 Méthode d'évaluation d'activité antifongique.....	24
II.2.4.1 Technique de diffusion en milieu solide.....	24
II.2.4.2 Technique de dilution en milieu liquide	25
II.2.5 Analyse statistique	25

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Méthodes d'extraction et taux des extraits	26
III.2 Résultats de dosage des polyphénols totaux.....	27
III.3 Résultats des tests antifongiques	29
III.3.1 Test de diffusion sur milieu solide	29
III.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice	33
Conclusion et perspectives	40
<i>Références bibliographiques</i>	41
<i>Résumé</i>	

INTRODUCTION



Depuis très longtemps, l'Homme s'est trouvé relativement désarmé devant les maladies causées par les champignons, parmi lesquelles on trouve la candidose causée par les levures de genre *Candida* plus fréquemment. Elles peuvent être de localisations superficielles ou toucher certains organes et tissus plus profonds et deviennent d'une forme invasive. Ces infections touchent près d'un milliard de personnes dans le monde et elles sont caractérisées par une mortalité attribuable de l'ordre de 40% (**Gudlaugsson et al., 2003, Tortorano et al., 2004, Pagano et al., 2006**).

Les infections fongiques invasives touchent plus particulièrement les patients dont la prise en charge est déjà lourde et exposés à certains facteurs de risque, également des populations fragilisées par leurs pathologies sous-jacentes, tels que les prématurés, les grands brûlés, les patients polytraumatisés ou les patients admis dans les unités de réanimation médicales/chirurgicales (**Kauffman, 2006**).

En raison de la difficulté de diagnostic et la forte résistance de *Candida sp.* face aux antibiotiques synthétiques, les chercheurs se dirigent vers un remède naturel, on effectue des études sur l'exploration des ressources naturelles, notamment les plantes médicinales qui apparaissent comme une piste prometteuse, car elles constituent une grande réserve de substances actives, elles sont facilement accessibles et largement utilisées dans la médecine traditionnelle contre différentes pathologies difficiles à traiter par les médicaments disponibles sur le marché (**Hajji, 2016**).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée dont fait partie les espèces de genre *Centaurea*. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle et ont montré plusieurs activités biologiques, tels que: anti-inflammatoire, diurétique, antipyrétique, cytotoxique et antimicrobiennes. Ces diverses activités pourraient être dues aux nombreux composés d'intérêt biologique qu'elles contiennent, tels que les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques (**Arif et al., 2004 ; Toribio et al., 2004**).

La valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne nous a conduits à s'intéresser à l'activité antimicrobienne de *Centaurea calcitrapa*. Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont le but principal est de rechercher une probable activité antifongique des extraits des feuilles de *Centaurea calcitrapa* sur la souche fongique *Candida albicans*.

Notre présent manuscrit est divisé en trois parties :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique regroupant des généralités sur l'espèce végétale et ses caractéristiques. De plus, nous présentons un aperçu sur les antifongiques, leur mode d'action et les types de résistance contre les antifongiques et enfin, nous décrivons les principales caractéristiques de l'espèce fongique, *C. albicans*.

Le deuxième chapitre est dédié à la présentation du matériel et des protocoles expérimentaux réalisés par des chercheurs pour l'extraction, la recherche de leurs activités antifongiques vis-à-vis du germe fongique *C. albicans*.

Le dernier chapitre illustre les résultats obtenus et leurs discussions, ce manuscrit se termine par une conclusion générale résumant les principaux acquis de ce travail et enfin, souligner quelques perspectives à cette étude.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



I.1 Généralités sur *Centaurea calcitrapa*

I.1.1 Famille des Astéracées

La famille des Astéracées ou ce qu'on appelle composées (connue sous le nom de famille des asters, des marguerites ou des tournesols) (**Rahman, 2013**) est parmi les familles botaniques les plus vastes sur terre en terme de nombre d'espèces avec environ 1600 genres et 25000 espèces répartis à travers le monde entier (**Nikolić et Stevović, 2015**).

Le nom «*Asteraceae*», est dérivé du genre type *Aster* ; qui est un mot grec signifiant étoile, en relation avec la forme de la fleur, tandis que «*Compositae*», un nom plus ancien mais toujours valide et qui se réfère à l'inflorescence caractéristique (**Rahman, 2013**), qui se traduit en forme de tête, *capitulum*, qui ressemble à une grande fleur unique, souvent cette inflorescence se compose de dizaines à centaines de fleurs individuelles qui sont spécialisées dans la structure et la fonction (**Tähtiharju et al., 2012**). Elle est considérée comme une famille monophylétique ; il y a une énorme quantité de variabilité entre les membres au sein de la famille, où ils peuvent varier d'herbes annuelles et vivaces à arbustes ou même arbres et ils poussent dans presque tous les types d'habitat, quel que soit le climat (**Benamara-Bellagha, 2015**).

I.1.2 Présentation du genre *Centaurea*

Les espèces appartenant à ce genre se caractérisent par une morphologie florale où leurs fleurs s'entourent d'un involucre, ce dernier constitué de petites bractées qui se chevauchent comme des bardeaux mais par contre, il y a certaines espèces caractérisées par des bractées frangées ou légèrement poilues, tandis que d'autres sont entières. Leurs couleurs varient entre le rose, le violet et le pourpre. Le réceptacle est tapissé d'une soie abondante. Les anthères sont soudées à la base ; le style est une branche courte, avec des glands à feuilles persistantes ou bien caduques. Ce genre est assez proche des chardons, mais s'en distingue par des feuilles polymorphes alternes non épineuses (**Khammar et Djeddi, 2012**).

Le genre botanique *Centaurea* fait partie de l'un des genres les plus importants de la famille Astéraceae (**Zengin et al., 2016**) ; il inclut 800 espèces qui se répartissent principalement dans les régions méditerranéennes, et l'Asie du Sud-Ouest et surtout elle possède le taux le plus élevé d'endémicité qui se trouve en Turquie (**Aydin et al., 2013**).

I.1.3 Présentation de l'espèce *Centaurea calcitrapa*

Une cinquantaine d'espèces du genre *Centaurea* poussent en Algérie, parmi lesquelles on trouve *Centaurea calcitrapa*, connue aussi sous le nom de *BouNeggar*. (Kitouni et al., 2015). Le nom scientifique *calcitrapa* vient du mot « catrop », qui est une arme ancienne munie des pointes saillantes et qui a été utilisée contre les guerriers pour leur barrer le passage (Roche et Roche, 1998). C'est une plante qui agit parfois comme annuelle à vivace de courte durée (Figure 01), ses fleurs sont entourées par des épines longues et pointues qui lui permettent de se protéger. Les plantes matures ont une hauteur de 0,2 à 1,2m (Pitcairn et al., 2002). Elles ont une racine pivotante robuste qui est rigidement ramifiée avec des tiges dressées, et les feuilles sont pourvues de poils fins. Les feuilles inférieures sont profondément divisées en segments oblongs et linéaires, tandis que les feuilles supérieures sont étroites et non divisées et s'effilent à l'extrémité. Elles forment des rosettes dans leur première saison de croissance avec des feuilles pennées et lobées qui ont des poils gris sur leur surface. Par contre, celles qui vieillissent ont des cercles d'épines au centre. Cette plante produit de nombreux capitons. Les bractées du capitule sont terminées par une épine rigide de couleur paille, d'environ 1,5 cm de long. Les fruits de cette souche violette (akène) sont d'environ 1/8 de pouce de long et n'ont pas de soies, ils sont de couleur paille et tachetée de brun foncé (Roche et Roche, 1998).



Figure 01 : Photographies originales de *C. Calcitrapa*.

I.1.4 Classification de *Centaurea calcitrapa*

Selon **Quezel et Santa (1963)**, la classification de *Centaurea Calcitrapa* est la suivante :

- **Règne** : Plante
- **Embranchement** : Angiospèrnes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Ordre** : Asterales
- **Famille** : Astéracées
- **Sous-famille** : Tubiflores
- **Tribu** : Cynarées
- **Genre** : *Centaurea*
- **Espèce** : *Centaurea calcitrapa*

I.1.5 Utilisation de la plante

I.1.5.1 Médecines anciennes

La santé a toujours eu une grande importance pour tous les êtres vivants, c'est la base de notre existence. En effet, l'utilisation de plantes pour le traitement, était connue chez les animaux qui les utilisent naturellement dans leur alimentation, ainsi pour l'Homme primitif, de là est née la médecine traditionnelle.

La relation humaine avec les plantes est une relation ancienne, et son usage médicinal est lié aux cultures et aux croyances religieuses des peuples. De ce fait, on leur attribuait des pouvoirs surnaturels, où ils étaient habitués à les utiliser dans la magie pour exorciser le mal qui est la maladie selon leur croyance (**Vinel et al., 1976**).

Avec l'évolution de l'Homme, les modes d'emploi des plantes médicinales dans les diverses civilisations anciennes ont également été développés. La médecine chinoise ancienne se base sur la phytothérapie qui est fondée sur des lois universelles et sur une perception intime de la nature humaine (**Triadou et al., 2011**). Également dans les civilisations connues pour leur riche contribution aux connaissances scientifiques dans le domaine de la médecine du monde antique, la médecine grecque, romaine et arabe ont ensuite développé leur propre recherche, observations chimiques et expérimentations, dans les domaines de la médecine et de la pharmacie (**Zgheib, 2020**). En fait, la phytothérapie reste un fruit d'une longue coopération transfrontalière sur notre terre planète, et jusqu'à aujourd'hui, les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments.

I.1.5.2 Usage traditionnel de *Centaurea calcitrapa*

En raison de la grande diversité des plantes médicinales et de leur usage dans divers domaines médicaux, elles ont une importance sublime dans la vie quotidienne des algériens, et parmi les plantes médicinales connues en Algérie, on trouve le genre de *Centaurea* qui est largement réparti dans des régions différentes, et qui se caractérise par sa capacité à s'adapter à des endroits différents (**Bloued, 1998; Baba Aissa, 1999**).

Les espèces du genre *Centaurea* possèdent plusieurs vertus thérapeutiques et ont montré des activités stimulantes, antipyrétiques, dimétiques, cholérétiques, anti-inflammatoires, et antibactériens (**Arif et al., 2004**).

L'espèce *Centaurea calcitrapa*, qui a fait objet de plusieurs études actuelles, est utilisée dans l'alimentation, soit comme matière première, soit sous forme transformée, en médecine populaire pour le traitement de diverses maladies (**Dimkić et al., 2020**). En Afrique du nord, la plante entière est amère-astringente, antifièvre et stomacale. Dans la flore algérienne, *Centaurea calcitrapa* est connue sous le nom de 'hassak' et 'bounaggar' et est utilisée pour la fièvre intermittente et les maladies oculaires. De plus, les racines et les fruits sont diurétiques et les graines sont utilisées pour les calculs rénaux (**Reda et al., 2021**).

Par ailleurs, dans le sud de l'Italie (région des vautours), les jeunes pousses et les feuilles de *C. calcitrapa* sont consommées fraîches dans les salades et bouillies avec d'autres plantes herbacées non cultivées. Traditionnellement en Italie, *Centaurea calcitrapa* était utilisée pour traiter les yeux, les fièvres communes, la jaunisse, les troubles digestifs et les problèmes dermatologiques (**Senator et al., 2006 ; Dimkić et al., 2020**).

En Syrie, les graines et les racines de *C. calcitrapa* sont utilisées comme stimulateur d'appétit et pour la diarrhée. Dans la médecine traditionnelle turque, ses fleurs sont employées dans le traitement de la fièvre, alors que les racines et les fruits ont un pouvoir diurétique, et l'infusion du végétal entier est utilisée comme laxatif et apéritif (**Seghiri, 2007 ; Reda et al., 2021**). Ces vertus naturelles de *C. calcitrapa* médicalement bénéfiques et dépourvues des effets secondaires avérées, sont probablement dues à sa richesse en composants biochimiques actifs.

I.1.6 Métabolites secondaires des plantes

Les plantes, une véritable usine chimique, produisent un grand nombre de composés chimiques qui jouent des rôles différents pour la plante ; en défenses, protections, les interactions biologiques avec leurs environnements. Ces composés phyto-chimiques ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. On les appelle donc des métabolites secondaires, qui sont indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires sont en très grand nombre, répartis dans les divers parties de la plantes ; racines, tige, feuilles, fleurs. L'activité de ces substances dépend principalement de leur nature chimique et de leur concentration. Chaque composé de ces métabolites secondaires peut présenter plusieurs activités biologiques. Ils sont classés en 3 grandes catégories ; les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (**Hartmann, 2007**).

Les laboratoires pharmaceutiques sont toujours prêts à l'élaboration de nouveaux composés actifs, à l'identification, à la caractérisation des molécules naturelles et à la mise au point des médicaments qui ont pour origine des substances naturelles et de s'inspirer de leurs structures moléculaires pour imaginer de nouveaux médicaments (**Hartmann, 2007**).

I.1.7 Composition chimique de *C. calcitrapa*

Plusieurs études sont encore en cours de recherche pour découvrir de nouvelles activités aux molécules naturelles. Les recherches qui sont réalisées sur *C. calcitrapa*, ont démontré la présence des composés de deux classes essentielles de métabolites secondaires ; les terpènes (sesquiterpènes- lactones) et les polyphénols (flavonoïdes) (**Toribio et al., 2004**).

I.1.7.1 Flavonoïdes

Les composés phénoliques correspondent à une grande variété de substances possédant un groupe phénol « anneau aromatique avec au moins un groupe hydroxyle ». Ils ont été isolés par le scientifique Eugène Chervreul en 1814, mais n'ont été réellement découverts qu'en 1937, par Albert Szent-Györgyi (**Nijveldt et al., 2001**). Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune" sont généralement de couleurs jaunes. Ils constituent l'un des grands groupes des polyphénols, très répandus dans les végétaux supérieurs et les plantes vasculaires, à l'exception des algues. On les trouve essentiellement dans les feuilles et les fleurs. Mais ils sont également signalés dans les racines, le bois, l'écorce, le pollen, le nectar,

les baies et les grains. Sont présents en quantités importantes dans une grande variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'Homme (Markham, 1982).

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, Même si le terme flavonoïde signifie jaune en latin, les couleurs des flavonoïdes varient. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs. Ils peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes contre les insectes par leur goût désagréable, en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils accentuent la résistance des plantes aux stress environnementaux, en assurant la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet. Lors d'une infection causée par des champignons ou par des bactéries, Certains d'entre eux jouent également un rôle de défense, phyto-alexines, par un excès de synthèses (Bénard, 2009; Seghiri, 2009).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances existent à la fois sous forme libre ou sous forme glycosylés (les hétérosides, les flavonoïdes glycosylés). Ils peuvent avoir plusieurs différents substituants (Seghiri, 2009).

- **La structure de base des flavonoïdes**

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles phényles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 qui est communément cyclisée pour former le cycle C (Figure 02). Ils possèdent tous le même élément structural de base, Car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune (Bruneton, 1999).

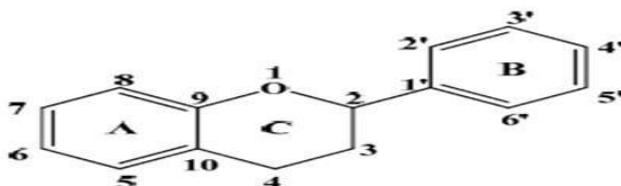


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes présents dans *C. calcitrapa* sont : Apigénine (1), Apigénine-7-O-méthylglucuronide (2), Luteoline (3), Hispiduline (4), Hesperidine (5), Jaceosidine (6), Pictolarigenine (7), Vitexine (8), Jaceine (9), Centaureine (10), Kaempferol (11), Quercétine (12), Rutine (13), Morine (14), Naringénine (15), Fisétine (16), Dihydroquercétine (17), Astragaline (18), Helichrysine, Quercétin 3-O-glucoside (19), Kaempferol-3-O-glucoside (20), Kaempferol 6-méthylether 7-O-glucoside (21), Kaempferol 6-méthylether 3-O-glucoside (22), Kaempferol 3-O-rutinoside (23), Kaempferol-6-méthylether (24) (Kitouni, 2009). Les structures de ces composés sont illustrées dans la Figure 03.

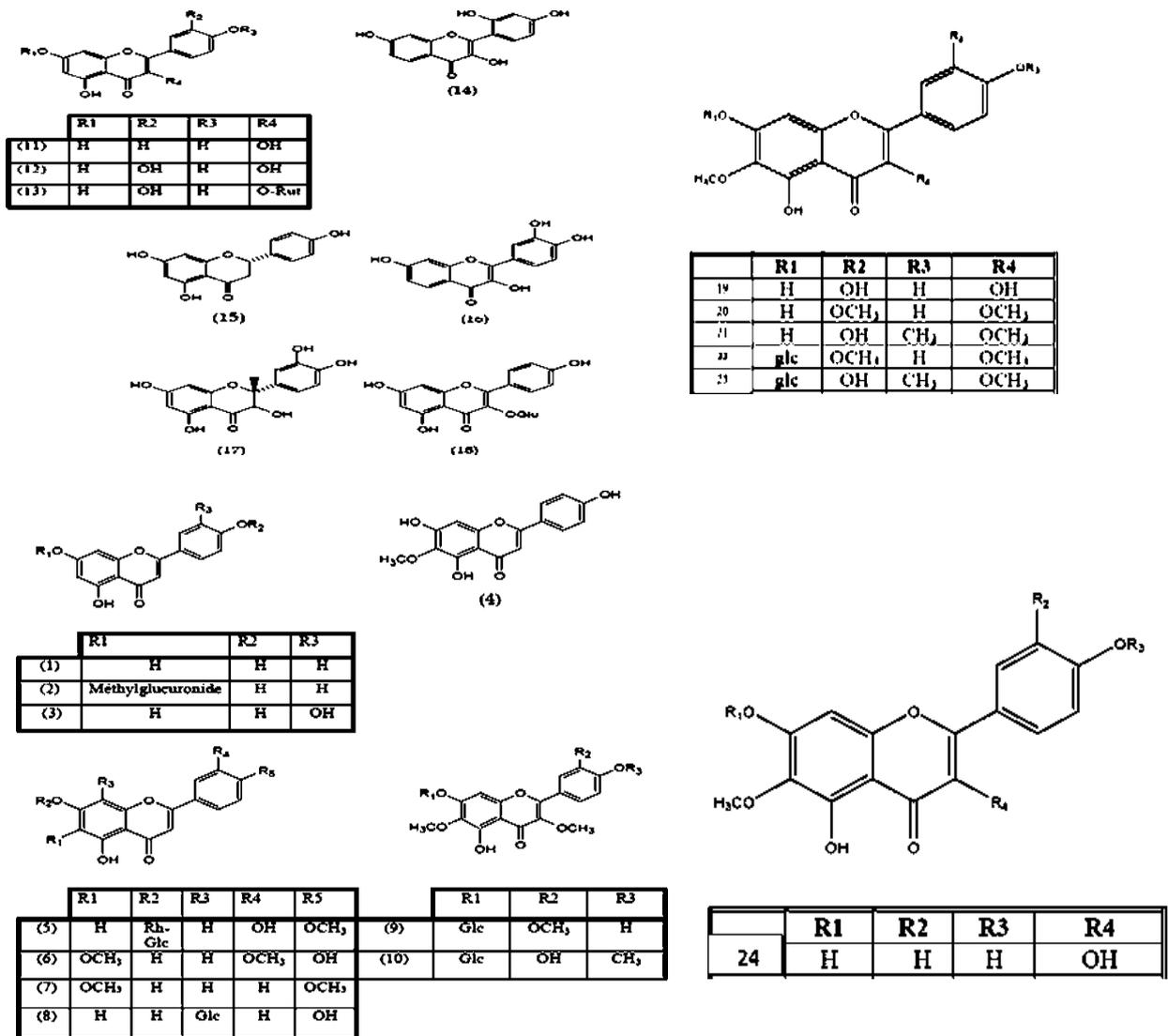


Figure 03: Les différentes structures des flavonoïdes de *Centaurea calcitrapa* (Kitouni, 2009).

I.1.7.2 Sesquiterpènes-lactones

Les lactones sesqui-terpéniques sont des métabolites secondaires des végétaux qui dérivent de la famille des terpènes. Ils constituent un groupe numériquement important des substances,

plus de 3000 structures ont été identifiées (Bruneton, 1999). Ils ont une distribution botanique assez sporadique, présentes chez les angiospermes (Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae) et très majoritairement chez les astéracées (Bruneton, 1993), d'où des études effectuées sur les différentes familles des plantes qui montrent que près de 90% des lactones ont été isolées à partir de la famille des Composées (Fischer *et al.*, 1979). Chez ces dernières, les lactones sont fréquemment localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence et dans les racines (Bruneton, 1993). Ils ont été reconnus comme étant des principes amers (Bruneton, 1999), biologiquement actives et présentent des propriétés cytotoxiques, antimicrobiennes, antifongiques, anti-parasitaire et antibactérienne (Park *et al.*, 1998).

Suivant la structure du noyau, on peut les subdiviser en plusieurs types : guaianolides, germacranolides, eudesmanolides, xanthanolides, pseudoguaianolides, élemanolides, séco-eudesmanolides, éremophilanolides et bakkenolides (Fraga, 1998).

Les sesquiterpènes-lactones présentes dans *C. calcitrapa* sont : Salotenolide (1), Cnicine (2), l'acétoxycnicine (3), 11 β , 13 dihydrosalonitenolide (4), 11 α ,13dihydro salonitenolide (5), 15-hydroxy-8 α -(1',2' dihydroxyethyl)acryloxyelema1,3,11(13)-trien,12olide (Kitouni, 2009). Les structures de ces composés sont illustrées dans la Figure 04.

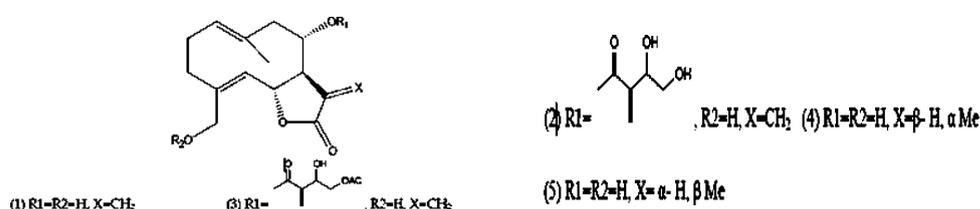


Figure 04 : Les différentes structures des sesquiterpènes lactones de *C. Calcitrapa* (Kitouni, 2009).

I.1.8 Activités biologiques de *Centaurea calcitrapa*

De nombreuses espèces de genre *Centaurea* possèdent des propriétés pharmacologiques remarquables grâce à leur richesse en composés bioactifs, révélés par plusieurs études ayant exhibé différentes activités biologiques. Des recherches antérieures ont été également menées sur différents extraits de l'espèce *C. calcitrapa*, qui ont montré une gamme d'activités (Dimkić *et al.*, 2020), parmi lesquelles on cite: l'activité antioxydante (Kaskoos, 2013 ; Trabsa *et al.*, 2020), activité anticancéreuse (Larocca *et al.*, 1994) et l'activité antimicrobienne notamment l'activité antifongique (Aboody et Mickymaray, 2020).

En effet, ils ont trouvé que les métabolites secondaires de *C. calcitrapa*, tel que les flavonoïdes qui se sont révélés être des agents antifongiques, prometteurs, efficaces et rentables pour l'inhibition des infections fongiques. Ils inhibent souvent la croissance fongique selon divers mécanismes sous-jacents en renforçant la perturbation de la membrane plasmique et le dysfonctionnement mitochondrial, et inhibe la formation de la paroi cellulaire, la division cellulaire, la synthèse des protéines et le système de pompage médié par l'efflux (Aboody et Mickymary, 2020). De même, il a été prouvé que certaines lactones sesquiterpéniques ont des propriétés antimicrobiennes, particulièrement reconnues au sein de la famille des Asteraceae, par modification de la membrane cellulaire de l'organisme agresseur (Picman, 1986).

I.2 Antifongiques

Les antifongiques sont des substances chimiques produites par des microorganismes ou par synthèse chimique à partir de molécules dérivant de composés naturels des plantes, qui ont constitué une bonne source d'agents anti-infectieux et servent de mécanismes de défense contre la prédation par les micro-organismes. Ces agents antifongiques sont capables d'inhiber spécifiquement les différents champignons isolés en mycologie médicale et responsables de mycose (Cowan, 1999 ; Iwu *et al.*, 1999). On distingue les molécules fongicides, qui vont détruire le champignon pathogène et les molécules fongistatiques, qui vont limiter le développement du mycète qui sera ensuite éliminé lors du renouvellement tissulaire. La plupart des antifongiques utilisés pour les infections fongiques sont des fongistatiques (Brans, 2015).

I.2.1 Mécanismes d'action antifongiques

I.2.1.1 Altération de la structure de la paroi fongique

La paroi cellulaire fongique a une structure rigide qui est constituée d'un large panel de polysaccharides. Le (1; 3)-B-D-glucane est le principal constituant de la paroi fongique. L'inhibition de cette dernière perturbe l'intégrité de la paroi cellulaire (Bernard *et al.*, 2001).

I.2.1.1 Troubles de la perméabilité membranaire

Les membranes plasmiques des champignons sont principalement composées d'ergostérol. Certains antifongiques inhibent la synthèse de l'ergostérol par blocage de la déméthylation (14-déméthylase) du lanosterol ou interaction directe avec l'ergostérol et entraîne des changements structurels de la membrane lipidique, augmentant sa perméabilité par la

formation de pores aqueux à travers lesquels les matières cytoplasmiques essentielles s'infiltrent et détruisent ainsi le gradient de protons pouvant causer la mort cellulaire (Nigam, 2015).

I.2.1.3 Perturbation de divers métabolismes

Des antifongiques inhibent le métabolisme énergétique des cellules fongiques, en empêchant la captation et l'incorporation des substrats (ions métalliques, phosphates et potassium) nécessaires à la croissance de la cellule et en chélatant le fer indispensable au fonctionnement de nombreuses enzymes (action fongistatique). De plus, elles bloquent la synthèse de l'ATP mitochondrial (action fongicide), ce qui perturbe de façon irréversible les fonctions respiratoires de la cellule fongique (Brans, 2015).

I.2.1.4 Altération du cycle cellulaire

Par l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) ou protéine; altère le fonctionnement des microtubules de la cellule fongique en bloquant sa mitose, ce qui inhibe la croissance du champignon (Brans, 2015).

I.3 *Candida albicans*

Les *Candida* sont des champignons levuriformes polymorphes qui se reproduisent par bourgeonnement. C'est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie, diploïde pouvant mesurer de 3 à 15 µm. Elles sont fréquemment retrouvées dans les muqueuses et sur la peau, c'est pourquoi elles sont décrites comme des microorganismes commensaux. Il s'agit d'une levure cosmopolite, opportuniste eucaryote dont la phylogénie, selon (Berkhout, 1923), est la suivante:

- **Règne :** Fungi
- **Phylum :** Ascomycota
- **Classe :** Hemiascomycètes
- **Ordre :** Saccharomycétales
- **Famille :** Candidaceae
- **Genre :** *Candida*
- **Espèce :** *Candida albicans*

L'espèce la plus représentative de ce genre est *Candida albicans*, une levure commensale, qui fait partie du microbiote humain sain, colonisant le tube digestif (GI), l'appareil reproducteur, la cavité buccale et la peau de la plupart des humains. Chez des individus avec un système immunitaire sain, *C. albicans* est souvent inoffensif, maintenu en équilibre avec

autres membres du microbiote local. Cependant, les perturbations de cet équilibre délicat causées par l'utilisation croissante d'antibiotiques et d'immunosuppresseurs, la transplantation d'organes et de moelle osseuse, le traitement des maladies auto-immunes ou chez les patients atteints du VIH-SIDA, qui dû au changement dans la réponse immunitaire de l'hôte ou des variations de l'environnement local, changement de pH ou limitation des nutriments induisent une compétition entre les bactéries et les champignons, ce qui peut permettre à *C. albicans* de proliférer et de provoquer une infection (Nobile et Johnson, 2015).

Les infections peuvent être superficielles, impliquant la cavité buccale et cavités auditives, organes génitaux, peau et ongles (le muguet, l'érythème fessier et les infections vaginales à levures). Ces infections restent relativement simples à diagnostiquer et à traiter contrairement aux infections profondes qui recouvrent les septicémies à *Candida* et les affections viscérales profondes initiées le plus souvent par une dissémination hématogène. Elles surviennent surtout chez des patients hautement fragilisés (Patients SIDA, sous-chimiothérapie anticancéreuse ou thérapies d'immunosuppression, et les personnes ayant des dispositifs médicaux) (Nobile et Johnson, 2015).

Afin d'établir une infection, les agents pathogènes opportunistes doivent échapper au système immunitaire, survivre et se diviser dans l'environnement hôte et se propager à de nouveaux tissus par un ensemble des facteurs qui lui permettent d'effectuer leurs pathogénicités.

I.3.1 Facteurs de virulence

Candida albicans exprime plusieurs facteurs de virulence qui sont strictement associés avec l'état pathogène de l'organisme. Selon furman (1983), ces facteurs sont définis comme étant l'ensemble des caractères requis pour établir la maladie. Les sections suivantes décriront les attributs les plus importants pour l'interaction de *Candida* avec son hôte.

I.3.1.1 Adhésion

L'adhérence de *C. albicans* aux cellules hôtes est considérée comme une étape précoce essentielle pour initier et maintenir l'interaction hôte/levure. Les adhésines peuvent être définies comme des biomolécules qui initient l'adhérence de *C. albicans* aux cellules ou aux ligands de l'hôte. Le meilleur groupe d'adhésines étudié est l'Als « agglutinin-like sequence ». L'ALS3, qui s'exprime spécifiquement sur les hyphes, favorise directement l'adhésion, tandis qu'ALS1-4 comporte les adhésines spécifiques des tubes germinatifs et des hyphes. Une autre molécule Hyphal Wall protéine 1 (Hwp1) associée aux hyphes, joue également un rôle

important dans la médiation à l'adhésion des cellules épithéliales de l'hôte avec la paroi cellulaire de *C. albicans* par une intégration de manière covalente avec plusieurs ligands de matrice extracellulaire (ECM) (Höfs *et al.*, 2015).

Les hyphes sont généralement considérés comme la morphologie la plus adhérente de *C. albicans*, la formation d'hyphes étant induite après le premier contact avec la surface d'une cellule hôte. Cependant, une fois les hyphes formés, les adhésines exprimées exclusivement sur la surface des cellules hyphales sont d'une importance majeure pour d'autres processus d'adhésion (Höfs *et al.*, 2015).

I.3.1.2 Enzymes lytiques sécrétées

Après adhésion à la surfaces de la cellule hôte et croissance des hyphes, ces derniers peuvent sécréter des hydrolases, qui ont été associées à l'invasion dans les cellules hôtes. Trois différentes classes d'hydrolases sécrétées sont exprimées par *C. albicans* : La famille des protéases aspartiques sécrétées (Saps) composée d'une dizaine de gènes, SAP1 à SAP10, Sap1–8 sont sécrétées et libérées, tandis que Sap9 et Sap10 restent liées à la surface cellulaire. Ces enzymes sont des facteurs de virulence clés de la pathogénèse des *Candida* par dégradation de protéines humaines et modulation de la virulence, ainsi que par leurre du système immunitaire. La famille des phospholipases se compose de quatre classes différentes (A, B, C et D), seuls les cinq membres de la classe B (PLB1 à 5) sont extracellulaires et peuvent contribuer à la pathogénicité par perturbation des membranes de l'hôte. Cependant, la troisième famille d'hydrolases sécrétées, les lipases, se composent de 10 membres (LIP1-10) dont leur mécanisme reste pas claire (Mayer *et al.*, 2013).

I.3.1.3 Morphogenèse

C. albicans est un champignon diploïde polymorphe capable de changements morphologiques majeurs allant de la forme levure unicellulaire ovoïde (blastospores) à la forme filamenteuse soit pseudohyphes, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien ou hyphes vrai correspondant à un champignon filamenteux hautement polarisé avec des bords parallèles. De tous les *Candida* spp., seuls *C. albicans* et *Candida dubliniensis* peuvent former des mycéliums vrais qui favorisent l'invasion des tissus et des organes de l'hôte. La formation des mycéliums et certains blastoconidie peuvent aboutir à la formation des chlamydoconidies, qui sont des structures mesurant deux fois et plus la taille d'une blastospore et possèdent une paroi plus épaisse (Staib et Morschhauser, 2006 ; Mayer *et al.*, 2013).

Un certain nombre de conditions environnementales favorisent ces transitions morphologiques, tel que la température, le CO₂ et le pH, dont à faible pH (< 6), les cellules de *C. albicans* prédominent et se trouvent sous forme de levure, tandis qu'à un pH élevé (> 7) la croissance des hyphes est induite (Mayer *et al.*, 2013).

I.3.1.4 Quorum sensing

Le quorum sensing est le phénomène de signalisation ou de communication entre les cellules chez les micro-organismes. Il est également un outil de communication chez *Candida albicans* entre eux et qui se traduit par une signalisation à l'aide des molécules de détection de quorum solubles ou des auto-inducteurs qui sont sécrétés dans l'environnement, afin de réguler la croissance des levures. La première molécule découverte est le farnesol qui inhibe la transition levure-hyphes. Tandis que, le tyrosol a un effet antagoniste, il stimule plutôt la formation du tube germinatif dans les cellules de levures (Mallick et Bennett, 2013).

I.3.1.5 Formation de biofilms

Les biofilms microbiens sont des communautés de cellules qui adhèrent à des surfaces solides ou sont présentes aux interfaces liquide-air, et ils sont considérés comme l'état de croissance le plus courant pour de nombreuses espèces microbiennes. Les cellules des biofilms ont des propriétés différentes de leurs homologues planctoniques ; par exemple, elles sont souvent plus résistantes aux médicaments et aux perturbations. Cependant, ces biofilms ont été observés dans des environnements aquatiques, sur des structures industrielles artificielles, sur des dispositifs médicaux implantés et sur des tissus de plantes et de mammifères. Bien que de nombreux micro-organismes soient capables de former des biofilms mono-espèces, il est beaucoup plus courant de trouver deux ou plusieurs espèces bactériennes et/ou fongiques dans un biofilm (Lohse, 2018). En général, le processus de développement du biofilm de *C. albicans* peut être divisé en quatre étapes principales :

L'adhésion à une surface : Les micro-organismes entrent en contact avec une surface solide, ce qui entraîne la formation d'une couche basale de cellule d'ancrage et induire un changement physiologique profond dans les cellules qui va les faire passer vers la seconde étape du développement de biofilm (Pereira *et al.*, 2021).

La prolifération : Cette étape implique la formation de filaments, où les cellules de levure commencent à s'étirer et à se développer en hyphes filamenteux (Pereira *et al.*, 2021).

La maturation : La maturation du biofilm, qui donne lieu à un réseau complexe de plusieurs couches de cellules polymorphes, y compris des cellules hyphales (chaînes de cellules cylindriques), des cellules pseudohyphales (cellules ellipsoïdales jointes bout à bout) et des cellules de levure rondes, enfermées dans une matrice extracellulaire, ce qui donne au biofilm un aspect épais et structuré et le protège des blessures chimiques et physiques (**Gulati et Nobile, 2016**).

Le Détachement – Dispersion : Enfin, au stade de la dispersion, les cellules de levures sont libérées du biofilm mature et peuvent se propager à des endroits éloignés pour démarrer un nouveau cycle de formation de biofilm (**Pereira et al., 2021**)

I.3.2 Résistances chez *C. albicans*

La résistance d'un micro-organisme est sa faculté à s'opposer à l'action d'un médicament. Deux types de résistances sont à distinguer : la résistance intrinsèque ou naturelle qui est une caractéristique propre à l'espèce et la résistance acquise qui correspond au développement d'une résistance à un traitement d'une espèce habituellement sensible. Elle apparaît progressivement après exposition à ce traitement (**Dannaoui, 2013**).

I.3.2.1 Résistance aux antifongiques

- **Les Polyènes**

Les résistances aux polyènes sont assez rares car ces composés n'ont pas besoin de pénétrer dans les cellules fongiques pour exercer leur effet. Le principal mécanisme de résistance observé est l'absence de la cible ergostérol, qui est un composant majeur de la membrane plasmique fongique, en formant des pores à son niveau (**Guerineau, 2015**).

- **Les Echinocandines**

Les résistances aux échinocandines sont relativement rares. Le seul mécanisme démontré de la résistance acquise aux échinocandines chez *Candida* correspond à la présence de mutations au niveau des gènes *fks* qui codent pour la cible de cette classe d'antifongiques, la bêta-1-3-D-glucane synthase (**Dannaoui, 2013**).

- **Les Dérivés azolés**

Les mécanismes de résistance fongique aux dérivés azolés sont les plus étudiés. En effet, de nombreux cas de résistance ont été décrits dès 1980, de part l'utilisation massive de ces molécules. Cependant, les mécanismes de résistance aux azolés sont variés et peuvent être

répartis en trois grands groupes où on constate une diminution de l'affinité des azolés pour leur cible par une mutation ponctuelle du gène ERG11, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14 α déméthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme. De plus, cette résistance peut également résulter d'une multiplication du nombre de copie de la 14-alpha-déméthylase. Dans cette situation, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14 α . Ainsi, la surexpression du gène ERG11, par duplication chromosomique ou modification du promoteur, comme l'augmentation de la demi-vie des ARNm, peut aboutir à la résistance. Enfin le phénomène d'efflux par surproduction de transporteurs, entraînant une diminution de la concentration intracellulaire de l'antifongique (Vandeputte, 2008).

- **Les analogues de la pyrimidine**

La résistance acquise à la 5-fluorocytosine peut apparaître rapidement au cours d'un traitement d'une infection à *Candida*, ce qui ne permet pas d'utiliser cette molécule en monothérapie. De ce fait, la 5-fluorocytosine est indiquée uniquement en association avec un autre antifongique, le plus souvent l'amphotéricine B ou plus récemment aux dérivés azolés. La résistance est intrinsèque (*C. tropicalis*) ou acquise (concerne 7 à 8 % d'isolats résistants pour le genre *Candida*). Les mécanismes mis en jeu sont le plus souvent un excès de cible ou une mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme (Guerineau, 2015).

I.3.2.2 Résistance par formation de biofilm

Au sein de biofilm, plusieurs mécanismes de résistance entrent en jeu. Une diffusion altérée des antifongiques au sein du biofilm est mise en évidence notamment à cause de la surexpression des pompes à efflux. Cependant, ces pompes contribuent à la résistance seulement dans les premières phases de formation du biofilm. Par ailleurs, il a été observé une modification de la composition en stérols de la membrane des cellules fongiques impliquées dans le biofilm. Au cours des phases intermédiaires et matures du biofilm, les concentrations en ergostérol diminuent, ce qui augmente la résistance aux azolés, l'ergostérol étant leur cible. (Guerineau, 2015).

I.4 Activité antifongique des plantes médicinales

Les plantes médicinales connues par leurs richesses en composés bioactifs qui servent comme un antibiotique stocké dans les cellules des plantes comme des formes liées inactives, mais qui sont facilement convertis en antibiotique biologiquement actif par hydrolyse enzymatique (glycosidases) en réponse à une attaque pathogène (**Lattanzio et al., 2006**).

Les métabolites secondaires exercent la plupart de leurs effets à travers des interactions avec les enzymes ou les protéines. Tandis que, certains de ces composés agissent en tant que substrats au niveau des récepteurs et imitent les substances endogènes dans l'organisme cible, d'autres perturbent les interactions protéine-protéine nécessaires pour la fonction normale de cellules (**Boulenouar, 2011**). Par conséquent, on observe une demande importante de nouveaux antifongiques présentant des structures moléculaires variées, une meilleure sélectivité d'action sur de nouvelles cibles biologiques et avec moins d'effets secondaires. Les composés antifongiques issus des plantes peuvent répondre à cette demande du fait de leur grande diversité structurale, et de la permanence de l'exposition des végétaux aux attaques fongiques (**Basset, 2001**).

Notre recherche bibliographique a fait appel à des intérêts croissants pour l'utilisation de produits naturels à base des plantes, où *Centaurea calcitrapa* offre un remède naturel pour de nombreux maux grâce à ses composés bioactifs. D'où découle l'objectif de cette étude qui est d'évaluer l'effet antifongique des extraits éthanoliques des feuilles de *Centaurea calcitrapa* vis-à-vis de l'espèce *Candida albicans* par des techniques d'antibiogrammes en milieu solide et liquide.

MATERIEL ET METHODES



II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique

II.1.1.1 Choix de la plante

Notre choix s'est porté sur *Centaurea calcitrapa*; une plante connue par sa large utilisation grâce à ses effets bénéfiques rapportés dans la recherche bibliographique. La plante a été récoltée au mois de juin 2021, dans la région de Iheddaden, Wilaya de Bejaia, Algérie.

II.1.1.2 Choix de la souche fongique

La souche de levure testée, *Candida albicans*, est connue par sa forte résistance vers les agents antimicrobiens. Elle nous a été fournie par le laboratoire DJAMA-Béjaia. Ce germe a été isolé d'un ECBU patients provenance du service des maladies infectieuses du CHU de Bejaia.

II.1.2 Matériel non biologique

Tableau I : Liste des produits chimiques et matériel de laboratoire utilisé

Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> • Bouillon Sabouraud Dextrose • Gélose Sabouraud • Bouillon nutritif 		
Réactifs	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorure de Sodium (NaCl) • Acide sulfurique (H₂SO₄) • Chlorure de Baryum (BaCl₂) • Le standard Mc Farland 0,5 	<ul style="list-style-type: none"> • Éthanol (C₂H₆O) • Méthanol • Eau distillée • Eau de javel • Quercitine 	
verrerie et autres	<ul style="list-style-type: none"> • Bécher • Spatule • Pince • Pipettes Pasteur • Micropipette • Boîtes de pétri • Ballon à fond rond • Eprouvette graduée 	<ul style="list-style-type: none"> • Cuve de spectrophotomètre • Flacons • Erlenmeyer • Entonnoir • Papier filtre • Papier film • Papier d'aluminium 	<ul style="list-style-type: none"> • Ecouvillons • Bec bunsen • Tubes à essai • Microplaques stériles • Tubes de centrifugations • Papier Whatman • Eppendorfs
Appareillage	<ul style="list-style-type: none"> • Autoclave, • Sonicateur, • Spectrophotomètre, • Bain-marie, 	<ul style="list-style-type: none"> • Balance, • Etuve, • Vortex • Plaque chauffante, • pH-mètre 	<ul style="list-style-type: none"> • Broyeur, • Tamiseur, • Centrifugeuse, • Rotavapeur,

II.2 Méthodes

II.2.1 Méthode de préparation des extraits

II.2.1.1 Broyage et extraction à partir des feuilles fraîches

A l'aide d'un mortier en porcelaine, la matière végétale a été broyée en rajoutant de l'éthanol, ensuite, elle est filtrée afin de récupérer les feuilles au-dessus du filtre. La même procédure a été refaite une seconde fois. Après le broyage, l'extrait éthanolique obtenu est évaporé à température n'excédant pas 40 °C par un rotavapeur et séché complètement à l'étuve à 37°C. L'extrait sec obtenu a été conservé à -20°C.

II.2.1.2 Préparation de la poudre

Les feuilles de la plante *C. calcitrapa* ont été séchées dans une étuve à 37°C, broyées à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisées afin d'obtenir une poudre de 63µm de diamètre. La poudre obtenue a été conservée à l'abri de l'air et de la lumière dans un flacon en verre hermétiquement fermé.

➤ Extraction :

La poudre déjà préparée est pesée avant d'ajouter l'éthanol avec un rapport de 1/5 : m/v, le mélange est mis sous agitation dans un sonicateur pendant 2 heures, puis centrifugé à 3000rpm/15min. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et les mêmes étapes précédentes ont été reprises sur le culot.

L'ensemble des surnageants récupérés ont été homogénéisés, puis séchés par un rotavapeur à 40°C. Enfin, l'extrait sec a été récupéré pour conservation à 4°C.

II.2.1.3 Rendement des extractions

Les rendements des extractions sont exprimés en pourcentages et déterminés par le rapport entre le poids du matériel végétal et celui de l'extrait sec, selon la formule suivante :

$$(\%) = [(P_1 - P_0)] / E \times 100$$

Où : P_0 = l'ensemble de poids des boîtes pétri vides (g)

P_1 = l'ensemble de poids des boîtes pétri contenant l'extrait après évaporation du solvant (g)

E = poids de la matière végétale initiale (g).

II.2.2 Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue obtenue est mesurée au spectrophotomètre à 725-750 nm, l'absorption étant proportionnelle à la quantité de phénols présents (**Ribéreau-Gayon *et al.*, 1968**).

- **Mode opératoire**

- Préparation des extraits :

L'extrait sec est préparé dans du MeOH/H₂O (50/50) à 1mg/ml, puis dilué comme suit :

CM : 1000µl/ml

C₁ : 300µl de CM en lui rajoute 300µl de MeOH/H₂O (50/50).

C₂ : 200µl de CM en lui rajoute 200µl de MeOH/H₂O (50/50).

- Dosage :

Une quantité de 0,02ml de l'extrait éthanolique de *C. calcitrapa* est introduite dans des tubes à essais, à laquelle on ajoute 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Après 3 à 5 minutes, on ajoute 0,08 ml de carbonate de sodium à 7,5%. Les tubes sont agités et incubés pendant 10 minutes 25 C°. L'absorbance est mesurée à 735 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide caféique comme molécule de référence. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide caféique par cent grammes de matière sèche (mg EAC/g d'extrait sec).

II.2.3 Méthode microbiologique

II.2.3.1 Préparation des milieux de cultures

➤ **Préparation de milieu SDA (Gélose Sabouraud Dextrose)**

Pour la préparation de la gélose Sabouraud on introduit 65g de la poudre dans un erlenmeyer auquel est ajoutée 1L d'eau distillée, le mélange obtenu est mis sous agitation continue et laissé bouillir jusqu'à solubilisation totale du milieu, qui sera réparti dans des

flacons en verre. Ce milieu a été préparé pour le but du repiquage des souches fongiques et d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

➤ **Préparation de milieu BN (Bouillon nutritif)**

Le bouillon nutritif a été préparé pour le but de la réactivation et l'entretien des souches fongiques par l'ajout de 20 g de BN déshydraté à 1L d'eau distillée sous agitation pendant quelques minutes, la solution sera ensuite répartie par volumes de 10 ml dans des tubes à essais microbiologiques pour autoclavage.

➤ **Bouillon Sabouraud Dextrose**

On dissout 30g de poudre du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée, puis bien mélanger et chauffer jusqu'à dissolution et répartir dans des flacons en verre, ce milieu est préparé pour le test de sensibilité aux antimicrobiens en milieu liquide.

➤ **Préparation de l'eau physiologique**

L'eau physiologique est préparée pour la préparation des inocula standards de la souche fongique. Ceci par solubilisation de 0,9g de NaCl dans 100ml d'eau distillée avec agitation pendant quelques minutes, puis autoclavage.

II.2.3.2 Stérilisation de matériel (Autoclavage)

Les milieux de culture liquide et solide, l'eau physiologique, les tubes à essai et les pinces ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés au four Pasteur.

II.2.3.3 Préparation de la solution Mc Farland

Un étalon de Mc Farland est préparé par l'ajout de 0,5 ml d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans 99,5 ml d'une solution de 0,18 mol/L (0,36 N) de H_2SO_4 (1% v/v) et agiter vigoureusement. Le mélange de ces deux composés forme un précipité de sulfate de baryum, ce qui rend la solution trouble.

La densité de la suspension est ensuite vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 à 0,10 équivalente à une charge bactérienne de 1 à $5,10^5$ (UFC)/ml) selon ESCMID. La solution Mc Farland obtenue est distribuée dans des tubes et conservée à 4°C et à l'abri de la lumière. Avant usage, la solution est mélangée vigoureusement à l'aide d'un vortex.

II.2.3.4 Préparation de l'inoculum fongique

Après la stérilisation de la zone de travail, la souche fongique *C.albicans* a été réactivée dans 10 ml de bouillon nutritif (BN) et incubée dans l'étuve à 27°C pendant 48h. La souche

fongique a été repiquée par la méthode des stries sur gélose nutritive (GS) en boîte de pétri à l'aide d'une pipette Pasteur, puis incubée dans l'étuve à 27°C pendant 24 à 48 heures. Afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées, qui vont servir à préparer l'inoculum microbien. Quelques colonies bien isolées et identiques de la souche fongique à tester sont alors raclées, déchargées dans un tube stérile contenant 5 ml de l'eau physiologique puis homogénéisées à l'aide d'un vortex.

La lecture de la densité optique de cette suspension fongique à une longueur d'onde de 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,10, ce qui est équivalent à McFarland 0,5. Il s'agit de diluer la suspension initiale ou bien la concentrer en ajoutant des colonies.

II.2.3.5 Préparation des solutions d'extraits et de molécules standards à tester

Les extraits des feuilles (sèches et fraîches) de *Centaurea calcitrapa* ont été solubilisés dans le méthanol, selon la méthode suivante :

La solution mère (SM) a été préparée par 100 mg d'extrait dans 1 ml de méthanol (100mg/ml), puis filtrée dans le but de stériliser l'extrait. Des dilutions ont été ensuite préparées à savoir T^{1/2} (50mg/ml) et T^{1/4} (25mg/ml).

La solution mère de la Quercétine a été préparée par 1mg de la substance dissoute dans 1 ml de méthanol (1mg/ml), on filtre et on dilue également pour obtenir des concentrations de 0,5mg/ml et 0,25mg/ml.

Préparation des témoins (Positif et négatif) : La préparation des témoins a été réalisée pour étudier l'effet du fluconazole (un antifongique comme témoin positif) et du méthanol (véhicule de l'extrait comme témoin négatif) sur la souche étudiée et les comparer avec l'effet des extraits de *Centaurea calcitrapa*. L'antifongique a également été préparé dans l'eau distillée et a été testé à trois concentrations différentes (1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml).

II.2.3.6 Ensemencement des tapis fongiques

Après la préparation des boîtes de pétri, on réalise l'ensemencement des levures sur un milieu solide stérile. On fait tremper un écouvillon stérile dans la suspension fongique, puis frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de Pétri et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

II.2.4 Méthode d'évaluation d'activité antifongique

II.2.4.1 Technique de diffusion en milieu solide

- **Méthodes de diffusion sur disques**

La technique utilisée pour ce test s'agit de la diffusion sur gélose dont le principe est la détermination de la sensibilité ou la résistance des souches microbiennes vis-à-vis des différents extraits.

À l'aide d'une pince stérile, les disques de papier Whatman (6 mm) ont été déposés à la surface de la gélose inoculée. Ensuite, 10 μ l de chaque solution d'extrait, d'antifongique, de quercétine ainsi que de méthanol (témoin négatif des extraits) et d'eau distillée (témoin négatif de Fluconazole) ont été déposés sur les disques à l'aide d'une micropipette préalablement autoclavée.

- **La méthode de diffusion à partir de puits**

Elle repose sur le même principe que la méthode des disques. Elle consiste à réaliser des puits de 2mm de profondeur dans l'épaisseur de la gélose. La surface de la plaque de gélose est inoculée et en réalise un creux d'un diamètre de 6 à 8 mm est percé de manière aseptique. Une goutte de gélose est ajoutée dans chaque puits, pour que l'extrait ne se diffuser pas sous la gélose, puis chaque puits reçoit 10 μ l d'extrait.

- **Incubation et lecture**

Après dépôt des extraits, les boites sont mises au réfrigérateur pendant 30 min pour permettre une pré-diffusion du contenu de chaque puits/disque, ensuite transférées pour incubation dans une étuve à 27°C pendant 24 à 48 heures.

La lecture des antibiogrammes a été faite à l'aide d'une règle en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre et comparés avec celui du méthanol comme contrôle négatif et d'un antibiotique comme contrôle positif.

L'effet des extraits et de l'antifongique se sont traduit par l'apparition d'une zone transparente autour du disque correspondant à l'absence de la croissance fongique. La sensibilité de la souche est proportionnelle au diamètre de la zone d'inhibition.

II.2.4.2 Technique de dilution en milieu liquide

La méthode de micro-dilution, a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche microbienne vis-à-vis de divers antibiotiques. La méthode de micro-dilution est effectuée en milieu liquide sur microplaque à 96 puits.

Pour une microplaque l'extrait éthanolique des feuilles fraîches et des feuilles sèches de *C. calcitrapa* a été testé. Cette technique repose sur la mise en culture d'un inoculum fongique standardisé ($0,5$ à $2,5 \cdot 10^3$ UFC/ml) en présence de séries de dilutions des différents extraits et de l'antifongique à partir d'une solution mère, il est réalisé selon les étapes suivantes :

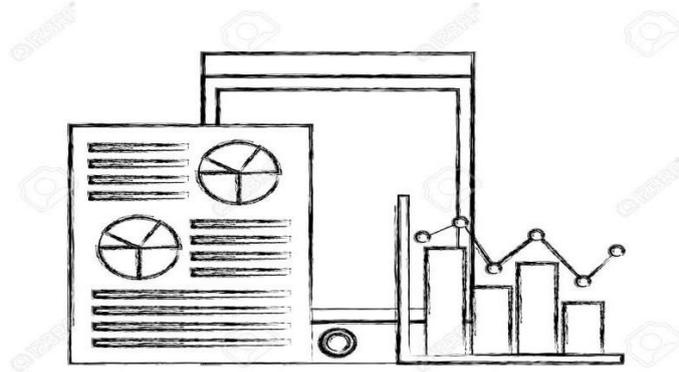
- ✓ La 11^{ème} colonne représente le contrôle négatif (bouillon BSD uniquement).
- ✓ La 12^{ème} colonne représente le contrôle de croissance (suspension fongique uniquement).
- ✓ Les lignes A et E contiennent le bouillon et l'extrait, elles correspondent aux blancs des deux extraits.
- ✓ Le test des deux extraits a été réalisé dans les lignes B, C et D pour l'extrait éthanolique des feuilles sèches et dans les lignes F, G et H pour l'extrait éthanolique des feuilles fraîches. Ces lignes comprennent 160µl de BSD, 40µl d'extrait et 100µl de la suspension fongique, la même procédure est effectuée avec l'acide caféique et le fluconazole.
- ✓ Pour le blanc des extraits, FLC et AC et leurs tests, des dilutions de moitié ont été effectuées à partir du premier puits jusqu'au 10^{ème} puits (en prélevant 100µl du puits précédent et l'ajouter au suivant) de sorte à obtenir une gamme de concentration d'extrait allant de 2 mg/ml à 0,020 mg/ml, une gamme de 64µg/ml à 0,125µg/ml pour le FLC et de 50µg/ml à 0,08µg/ml pour l'acide caféique.

Les microplaques ont été recouvertes et incubées à 27°C pendant 24h et 48h. La lecture des résultats s'est faite par une évaluation visuelle après 24h d'incubation puis après 48h, suivie de lectures des densités optiques au lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 630 nm.

II.2.5 Analyse statistique

Les histogrammes sont tracés et analysés statistiquement par l'analyse de la variance one way ANOVA du logiciel GraphPad Prism version 5.3. Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les valeurs de $P \leq 0,05$ sont considérées significatives.

RESULTATS ET DISCUSSION



III.1 Méthodes d'extraction et taux des extraits

L'étude est faite sur l'espèce *Centaurea calcitrapa* de la famille astéracée, dont on a réalisé deux extractions (solide-liquide) pour les deux états des feuilles avec le même solvant d'extraction qui est l'éthanol 96%.

- Extraction par macération pour la poudre des feuilles sèches.
- Extraction par macération et broyage manuel des feuilles fraîches.

Les rendements des extractions sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau II : Les rendements des deux extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa*

Matière végétale	Solvant d'extraction	Méthode d'extraction	Rendement (%)
Feuilles de <i>C. calcitrapa</i> sèches (FCS)	Ethanol 96%	Macération à base de poudre sèche	14,21%
Feuilles de <i>C. calcitrapa</i> fraîches (FCF)		Macération du végétal frais	6,9 %

Selon les pourcentages des rendements dans le tableau ci-dessus, on constate une différence entre les feuilles sèches et fraîches, ceci est lié à l'état de la matrice végétale initiale et la méthode d'extraction utilisée.

L'extraction par macération du végétal sec a présenté un taux élevé, et ceci revient à la méthode qui est pratiquement utilisée dans la plupart des procédures d'extraction des molécules bioactives et le solvant choisi, l'éthanol 96%, qui est un solvant volatile organique qui a pour avantage d'épuiser la matière végétale en molécules extractibles, il est miscible à l'eau et possède une partie polaire et apolaire qui lui permet de dissoudre des substances hydrophile et d'autres moins polaires. La poudre fine des feuilles sèches a facilité la diffusion de molécules actives dans l'éthanol et ça revient à la surface de contact entre la poudre et le solvant organique (Goalard, 2005).

Tandis que le taux d'extraction des feuilles fraîches s'est révélé moindre malgré l'utilisation de même solvant et ça peut revenir à l'état des feuilles fraîches grossièrement broyées, ce qui a diminué la surface de contact et a constitué un obstacle face à l'absorption de solvant par la matière végétale.

Cette méthode d'extraction solide- liquide permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dans les bonnes conditions dont la température élevée provoque l'inactivation de certains composés bioactifs, tandis que

la diminution de leur rétractibilité dans le solvant, aussi affecte leur quantification. De plus l'extraction des composants est liée au volume et au type de solvant utilisé ainsi que la durée du contact solvant matrice végétale.

En effet, l'extrait obtenu est sous forme visqueuse d'une couleur verte foncée après évaporation de l'éthanol. Il est considéré comme étant le mélange de différents composés chimiques extraits à partir des feuilles de *C. calcitrapa*, incluant la chlorophylle qui est une molécule soluble dans les solvants organiques.

Ce type d'extraction vise principalement les composés phénoliques, et par conséquent un dosage des phénols totaux est effectué, afin d'estimer les teneurs en polyphénols extraites par ces deux méthodes d'extraction à partir de deux matrices végétales différentes de la même plante, *C. calcitrapa*.

III.2 Résultats de dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, nous donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus dans l'extrait éthanolique des feuilles de *Centaurea calcitrapa*. Les extraits préparés ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV visible, pour leurs contenus en polyphénols totaux.

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols sont exprimés en μg équivalent acide caféique par g d'extrait ($\mu\text{g Eq AC/ g d'extrait}$), en utilisant l'équation de la régression linéaire ($Y = 0,0061X + 0,0409$) de la courbe d'étalonnage d'acide caféique (**figure 05**).

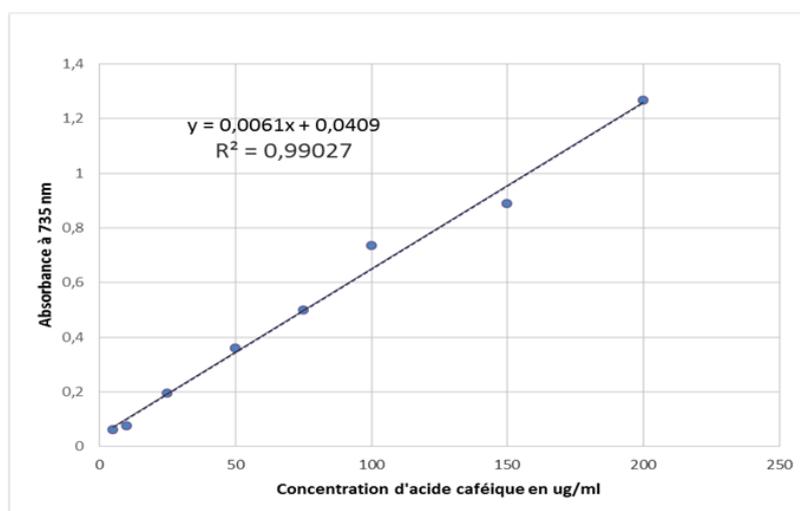


Figure 05 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux réalisée par différentes concentration de l'acide caféique.

Les résultats obtenus par la méthode de Folin-Ciocalteu pour les deux extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* sont représentés dans la **Figure 06**. On constate une différence importante entre les teneurs des feuilles sèches et celui des feuilles fraîches.

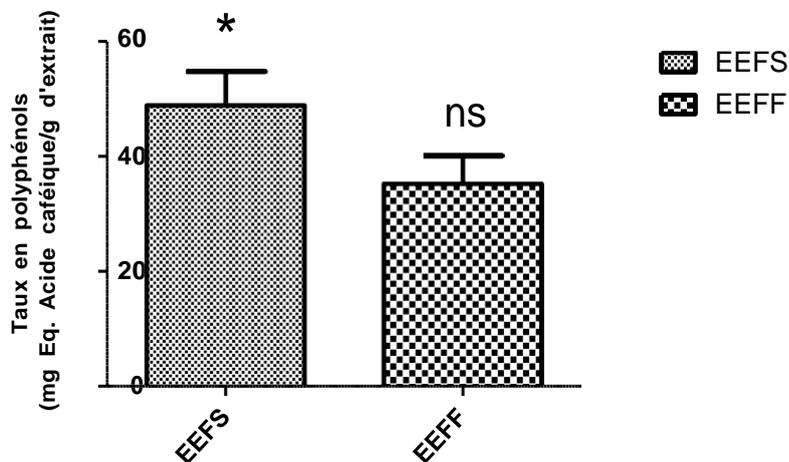


Figure 06: Teneurs en composés phénoliques pour les deux extraits de *Centaurea calcitrapa*.

*: significatif, ns : non significatif ($P \leq 0.05$).

D'après nos résultats, nous remarquons que pour les extraits phénoliques de *C. calcitrapa* obtenus, l'extrait éthanolique des feuilles sèches a présenté un taux élevé des polyphénols totaux par rapport à l'extrait éthanolique des feuilles fraîches.

Ainsi que, la teneur la plus élevée en polyphénols totaux est enregistrée pour l'extrait des feuilles sèches avec une moyenne de $48,868 \pm 5,89$ mg EAC/ g extrait. Par contre, un taux inférieur des polyphénols a été enregistré pour l'extrait des feuilles fraîches avec $35,221 \pm 4,89$ mg EAC/ g extrait.

Les extraits bruts éthanoliques des feuilles fraîches ne sont pas les plus riches en polyphénols totaux comparativement aux autres fractions d'extraits des feuilles sèches. Cela peut être expliqué par la solubilité différentielle des biomolécules extraites à partir de la matière végétale à cause de l'état de la plante et ceci est indiqué par le taux de rendement d'extraction où on a trouvé un moindre taux d'extraction également.

Le contenu phénolique dépend du type d'extrait également, c'est à dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction (Stanković, 2011).

L'évaluation du contenu en composés phénoliques dans les feuilles sèches et fraîches de *Centaurea calcitrapa*, peut-être un indicateur très pertinent de changements d'états dus aux différentes conditions environnementales ou une réponse à des conditions de traitement particulier.

III.3 Résultats des tests antifongiques

III.3.1 Test de diffusion sur milieu solide

De nombreux travaux de recherches ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits d'origine naturelle en particulier, les plantes médicinales (Amegawi, 1993). C'est dans ce contexte que notre étude a été orientée en vue de suivre l'effet des principaux composés actifs d'une plante médicinale très largement répandue en Algérie vis-à-vis de la souche fongique, *Candida albicans*.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des extraits éthanoliques des feuilles fraîches et sèches de l'espèce végétale *Centaurea calcitrapa* vis-à-vis la souche pathogène *Candida albicans*, qui a été évaluée selon la méthode de diffusion sur milieu solide par disque et puits avec l'utilisation de l'antifongique classique fluconazole comme témoin positif et méthanol 98% comme témoin négatif, ainsi que l'action antifongique d'un composé bioactif parmi les flavonoïdes de référence, la quercétine (figure 07).

Le **tableau III** reprend les résultats du test de sensibilité et les diamètres des zones d'inhibitions (mm) de *Candida albicans* autour d'un disque et puits après 24h et 48h d'incubation sous l'action des différentes concentrations des extraits éthanoliques des feuilles de *C.calcitrapa*.

Tableau III : Résultats d'évaluation de l'activité antifongique selon la technique de la diffusion en milieu solide.

	Les concentrations (mg/ml)	Les zones d'inhibitions en (mm)					
		Méthode des disques		Méthode des puits			
		Après 24h	Après 48h	Après 24h	Après 48h		
Extrait EFF	100	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	50	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	25	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
Témoin (-)	Méthanol	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
Extrait EFS	100	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	50	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
	25	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
Témoin (-)	Méthanol	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)		
Fluconazole, témoins (+)	3	32 (+++)	21 (+++)				
	2	30 (+++)	19 (++)				
	1	25 (+++)	15 (++)				
Témoins (-)	Eau distillée	0 (-)	0 (-)				
Quercétine	1	13 (+)	07 (-)				
	0,5	10 (+)	06 (-)				
	0,25	09 (+)	03 (-)				
Témoin (-)	Eau distillée	0 (-)	0 (-)				

Selon **Ponce *et al.* (2003)** la sensibilité des microorganismes a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour les diamètres de 9 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm.

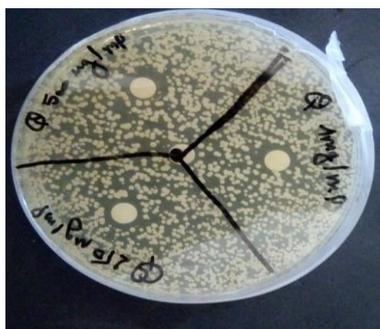


Figure 07 : Les zones d'inhibitions de *Candida albicans* sous l'action de la quercétine.

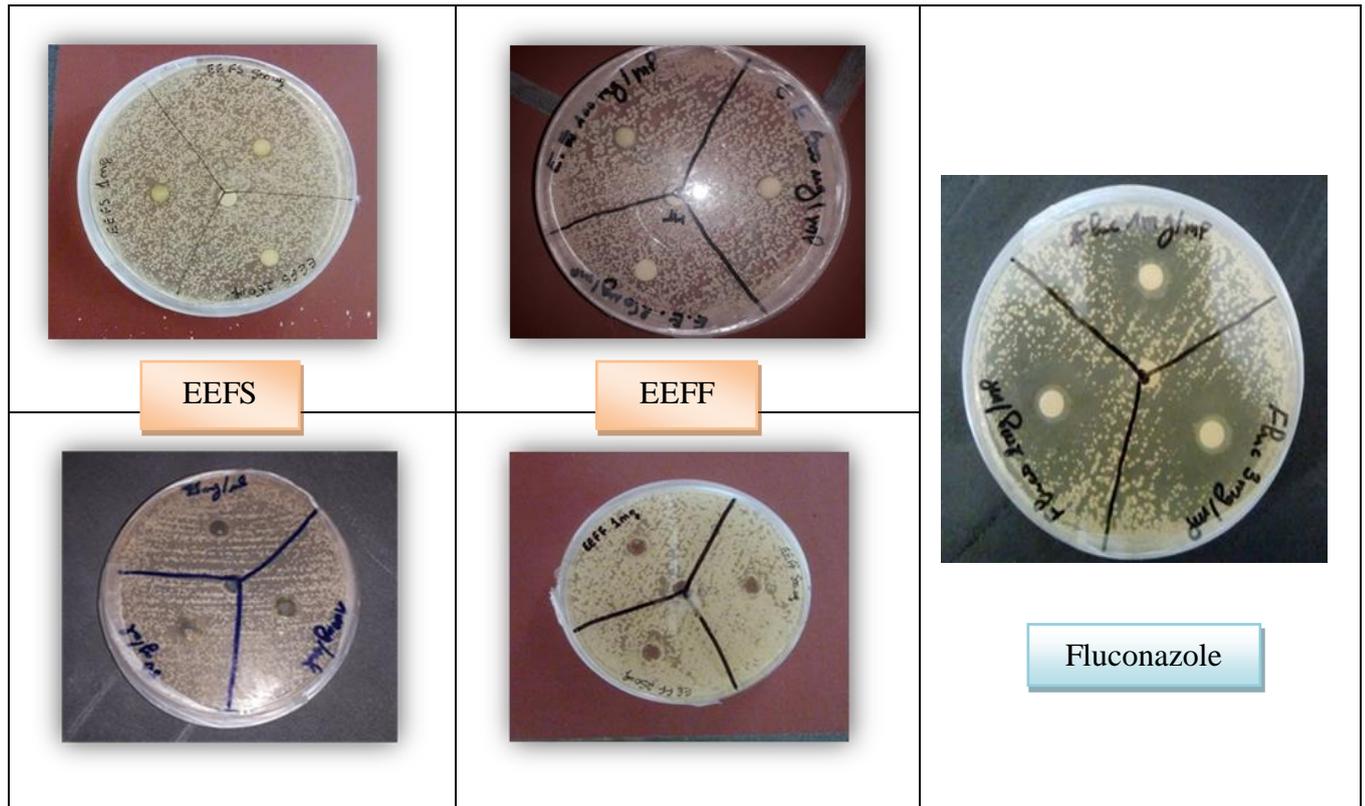


Figure 08 : Photographies originales montrant le pouvoir antifongique des extraits des feuilles sèches et fraîches de l'espèce végétale *Centaurea calcitrapa* comparés aux témoins antifongique, le fluconazole. **EEFS :** Extrait éthanolique des Feuilles de *C. calcitrapa* sèche. **EEFF :** Extrait éthanolique des feuilles de *C. calcitrapa* fraîche.

D'après les résultats illustrés sur le tableau précédent, on remarque que les extraits éthanoliques des feuilles sèches et fraîches de *C. calcitrapa* à différentes concentrations n'ont montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la souche fongique dans les deux méthodes de diffusion sur gélose où on observe une absence totale des zones d'inhibition, c'est ce que montrent les images de la **Figure 08**, ce qui nous permet de révéler la forte résistance de *C. albicans*.

Tandis que les diamètres d'inhibition générés par le fluconazole lors de la première observation est importante, alors qu'ils sont diminués après 48h de l'essai d'environ 10 mm pour chaque concentration, ce qui indique que l'effet de fluconazole est un inhibiteur de la croissance de la levure *C. albicans* (effet fongistatique) et cette dernière peut reprendre croissance après la dégradation de médicament comme un mécanisme de résistance et l'élimination de leur effet.

Candida albicans est responsable de la plupart des infections fongiques de l'Homme, la résistance de *C.alicans* aux antifongiques continue de croître et d'évoluer et de compliquer la prise en charge des patients, malgré l'introduction de nouveaux agents antifongiques (Pfaller., 2012). Comme on savait que les champignons améliorent constamment leurs mécanismes de défense. Ces mécanismes peuvent être brisés par des composants antifongiques, comme le fluconazole l'un des agents thérapeutiques contre ces mécanismes de défense fongiques. Selon Martin (1999), le fluconazole, appartenant à la classe des antifongiques triazolés, est un agent antifongique de premier choix pour le traitement et la prophylaxie des infections localisées et systémiques à *C.albicans*, en raison de son efficacité et de son profil d'innocuité bien connus et peut être utilisé chez la plupart des patients infectés par *C.albicans*, y compris les enfants, les personnes âgées et les immunodéprimées. Cependant, ils ont aussi des effets secondaires à long terme d'utilisation, représentés par la turbulence de la microflore bactérienne existante et ce qui facilite la prolifération fongique sur les surfaces des muqueuses (Van de Veerdonk et al., 2010).

Cette grande performance pourrait s'expliquer par le fait que le fluconazole est constitué des molécules purifiées, contrairement aux extraits végétaux utilisés qui sont encore à l'état brut. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Dimkić et al. (2020), selon lesquelles tous les extraits bruts de *C.calcitrapa* étudiés sur *Candida albicans* sont moins actifs que le nystatin, qui est un fongicide de référence utilisé contre ce champignon.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs, par exemple celui de Guven et al. (2005), où ils ont testé l'activité antifongique des extraits éthanoliques de différentes espèces de genre *Centaurea* vis-à-vis *Candida albicans*, qui ont été évalués par essai de diffusion en puits d'agar et ces résultats montrent que ces cinq espèces de *Centaurea* L. collectées en Turquie présentaient une large gamme d'activités antimicrobiennes à des degrés divers, en particulier l'activité antifongique et ça peut confirmer que l'activité antifongique des extraits de plantes dépend d'un certain nombre de facteurs tels que, la période de récolte, les conditions climatiques, la méthode d'extraction, la composition chimique ainsi que les types de microorganismes testés et les conditions d'expérimentation. Par ailleurs, *Centaurea calcitrapa* est rapportée par d'autres auteurs, tel que Yordanov (2008), comme une plante médicinale à potentialité antifongique. Ils ont révélé que la présence des composés actifs, tel que les polyphénols, est responsable de l'effet antifongique de la plante. Plus évidemment, le dosage des polyphénols qu'on a effectué dans ce travail a démontré la présence des polyphénols dans *C.calcitrapa*.

Dans notre étude l'effet antifongique des polyphénols reste une hypothèse fondée sur les recherches précédentes et il s'est confirmé par le test de la quercétine, qui est une molécule bioactive isolée présente dans les composantes polyphénoliques de *C. calcitrapa*, selon le **Tableau II** et la **Figure 08**, qui a montré des zones d'inhibitions avec un pouvoir inhibiteur moyen de la quercétine, contrairement aux extraits où l'effet inhibiteur était faible et ça revient à la présence de plusieurs composés bioactifs mais en faible quantité, donc probablement insuffisante pour inhiber ce champignon. Il est également probable que l'absence de zones d'inhibitions soit due à une mauvaise diffusion des extraits à partir du disque à travers la gélose.

III.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

D'après les résultats obtenus précédemment nous nous sommes intéressés à évaluer cette activité antifongique des extraits brut des feuilles de *Centaurea calcitrapa*, afin de pallier aux inconvénients de la méthode de diffusion sur milieu solide et de déterminer la concentration minimale inhibitrice dans le cas où une inhibition sur milieu liquide soit révélée.

La CMI est définie comme la plus faible concentration du composé antimicrobien qui inhibe complètement la croissance fongique invisible à la fin de la période d'incubation. Étant donné que l'objectif de ce protocole est d'avoir une méthode rapide pour dépister les antifongiques potentiels, tout puits avec un milieu clair similaire au puits blanc indique une absence de croissance fongique et considéré donc comme un résultat positif, tandis que tout puits présentant une turbidité équivalente aux puits témoins de croissance fongique est considéré comme un résultat négatif indiquant une absence d'inhibition de la croissance fongique (**Figure 09**).

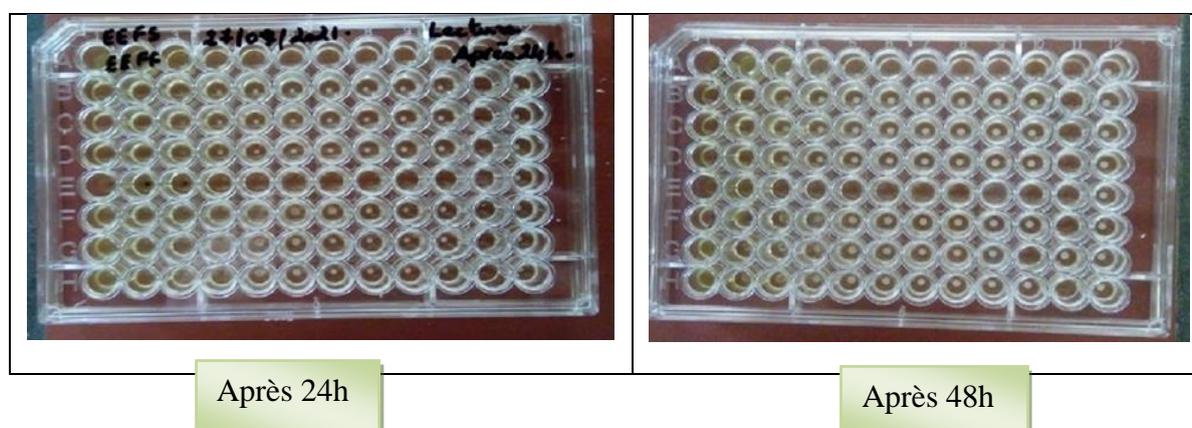


Figure 09 : Résultats sur microplaque montrant la CMI pour la souche fongique *Candida albicans* après 24h et 48h d'incubation.

Ces figures donnent une illustration de la capacité antifongique des extraits vis-à-vis de *Candida albicans*, où nous remarquons à l'œil nu après 24h d'incubation l'apparition d'un aspect clair pour l'extrait des feuilles fraîches qui présente un effet plus prononcé que celui des feuilles sèches et dans d'autres puits un dépôt indiquant une croissance fongique, mais après 48h on constate la reprise de croissance fongique dans certains puits, ce qui peut indiquer que l'effet exercé par l'extrait vis-à-vis de *Candida albicans* est fongistatique.

Les résultats des effets des extraits de *C. calcitrapa* en fonction de concentrations, réalisés dans l'objectif de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), comparées aux effets du fluconazole et de l'acide caféique, sont présentés dans les histogrammes ci-dessous :

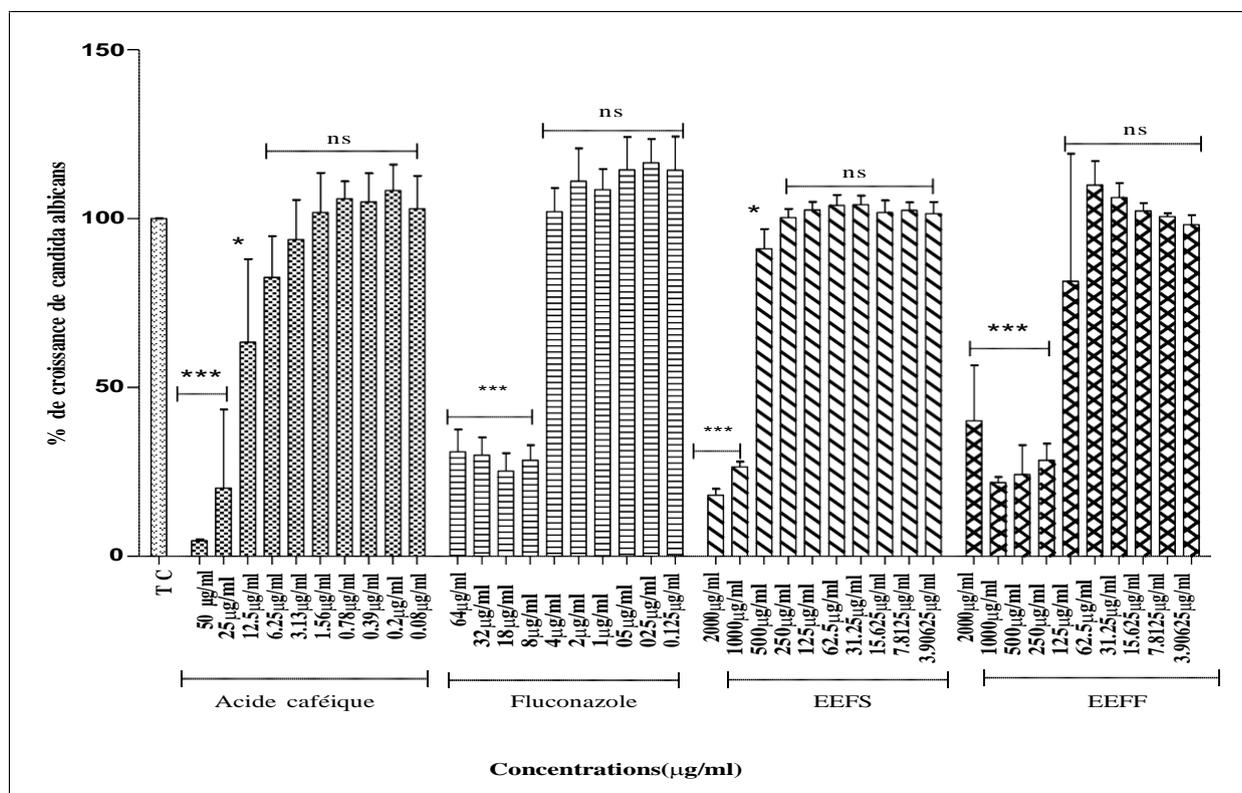


Figure 10 : Histogramme des pourcentages de croissance de *C. albicans* en présence de différentes concentrations des extraits de *C. calcitrapa*, le fluconazole et l'acide caféique après 24h d'incubation.

*: significatif, ns : non significatif ($P \leq 0.05$).

La croissance microbienne dans les microplaques a été observée après 24h d'incubation et les résultats sont présentés par la **figure 10**, qui indique la présence d'une croissance non significative par rapport au témoin de croissance maximale pour les deux extraits à partir d'une concentration de 250µg/ml pour l'EEFF (CMI=250µg/ml) d'une moyenne de $28,408 \pm 4,94$ et de 500µg/ml pour l'EEFS (CMI=500µg/ml) d'une moyenne de $91,096 \pm 5,81$.

Tandis que pour le FLC et l'acide caféique, la croissance a été à 100% à partir de 4µg/ml avec une moyenne de 102,059±7 pour le FLC (4<CMI<8) et 6,25µg/ml avec une moyenne de 82,635±12,20 pour l'acide caféique (CMI=125).

Cependant, après 48h d'incubation, *C.albicans* résisté à l'effet inhibiteur des deux extraits et de la substance phénolique (**figure 11**), ce qui a fait diminué la CMI à 500µg/ml pour l'EEFF avec une moyenne de croissance de 62,898±18,40,et 1000µg/ml avec une moyenne de 28,027±10,065 pour EEFS et 50µg/ml pour l'acide caféique d'une moyenne de 70,158±27,95. Alors que pour le FLC la croissance de *Candida albicans* a continué de diminuer plus après 48h d'incubation. L'effet inhibiteur de l'antifongique de référence a duré plus longtemps par rapport à l'effet des extraits.

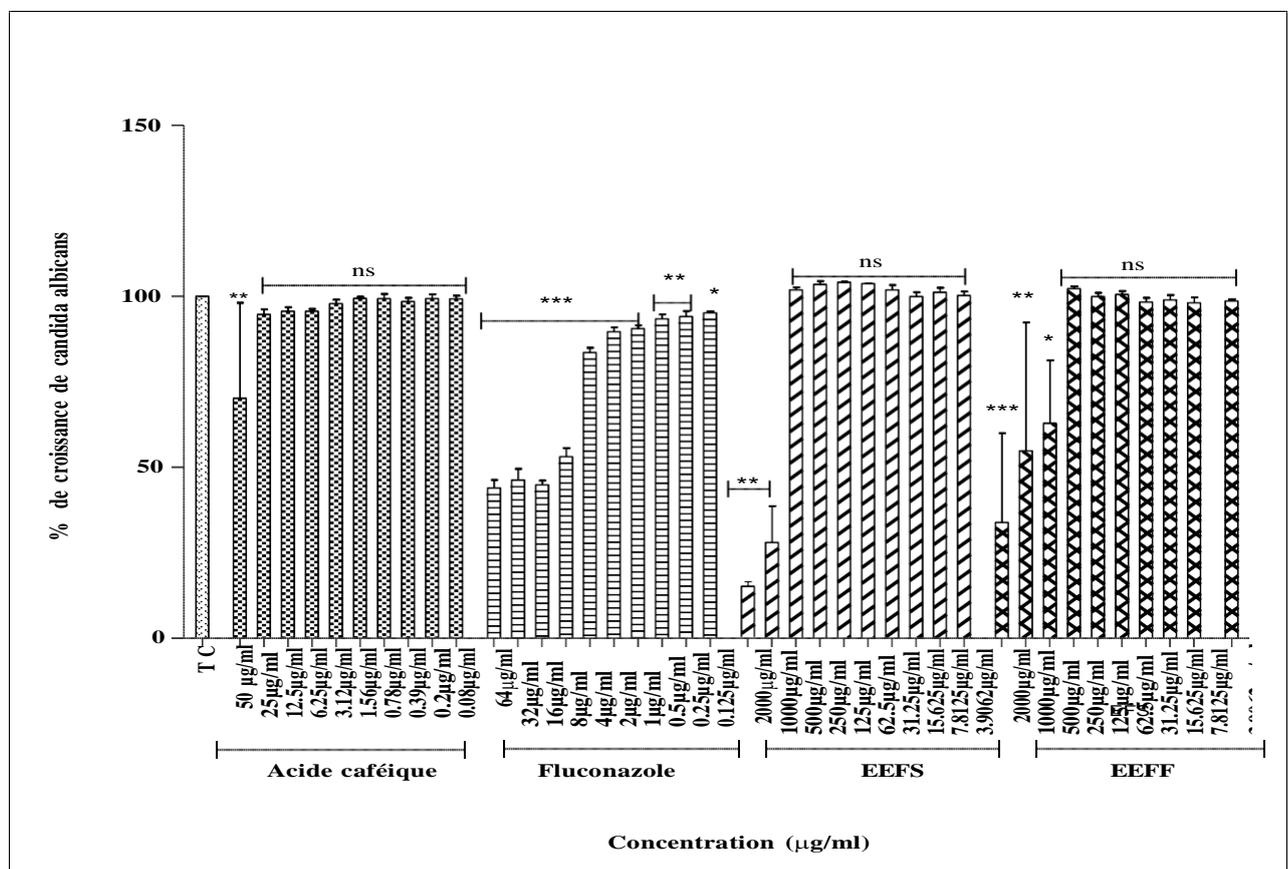


Figure 11 : Histogramme des pourcentages de croissance de *C.albicans* en présence de différentes concentrations des extraits de *C.calcitrapa*, le fluconazole et l'acide caféique après 48h d'incubation.

*: significatif, ns : non significatif (P≤ 0.05).

Après 24h d'incubation l'acide caféique inhibe à 95% la croissance de *C.albicans* à 50µg/ml pour une valeur de 95,363±0,46 alors que pour l'antifongique on note une inhibition

qui varie entre les concentrations de 64µg/ml à 8µg/ml pour un pourcentage d'environ 70%, où le taux d'inhibition est non significatif pour le reste des concentrations par rapport aux extraits, où nous remarquons une inhibition à des concentrations allant de 2000µg/ml à 1000µg/ml pour l'EEFS, tandis que pour l'EEFF l'inhibition varie entre la concentration de 2000µg/ml à 250µg/ml (**Figure 12**).

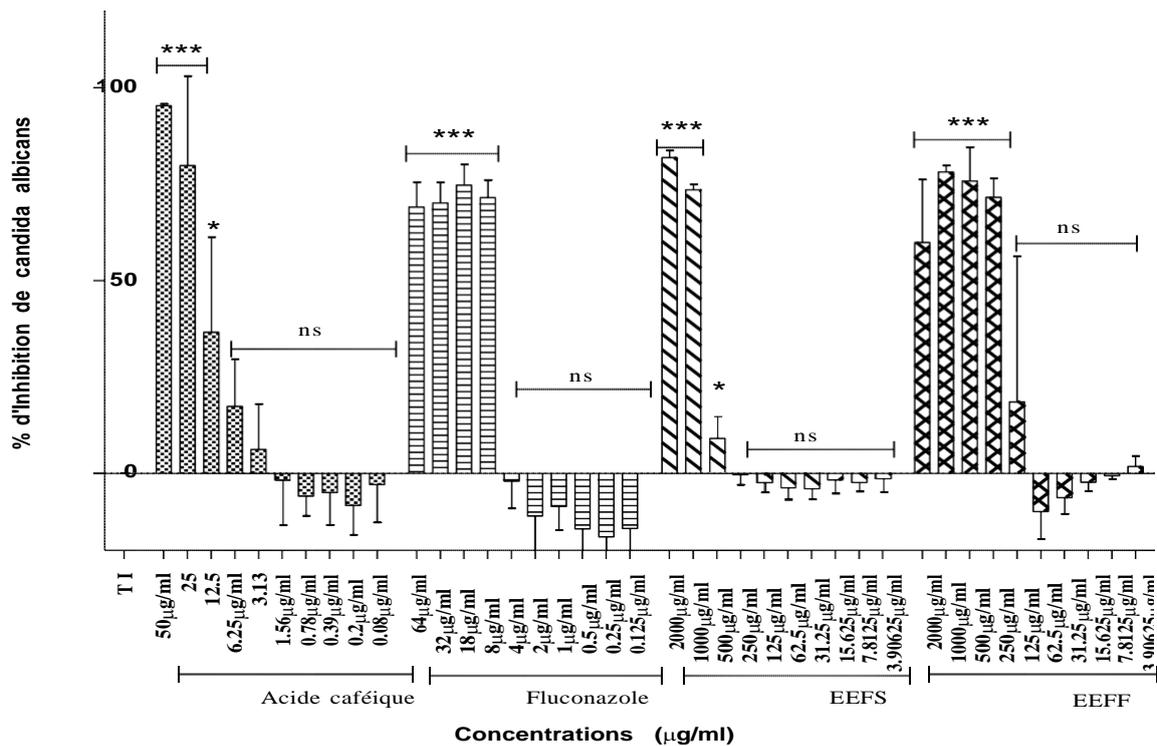


Figure 12 : Histogramme de pourcentage d'inhibition de *C.albicans* en présence de différentes concentrations des extraits de *C.calcitrapa*, le Fluconazole et l'acide caféique après 24h d'incubation.

*: significatif, ns : non significatif (P≤ 0.05).

Après 48h d'incubation, le pourcentage d'inhibition diminue d'une façon notable pour l'acide caféique et les deux extraits EEFS et EEFF qui ont gardé la même différence du pouvoir antifongique entre eux, tandis que le fluconazole marque une baisse moyenne, cette diminution due au développement d'une résistance aux agents antifongiques par *Candida albicans*, mais on remarque l'apparence d'inhibition pour les concentration de 4µg/ml à 0,125µg/ml et ça signifie que le fluconazole a besoin de temps pour exercer son effet inhibiteur (**Figure 13**).

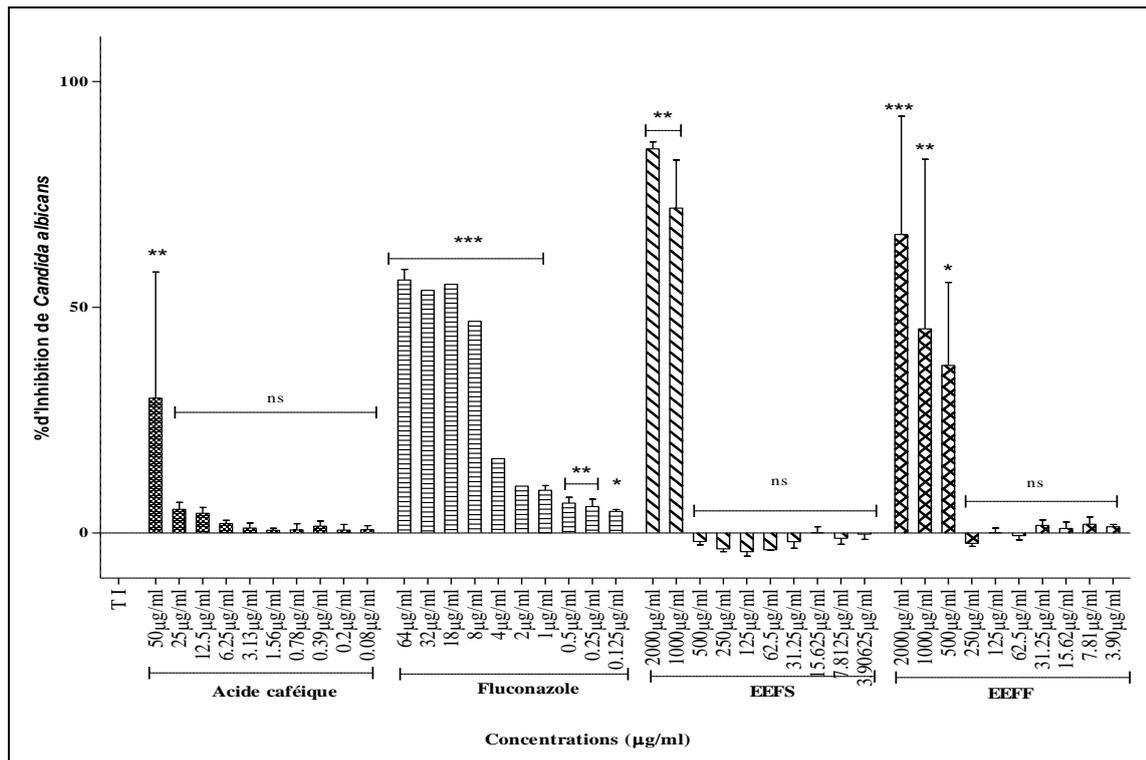


Figure 13 : Histogramme de pourcentage d'inhibition de *C. albicans* en présence de différentes concentrations des extraits de *C. calcitrapa*, le Fluconazole et l'acide caféique après 48h d'incubation.

*: significatif, ns : non significatif ($P \leq 0.05$).

Les résultats de tests de micro-dilution ont révélé la présence de la sensibilité de *Candida albicans* vis-à-vis des extraits des feuilles de *C. calcitrapa*, à des concentrations précises et également la résistance de *Candida* dans d'autres concentrations, contrairement aux résultats de diffusion en milieu solide dont les extraits n'ont présenté aucune activité antifongique pour la souche *C. albicans* qui a été très résistante. Ceci peut être lié aux conditions de la micro-dilution qui a été effectuée dans un milieu liquide, comme étant un milieu favorable pour une meilleure diffusion de l'extrait éthanolique, ce qui lui permet de diffuser et de réagir pour inhiber le champignon.

La méthode de diffusion en milieu solide est une technique peu coûteuse, rapide et simple qui est facilement applicable dans les laboratoires cliniques de routine, qui doit être suivie par un test qui peut confirmer ses résultats, tel que la microdilution où il a été révélé dans l'étude de **Budzyńska et al. (2009)** que cette technique est plus fiable que la méthode de diffusion en milieu solide et elle offre de meilleures précisions et reproductibilité des résultats. Par ailleurs, d'autres études ont affirmé le choix de diffusion en milieu liquide pour évaluer l'activité antifongique. Selon **Castro et al. (2010)**, le test de diffusion sur disque peut ne pas représenter une alternative pour déterminer la sensibilité aux antifongiques testés. Ces

résultats ont été confirmés par **Florencia et al. (2016)** sur les limites des tests de sensibilité lors de l'utilisation de la méthode de diffusion sur disque et la résistance doit être confirmée en utilisant la technique de microdilution en bouillon.

Nous pouvons constater que le choix de la technique de détermination de la sensibilité antimicrobienne a un impact sur les données de sensibilité et de résistance. Dans notre étude, les résultats de sensibilité discutés seront ceux obtenus par la microdilution manuelle, étant donné qu'il s'agit de la méthode de référence.

Les principes actifs, qui sont des molécules solubles dans l'éthanol, pourraient être soit des terpènes, soit des alcaloïdes, soit des huiles végétales ou tout autres substances actives qui sont mieux extraits par les solvants organiques. Il a été rapporté que les extraits végétaux d'un certain nombre de plantes contiennent des composés, tels que les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes qui sont dotés de propriétés fongicides. Ces molécules justifient l'utilisation de ces plantes dans la pharmacopée traditionnelle (**Mohammedi et al., 2013**).

L'activité antifongique des deux extraits vis-à-vis de *C.albicans* a révélé que l'extrait avec un faible taux des polyphénols (EEFF) a présenté une activité antifongique plus remarquable que l'extrait riche en polyphénols (EEFS). Ceci peut être expliqué par le caractère qualitatif que quantitatif des composés phénoliques et d'autres composants présents dans les extraits et la relation structure activité. Selon **Bruneton (2009)**, l'efficacité des composés phénoliques dépend de leurs hétérogénéités structurales.

Par ailleurs, notre étude a mis en évidence une activité antifongique pour tous les extraits testés sur la souche fongique *Candida albicans*. Cette activité semble être liée aux composés bioactifs de *C.calcitrapa*, en effet, il est apparu dans plusieurs études que *Centaurea calcitrapa* est largement utilisée pour leur propriétés antimicrobiennes, comme illustré dans la synthèse bibliographique, où de nombreuses études ont examiné les effets potentiels des polyphénols contre les agents pathogènes des infections fongiques, en particulier, *Candida albicans* (**Seleem et al., 2016**).

Une étude *in vivo* et *in vitro* a démontré l'effet inhibiteur de certains composés des polyphénols trouvés dans *Centaurea calcitrapa* (**Ahmed et al., 1970**) sur les mécanismes de pathogénicité de *C.albicans*, cette étude effectuée par **Yordanov (2008)** où ils ont testé l'influence de l'apigénine et du kaempférol sur l'activité enzymatique de la levure *in vitro*. Les substances ont révélé des effets supprimeurs complexes sur les processus d'adhérence

aux cellules épithéliales, l'activité aspartyl-protéase sécrétée et le taux de glycosylation des protéines de la paroi cellulaire. L'apigénine et le kaempférol ont été administrés lors d'une infection systémique par *C. albicans*, le nombre de survivants étant augmenté avec le kaempférol. L'application des quatre substances lors d'une infection cutanée a supprimé les symptômes et a accéléré l'élimination du champignon du site d'inoculation. D'une façon générale, plusieurs auteurs ont suggéré que l'activité antifongique de certaines plantes, telles *Marrubium vulgare* chez *Candida albicans* varie significativement de l'extrait flavonoïque testé ainsi que de sa concentration et du type de la souche fongique étudiée (**Bouterfas et al., 2016**).

Le mécanisme d'action de l'extrait riche en principaux composés phénoliques est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire de la levure. L'extrait d'une plante riche en constituants bioactifs exerce son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique du germe grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne l'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ; l'acidification de l'intérieur du germe bloquant la production de l'énergie cellulaire, ainsi que la synthèse des composants de structure et la destruction du matériel génétique, conduisant ainsi à la mort de la souche (**Caillet et Lacroix, 2007**).

L'effet antifongique de l'acide caféique pourrait être dû au groupement hydroxyle présent dans cette molécule. En effet, **Cowan (1999)** a montré que l'augmentation de l'hydroxylation induit l'augmentation de la toxicité, d'où le rôle antifongique joué par cette hydroxylation. L'acide caféique est connu pour son grand pouvoir antifongique et l'explication du mécanisme d'action responsable de la toxicité antifongique des acides phénols tient peut-être à l'inhibition par les composés oxydés des enzymes fongiques à travers une réaction avec les groupements sulfhydryl ou bien par des interactions non spécifiques avec les protéines fongiques (**Cowan, 1999**).

En effet, ces composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique des extraits de plantes et non seulement les polyphénols, il y'a également les sesquiterpènes qui se trouvent dans l'extrait éthanolique et contribueraient à l'activité globale de l'extrait, dont des études *in vitro* ont démontré que ces substances bioactives provenant de diverses espèces végétales à intérêt médicinal présentent un spectre large d'activité antifongique sur *C.albicans* (**Lee et al., 1977**).Cependant dans une autre étude, **Panagouleas et al. (2003)** ont testé l'activité antifongique des composés isolés de *C.raphania*, à savoir les sesquiterpènes lactone, parmi lesquels seule la cnicine s'est avérée active contre tous les champignons testés.

CONCLUSION & PERSPECTIVES



L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes médicinales n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années afin de rechercher de nouvelles alternatives aux drogues chimiques, et qui sont sans effets néfastes pour la santé humaine et de l'environnement.

Parmi les plantes en cours d'étude, nous trouvons en particulier les plantes du genre *Centaurea* et notamment l'espèce *Centaurea calcitrapa*. C'est l'une des plantes les plus répandues dans le monde et qui ont été sélectionnées pour les tests d'évaluation d'activités antifongiques, réalisés avec les extraits éthanoliques des feuilles sèches et fraîches sur l'inhibition de la croissance de *Candida albicans*.

La quantification des phénols totaux a été effectuée sur les extraits éthanoliques des feuilles (sèches et fraîches) a montré la présence d'un taux important de composés phénoliques dans les extraits de *Centaurea calcitrapa*.

Cependant, des sensibilités plus importantes ont été notées avec les extraits éthanoliques des feuilles fraîches qui semblent exercer un effet de type fongistatique sur la croissance du *Candida albicans*. L'efficacité d'inhibition du développement de la prolifération de cette levure a été en fonction de la composition chimique des extraits des feuilles sèches et fraîches de la plante étudiée. Il est possible que cette activité observée dans ce travail dépend non seulement de la teneur en polyphénols ; mais aussi à d'autres substances inconnues ayant la même activité.

Enfin, ce travail est une étude préliminaire dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales algériennes, plus particulièrement *Centaurea calcitrapa* pour ses vertus antifongiques. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude à d'autres levures à l'origine d'autres maladies infectieuses, d'évaluer la contribution d'autres substances à l'activité antimicrobienne exhibée chez *Centaurea calcitrapa* et donc réaliser une purification du principe actif de cet extrait, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traiter des infections fongiques opportunistes résistantes.

A

Aboudy M S *et al.* Efficacité antifongique et mécanismes des flavonoïdes. *Antibiotiques* ; 2020, 9.

Ahmed Z F *et al.* Postep Dziedzinie Leku Rosl., *Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp* ; 1970, 20-23.

Arif R *et al.* The biological activity of *Centaurea* L. species (Review). *Gazi Univ. Journal Science*; 2004, 17: 149-164.

Aydin Ö *et al.* A contribution to taxonomy of *Centaurea* including *Psephellus* (Asteraceae) based on anatomical and molecular data. *Turkish Journal of Botany*; 2013, 37: 419-427.

Amegawi K *et al.* Etude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux totaux de dix plantes médicinales. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines* ; 1993.

B

Baba Aissa F. Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edas, 1999 :368.

Basset C. Recherche de composés antifongiques issus de bois durables amazoniens. Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane; Universida de Brasília ; 2011.

Benamara-Bellagha M. Organisation du génome et étude palynologique de quelques espèces algériennes du genre *Centaurea* L. Thèse de doctorat: Biotechnologies végétales. Constantine : Université Constantine; 2015 : 1-101.

Beloued A. Plantes médicinales d'Algérie. Office de Publications Universitaires ; 1998, 277.

Bénard C. Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine ; 2009.

Bernard M et Latge J P. "*Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis."

Medical Mycology; 2001, 39: 9-17.

Boulenouar N. Substances naturelles a visée antifongique: Cas particulier des polyphénols, Thèse de Doctorat. Université d'Oran. Algérie ; 2011,182.

Bouterfas Z *et al.* La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans*? *Journal Mycologie Médicale*; 2016,26 :201-211.

Bruneton, Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, Technique et documentation, *Lavoisier*, 1993.

Bruneton J. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3e édition, Tec et Doc, Paris, 1999, 316 : 619-1120.

Bruneton J. Pharmacognosie phytochimie : plantes médicinales. *Tec et Doc* (4^{ème} édition). Paris : France, 2009 : 146-290.

Budzyńska A *et al.* The optimization of methods utilized for testing the antibacterial activity of essential oils. *Medycyna Doświadczalna i mikrobiologia*; 2009, 61: 281-287.

C

Caillet S et Lacroix M. Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, *Resala*; 2007:1-8.

Castro A L *et al.* "Comparing *in vitro* activity of tigecycline by using the disk diffusion test, the manual microdilution method, and the VITEK 2 automated system." *Revista Argentina de microbiologia* ; 2010,4: 208-211.

Cowan M. Plantproducts as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* ; 1999,12: 564-582.

D

Dannaoui E. Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. *Revue francophone des laboratoires* ; 2013, 450 : 71-77.

Dimkić I *et al.* New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts: phytochemical analysis, cytotoxicity and antimicrobial activity. *AMB Express*; 2020, 10(1):1-21.

F

Fischer N H, Olivier E J, Fischer H D. the biogénese and chemisty of sesquiterpène lactones; 1979.

Fraga B. Naturel sesquiterpenoides, *Naturel Product reports*; 2003, 20 :392-413.

Furman R M. *Candida ciferrii* et *Candida chiropterorum* isolé à partir d'échantillons cliniques. *Journal Clin Microbiol*; 1983, 18: 1252-5.

G

Gudlaugsson O *et al.* Mortalité attribuable à la candidémie nosocomiale, revisitée. *Maladies infectieuses cliniques* ; 2003, 37 (9) :1172-1177.

Guerineau A. Evaluation du potentiel d'extraits de lichens et de fruits rouges contre des biofilms de *Candida* et *Malassezia*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Poitiers ; 2015, 85.

Gulati M et Nobile C J. Biofilms de *Candida albicans* : développement, régulation et mécanismes moléculaires. *Microbes et infection* ; 2016,18:310-321.

Güven K *et al.* Activité antimicrobienne de *Centaurea* espèce. *Biologie pharmaceutique*; 2005, 43:67-71.

Goalard C. Etude physico-chimique du procédé de dispersion des poudres libres et agglomérées en milieu liquide. Thèse de doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse; 2005

H

Hartmann T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*; 2007, 68 : 2831-2846.

Hajji H. Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique de quatre plantes médicinales marocaines sur cinq champignons phytopathogènes. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*; 2016, 10.

Höfs S, Mogavero S, et Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of microbiology*; 2016, 54: 149-169.

I

Iwu M W *et al.* "New antimicrobials of plant origin." *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA; 1999: 457-462.

K

Kaskoos R A. Inhibition *in vitro* de la glucosidase et activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Centaurea calcitrapa* d'Irak." *Ame. J. Essent. Huiles Nat. Prod 1* ; 2013 : 122-125.

Kauffman C A, Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc*, 2006.

Khammar A *et al.* Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research*; 2012, 84: 398-416.

Kitouni R *et al.* Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. *Chemistry of Natural Compounds*; 2015, 51: 762-763.

Kitouni R et Benayache S. Isolement et détermination des métabolites secondaires de l'exsudat toluène-acétate d'éthyle de *Centaurea calcitrapa* (Asteraceae). Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine ; 2007.

L

Larocca L M *et al.* Effet inhibiteur de croissance de la quercétine et présence de sites de liaison aux œstrogènes de type II dans les carcinomes à cellules transitionnelles humaines primaires. *Le Journal d'urologie* ; 1994.

Lee K H *et al.* *Phytochemistry* ; 1977,16 : 1177.

Lohse M B *et al.* Développement et régulation des biofilms mono et multi-espèces de *Candida albicans*. *Nature Reviews Microbiology*; 2018, 16 : 19-31.

M

Mallick E M et Bennett R J. Sensing of the microbial neighbour hood by *Candida albicans*. *PLoS pathogens*; 2013, 9:103-661.

Markham K R. Techniques of flavonoid identification. *Academic press*; 1982.

Martin M V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 1999, 44: 429-437.

Mayer F L *et al.* *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*; 2013, 4: 119-128.

Mohammedi, Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie ; 2013: 84.

N

Nijveldt R J E *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*; 2001, 74: 418-425.

Nikolić M, et Stevović S. La famille des astéracées comme outil de planification durable en phytoremédiation et sa pertinence en milieu urbain. *Foresterieurbaine et verdissementurbain*;2015, 14 : 782-789.

Nigam P K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. *Our Dermatol Online*; 2015, 6:212-221.

Nobile C J, et Johnson A D. *Candida albicans* biofilms and humandisease. *Annual review of microbiology*; 2015, 69: 71-92.

P

Pagano L *et al.* The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: The seifem-2004 study. *Haematologica*; 2006, 91: 1068-1075.

Panagouleas C *et al.* Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. mixta, growing wild in Greece. *Pharmaceutical biology*; 2003, 41: 266-270.

Park E J, Kim J. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Inula britannica*. *Planta Medica*; 1998, 64:752.

Pereira R *et al.* Biofilm de *Candida albicans* : Formation, régulation et résistance. *Journal of Applied Microbiology* ; 2021, 131: 11-22.

Pfaller M A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*; 2012, 125: S3-S13.

Picman A K. Activités biologiques des lactones sesquiterpéniques. *Systématique biochimique et écologie*; 1986, 14 : 255-281

Pitcairn M J *et al.* Germination des graines pourpre (*Centaurea calcitrapa*). *Weed Technology*; 2002, 16: 452-456

Ponce A G *et al.* Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swisschard. *Lebensmittel wissenschaftund Technologic*; 2003, 36: 679-684.

Q

Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II, CNRS, 1963.pp.567-1170.

R

Rahman A *et al.* Etudes taxonomiques sur la famille des Asteraceae (Compositae) de la division Rajshahi. *Journal de recherche sur l'agriculture et les sciences biologiques* ; 2008, 4 :134-140.

Rahman A H. Systematic studies on Asteraceae in the northern region of Bangladesh. *American Journal of Life Sciences*; 2013, 1: 155-164.

Reda E H *et al.* Comparative Study on the Essential Oils from Five Wild Egyptian *Centaurea* Species: Effective Extraction Techniques, Antimicrobial Activity and In-Silico Analyses. *Antibiotics*; 2021, 10: 252.

Ribéreau-Gayon J *et al.* *Sciences et techniques du vin*. Tome 1. Paris : Edition Dunod, 1968. 671p.

Roche CT et Roche B F. Starthistle pourpre et ibérique. 1998.

Rojas F D *et al.* Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses*; 2017, 60: 104-111.

S

Seleem D *et al.* Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Archives of oral biology*; 2017, 76: 76-83.

Senatore F *et al.* Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp. *sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily. *Flavour and fragrance journal*; 2006, 21: 282-285.

Seghiri R. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*. 2009.

Staib P et Morschhäuser J. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses*; 2007, 50: 1-12.

Stanković MS. Total phenolic content, flavonoïd concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L extracts. Kragujevac. *Journal Science*; 2011,33: 63–72.

T

Tähtiharju S *et al.* Evolution and diversification of the CYC/TB1 gene family in Asteracea. A comparative study in Gerbera (Mutisieae) and sunflower (Heliantheae). *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29:1155-1166.

Toribio MS *et al.* Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. *Ars Pharmaceutica* ; 2004, 45 : 281- 341.

Tortorano A M *et al.* Epidemiology of candidaemia in europe: Results of 28-month european confederation of medical mycology (ecmm) hospital- based surveillance study. *Eural Journal Clinical Microbiol Infect Dis*; 2004, 23: 317-322.

Trabsa H *et al.* L'effet antioxydant et anti-hémolytique *in vivo* et *in vitro* des extraits algériens de *Centaurea calcitrapa* L. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* ; 2020, 10: 202-207.

Triadou P *et al.* Les Patients souffrant de cancers et la médecine traditionnelle chinoise (6). Cancer et tradipraticiens. *Acupuncture* ; 2011, 10 :75.

V

Vinel A et Pialoux J. Médecine de l'ancienne Egypte et médecine traditionnelle chinoise ; 1976.

Van de veerdonk F L *et al.* Novel strategies for the prevention and treatment of *Candida* infections: the potential of immunotherapy. *FEMS microbiology reviews*; 2010, 34 (6): 1063-1075.

Vandeputte, P. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata* (Doctoral dissertation, Université d'Angers, (2008).

Y

Yordanov M *et al.* Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. *Canadian journal of microbiology*; 2008, 54: 435-440.

Z

Zengin G *et al.* Teneur totale en phénoliques, flavonoïdes, tanins condensés de huit espèces de *Centaurea* et leurs larges activités inhibitrices contre le cholinestérase, la tyrosinase, l' α -amylase et l' α -glucosidase. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* ; 2016, 44 : 195-200.

Zgheib, Pierre A. Le Canon d'Avicenne et son impact sur l'enseignement médical en Europe médiévale, Université de Paris, 2020.

Résumé :

Les plantes médicinales restent de nos jours une source fiable des principes composés bioactifs connus pour leurs aptitudes thérapeutiques avérées contre plusieurs maladies infectieuses. La flore médicinale dans les différentes régions de l'Algérie est très diversifiée. *Centaurea Calcitrapa* a été sélectionnée dans la présente étude pour les tests d'évaluation d'activités antifongiques, contre *Candida albicans*, *in vitro*, des différents extraits préparés à partir de ses feuilles sèches et fraîches. Cette activité a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé et en milieu liquide par microdilutions. Par ailleurs, la quantification des phénols totaux a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Les résultats ont révélé des teneurs en phénols totaux plus élevées pour l'extrait éthanolique des feuilles sèches avec 48,868mg EAC/g extrait. Cependant, l'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que l'extrait éthanolique des feuilles fraîches est plus actif, ceci d'après les résultats de tests de détermination de la CMI. Cet effet s'est montré de type fongistatique à l'égard *Candida albicans*.

En conclusion, dans les conditions expérimentales de ce travail, les résultats obtenus démontrent que *Centaurea calcitrapa* présente une activité antifongique contre *Candida albicans*, qui peuvent être considérés comme très prometteurs et justifient la poursuite des recherches, entre autres, sur l'identification des composants anti-fongique de cet extrait actif.

Mots clé : Activité antifongique, CMI, *Centaurea calcitrapa*, *Candida albicans*, Fluconazole

Abstract:

Medicinal plants remain nowadays a reliable source of bioactive compound principles known for their proven therapeutic abilities against several infectious diseases. The medicinal flora in the different regions of Algeria is very diverse. *Centaurea calcitrapa* was selected in the present study for the evaluation tests of antifungal activities, against *Candida albicans*, *in vitro*, of different extracts prepared from its dry and fresh leaves. This activity was evaluated by the diffusion method in agar medium and in liquid medium by microdilutions. In addition, the quantification of total phenols was performed by the Folin-Ciocalteu method.

The results revealed higher total phenol contents for the ethanolic extract of dry leaves with 48.868mg EAC/g extract. However, the evaluation of the antimicrobial activity showed that the ethanolic extract of fresh leaves is more active, this according to the results of MIC determination tests. This effect was fungistatic towards *Candida albicans*.

In conclusion, under the experimental conditions of this work, the results obtained show that *Centaurea calcitrapa* presents an antifungal activity against *Candida albicans*, which can be considered as very promising and justify the continuation of the research, among others, on the identification of the anti-fungal components of this active extract.

Key words: Antifungal activity, MIC, *Centaurea calcitrapa*, *Candida albicans*, Fluconazole