

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار التليجي الاغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## ***Thèse de doctorat***

**OPTION : BIOLOGIE**

### **THEME**

---

***Études *in vitro* et *in silico* de l'effet inhibiteur de  
quelques molécules et extraits sur la lipase de  
Candida : traitement de la Candidose***

---

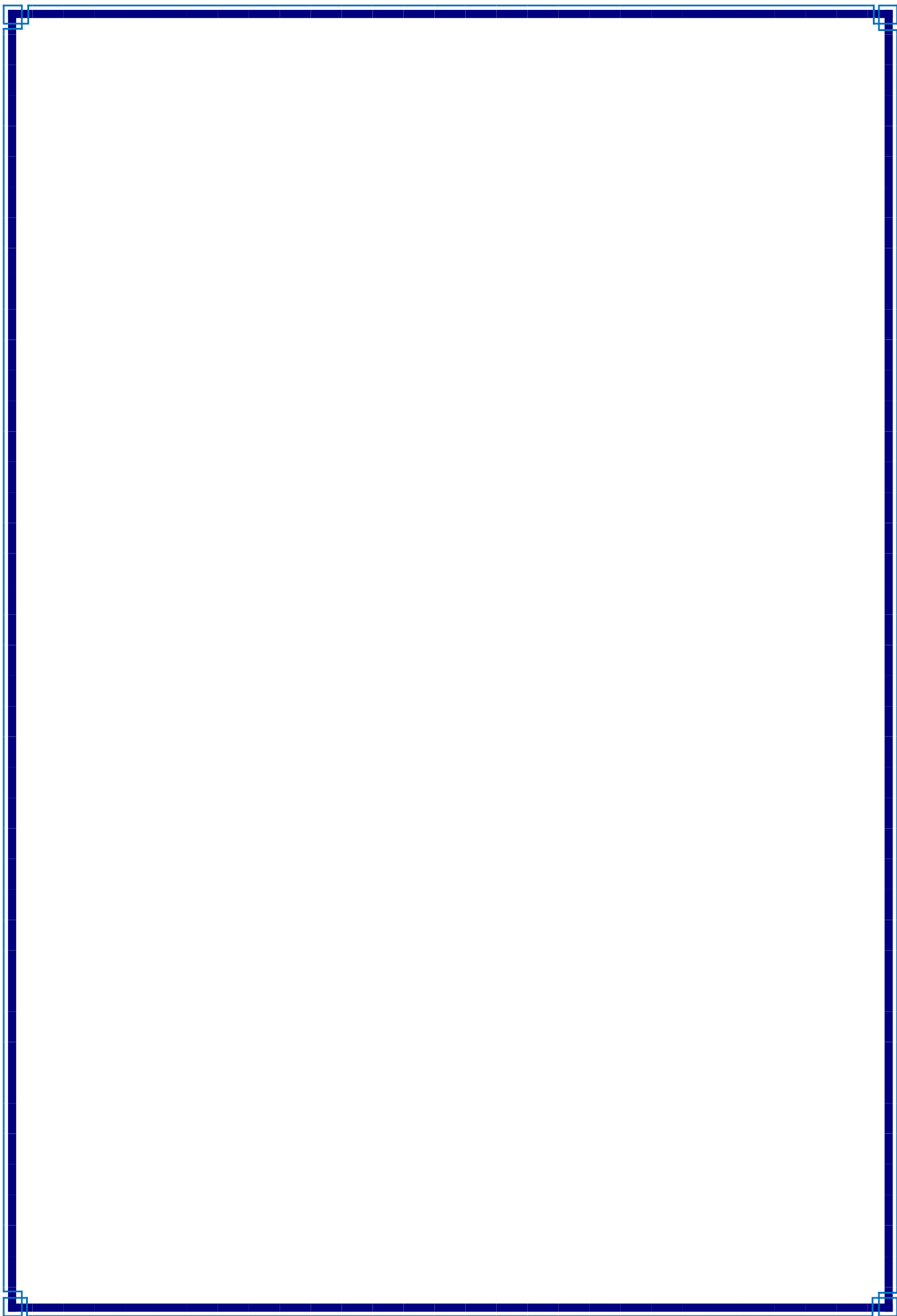
**PRÉSENTÉ PAR :**

**Safia GACEMI**

**Membres du jury**

|                                          |            |                       |                            |
|------------------------------------------|------------|-----------------------|----------------------------|
| <b>M<sup>me</sup>. KHECHBA Ihcen</b>     | <b>MCA</b> | <b>Univ. Laghouat</b> | <b>Présidente</b>          |
| <b>M. BELYAGOUBI Larbi</b>               | <b>MCA</b> | <b>Univ. Tlemcen</b>  | <b>Examineur</b>           |
| <b>M<sup>me</sup>. MAHFOUDI Reguia</b>   | <b>MCA</b> | <b>ENS. Laghouat</b>  | <b>Examinatrice</b>        |
| <b>M. SIFI Ibrahim</b>                   | <b>MCA</b> | <b>Univ. Laghouat</b> | <b>Examineur</b>           |
| <b>M<sup>me</sup>. BENAROUS Khedidja</b> | <b>MCA</b> | <b>Univ. Laghouat</b> | <b>Directrice de thèse</b> |
| <b>M<sup>me</sup>. LEBAILI Nemcha</b>    | <b>Pr</b>  | <b>ENS-Kouba</b>      | <b>Co-directrice</b>       |

**2019/2020**





*A mes chers parents*

*A la mémoire de mon beau père :*

*Naidjate Saïd*

*A mon cher époux*

*A mes bougies dans la vie, chers frères*

*A ma source de bonheur, mes enfants :*

*Tasnim et Zakaria*

*A tous ceux qui me sont chers*

## *Remerciements*

Grâce à Dieu le Tout Puissant qui m'a aidé à terminer ce projet en éclairant mon chemin.

Tout d'abord, je tiens à témoigner toute ma gratitude à Dr. *Khedidja BENAROUS*, pour sa confiance et son soutien inestimable en tant qu'amie et pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à la réalisation de cette étude scientifique en tant que promotrice...merci infiniment *ma chère promotrice*.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Pr. Yousfi Mohamed, directeur de laboratoire-sciences fondamentales -Laghouat-. Je le remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Mes remerciements aux honorables membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail : Dr. KHECHBA I, Dr. MAHFOUDI R, Dr. BELYAGOUBI L et Dr. SIFI I.

Mes vifs remerciements vont aussi à M. HADJOUJJA Moustapha, chef des laboratoires pédagogiques du département de biologie –Université de Laghouat pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je dois aussi adresser mes sincères remerciements à l'équipe des ingénieurs de laboratoires pédagogiques de biologie-Université de Laghouat- : M. Chettetha M., Melle. Renane Z., Melle. Aouissi F.Z., Melle. Ghanem K., Melle. Latrech.A, Melle. Dandane S., Melle Atmani R., Melle Benjarba N., Melle.Gaoui H.

Je remercie en particulier Mr. Linani A, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser une grande partie de ce travail au sein de l'Hôpital de Laghouat, merci pour votre aide et conseils.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Mme. Abdellali K et Mme. Yousfi Z, ingénieurs des laboratoires du département « sciences naturelles » à l'école normale de Laghouat, pour leur aide et soutien.

**Ma** gratitude va aussi au Dr. Imperial S « département de biochimie, Université de Barcelone » pour son encadrement, son orientation, ses conseils et la disponibilité le long de mon stage pratique à l'université de Barcelone.

**Mes** sincères remerciements vont à mon collègue Dr. Lahoum A, pour son aide inestimable dans la recherche des souches fongiques ainsi que ses encouragements durant cette période.

L'intervention de Mr. Benajila de la part du laboratoire vétérinaire régional de Laghouat m'a beaucoup aidé, je le remercie pour sa présence et son aide.

**Un** grand merci va aussi au Dr. Sifi I qui m'a énormément aidé et encouragé.

## ملخص

داء المبيضات أو الالتهابات التي تسببها الممرضات *Candida albicans*، تعتبر تهديدا حقيقيا للأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة. حاليًا بالإضافة إلى آثارها الجانبية، أظهرت العلاجات المضادة للفطريات فعالية منخفضة أمام هذه الخميرة المقاومة، وبالتالي فقد قام الباحثون بتوجيه دراساتهم إلى المصادر الطبيعية من أجل إيجاد بدائل أكثر فعالية وبأقل تأثير سلبي على الخلايا المضيفة. تحقيقا لهذه الغاية، حددنا هدفنا في مجالين متكاملين. كان الجزء الأول من العمل عمليًا حيث بدأنا باستخراج مواد الايض الثانوية من ثمرة الرمان، سرّة البطم، القطف وحب الرشاد. كشف اختبار النشاط المضاد للفطريات لهذه المستخلصات على أربع سلالات *C.albicans* باستخدام طريقة التخفيف الجزئي وكشف INT عن حساسية الخمائر التي تعتمد على طبيعة المستخلص وتركيزه. في الوسط (تباين التركيز المشط الأدنى من أكثر من 4 إلى 0,125 ملغ / مل). لتأكيد الاختبارات السابقة تم اجراء اختبار القدرة المشبطة لإنزيم الليباز للمستخلصات التي اثبتت نشاطيتها ضد ميكروبية حيث وجدنا ان غالبية المستخلصات المختبرة لها القدرة على تثبيط نشاط نصف كمية الانزيمات في وسط التفاعل بتركيز مهمة (IC<sub>50</sub> من 2,29 الى 0,78 ملغ/ملل). في الجزء الثاني، نستخدم الاعلام الالي كأداة لإعطاء نموذج لرسو جزيئي بين أربعة إنزيمات رئيسية في عملية التمثيل الغذائي للخلايا الفطرية (ليباز، وسيرين / ثريونين فسفاتاز ، وإيزوميراز فوفومانوز وإيستيرول -alpha14 ديميتيلاز) واثنين من جزيئات قلويدات طبيعية (Lepidine B و Lepidine E معزولة من مستخلص حب الرشاد). تؤكد من خلال هذا العمل انه لم يتم التطرق سابقا الى نفس الدراسة مما يعطي اصلية لهذا البحث. يظهر الإلصاق تقارب الجزيئات الخاصة بالإنزيمات التي تم اختبارها ، والتي تسلط الضوء على العلاقة بين النتائج في المختبر وتلك التي تم الحصول عليها في دراسة البرمجة الالية.

**الكلمات المفتاحية :** مبيضات، مستخلصات طبيعية، قلويدات، نشاطية مضادة للفطريات، تثبيط انزيمي، Lepidine B،

Lepidine E، رسو جزيئي.

## Résumé

Les candidoses ou infections causées par l'agent pathogène *Candida albicans*, sont considérées comme véritable menace pour les gens dont l'immunité est affaiblie. Actuellement et en plus de leurs effets secondaires, les traitements antifongiques ont montré une faible efficacité devant cette levure résistante, de ce fait les chercheurs ont orienté leurs études vers les sources naturelles afin de trouver des alternatifs plus spécifiques, efficaces et moins d'action négative sur les cellules de l'hôte. Dans ce but, nous avons cerné notre objectif sur deux volets complémentaires. La première partie du travail était pratique où nous avons commencé par l'extraction des métabolites secondaires à partir de *Lepidium sativum*, *Punica granatum*, *Atriplex halimus* et *Inonotus hispidus*. Le test de l'activité antifongique de ces extraits sur quatre souches de *C. albicans* à l'aide de la méthode de microdilution par le révélateur INT a permis de savoir la sensibilité des levures qui dépend de la nature de l'extrait et sa concentration dans le milieu (variation de CMI de plus de 4 à 0,125mg/ml). Pour confirmer les tests précédents, l'étude du pouvoir inhibiteur de la lipase de *C. rugosa* des extraits bioactifs est réalisée sur microplaque, le résultat a montré la capacité de la majorité des extraits à inhiber l'activité de cette enzyme avec des concentrations inhibitrices intéressantes (IC<sub>50</sub> de 2,29 à 0,78 mg/ml). Dans la deuxième partie, nous voulons proposer le mécanisme d'inhibition exercé par ces molécules en utilisant la modélisation moléculaire par l'amarrage moléculaire de quatre enzymes clés dans le métabolisme des cellules fongiques à savoir la Lipase, la Serine/thréonine phosphatase, la phosphomannose isomérase et la sterol-14alpha déméthylase, avec deux molécules alcaloïdiques naturelles (Lépidine B et Lépidine E isolées de *L. sativum*). Nous confirmons qu'aucune étude préalable dans ce contexte n'a été trouvée dans la littérature, c'est l'originalité de ce travail. Le docking montre l'affinité des molécules aux enzymes testées ce qui met en valeur la corrélation entre les résultats *in vitro* et ceux obtenus par l'étude *in silico*.

**Mots clés :** *Candida albicans*, extraits naturels, alcaloïdes, activité antifongique, inhibition enzymatique, lepidine B, lepidine E, amarrage moléculaire.

## Abstract

Candidiasis or infections caused by the pathogen *Candida albicans*, are considered to be a real threat to people with weakened immunity. Currently and in addition to their side effects, antifungal treatments have shown low effectiveness in front of this resistant yeast, therefore researchers have directed their studies to natural sources in order to find more specific, effective alternatives and with less negative action on host cells. To this end, we have identified our objective in two complementary areas. The first part of the work was practical where we started by extracting secondary metabolites from *Lepidium sativum*, *Punica granatum*, *Atriplex halimus* and *Inonotus hispidus*. The test of the antifungal activity of these extracts on four strains of *C. albicans* using the microdilution method by the INT developer revealed the sensitivity of the yeasts which depends on the nature of the extract and its concentration. in the medium (variation of MIC from more than 4 to 0.125mg / ml). To confirm the previous tests, the study of the inhibitory power of *C.rugosa* lipase from bioactive extracts is carried out on a microplate, the result showed the capacity of the majority of extracts to inhibit the activity of half of the enzymes present in the reaction medium with interesting concentrations (IC50 from 2.29 to 0.78 mg / ml). In the second part, we want to propose the mechanism of inhibition exerted by these molecules by using molecular docking of four key enzymes in the metabolism of fungal cells namely Lipase, serine / threonine phosphatase, phosphomannose isomerase and sterol-14alpha demethylase. We confirm that no previous study in this context has been found in the literature, this is the originality of this work. Docking shows the affinity of the molecules for the enzymes tested, which highlights the correlation between the *in vitro* results and those obtained by the *in silico* study.

**Key words:** *Candida albicans*, natural extracts, alkaloids, antifungal activity, enzymatic inhibition, lepidine B, lepidine E, molecular doking.

## Publication scientifique

- **Gacemi, S.,** Benarous, K., Imperial, S., & Yousfi, M. (2019). Lepidine B & E as new target inhibitors from *Lepidium sativum* seeds against four enzymes of the pathogen *Candida albicans*: *in vitro* and *in silico* studies. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* (catégorie A, IF : 1.1)

VOLUME: 20

ISSUE: 1

Year: 2020

Page: [127 - 138]

Pages: 12

DOI: [10.2174/1871530319666190415141520](https://doi.org/10.2174/1871530319666190415141520)

## Communication internationale

- **Gacemi. S.,** Benaous, K., Aid. K., Djenaoui F.Z. L'effet inhibiteur des extraits naturels de *Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus* et *Punica granatum* L contre quelques souches microbiennes. Séminaire international sur la phytodiversité et plantes d'intérêt écologique et économique, Inventaire, Conservation et Valorisation. Université de M'sila. 29-30 octobre 2017.

## Liste des abréviations

**A** : absorbance

**AC** : extrait d'acétate d'éthyle

**AK** : extrait alcaloïdique

**ATCC** : American type culture collection

***C.albicans*** : *Candida albicans*

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**E** : est

**HX** : extrait d'hexane

**I %** : pourcentage d'inhibition

**IC<sub>50</sub>** : concentration inhibant la moitié des enzymes dans le milieu réactionnel

**INT** : iodonitrotétrazolium

**LCR** : lipase de *Candida rugosa*

**mM** : milli molaire

**N** : nord

**PDB** : Potein Data Bank

**UF** : unité fongique

## **Liste des tableaux**

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1.</b> Quelques molécules d'origine naturelle avec pouvoir antifongique. ....                      | 26 |
| <b>Tableau 2.</b> Espèces végétales et champignon étudiés avec régions de collecte (Web1). ....               | 36 |
| <b>Tableau 3.</b> Références des souches fongiques testées. ....                                              | 37 |
| <b>Tableau 4.</b> Tests biochimiques d'identification des levures (Biomerieux, 2016). ....                    | 41 |
| <b>Tableau 5.</b> Paramètres cinétiques de la LCR (Benarous, 2014). ....                                      | 44 |
| <b>Tableau 6.</b> Les enzymes cibles avec paramètres du docking. ....                                         | 49 |
| <b>Tableau 7.</b> Rendements, aspects et couleurs des extraits obtenus. ....                                  | 51 |
| <b>Tableau 8.</b> Activité antifongique des extraits de <i>P.granatum</i> (CMI, CMF) ....                     | 56 |
| <b>Tableau 9.</b> Activité antifongique des extraits de <i>I.hispidus</i> (CMI, CMF) ....                     | 58 |
| <b>Tableau 10.</b> Activité antifongique des extraits d' <i>A.halimus</i> (CMI) ....                          | 59 |
| <b>Tableau 11.</b> Activité antifongique des extraits de <i>L.sativum</i> (CMI) ....                          | 60 |
| <b>Tableau 12.</b> Inhibition de la Lipase par quelques extraits de plantes. ....                             | 61 |
| <b>Tableau 13.</b> Les résultats des interactions entre les composés (Lépidine B et E) et les 4 enzymes. .... | 64 |

## Liste des figures

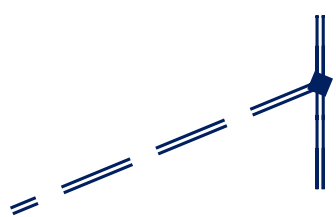
|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Diversité des formes de levures (Carlile et al., 2001). .....                                                                                          | 7  |
| <b>Figure 2.</b> Biofilm de <i>Candida albicans</i> observé au microscope électronique à balayage (Sardi et al., 2013). .....                                           | 8  |
| <b>Figure 3.</b> Invasion des tissus par <i>C. albicans</i> ainsi que les facteurs de virulence impliqués (Naglik et al., 2003 ; Gow et al., 2012 ). .....              | 11 |
| <b>Figure 4.</b> Pathogénie des infections à <i>Candida</i> (Eggigman et Pittet, 2002). .....                                                                           | 13 |
| <b>Figure 5.</b> Candidoses superficielles, (A) Onyxis. (B) et (C) Orale. (D) Intertrigo des petits plis. (E) Œsophagienne. ....                                        | 19 |
| <b>Figure 6 .</b> Molécules antifongiques : Amphotéricine. Fluconazole. Itraconazole (Carrillo-Munoz et al., 2006). ....                                                | 21 |
| <b>Figure 7.</b> Métabolites secondaires produits par les basidiomycètes (Photo de <i>Pycnoporus</i> sp Blackwell, 2011 ; De Silva et al., 2013). .....                 | 24 |
| <b>Figure 8.</b> Classification botanique de <i>Punica granatum</i> (le grenadier) (Ravindran., 2017). ....                                                             | 26 |
| <b>Figure 9.</b> Classification botanique de <i>Lipidium sativum</i> (cresson alénois) (Prajapati et al., 2014 ; Ravindran., 2017). .....                               | 27 |
| <b>Figure 10.</b> Classification botanique d' <i>Atriplex halimus</i> (Walker et al., 2014). ....                                                                       | 28 |
| <b>Figure 11.</b> Le polypore hérissé, <i>Inonotus hispidus</i> (Dai, 2010) et sa classification (Végh, 1987 ; Vukojević et al., 2016). .....                           | 30 |
| <b>Figure 12.</b> Résumé d'une approche de la conception de médicament à base de la structure (de Ruyck et al., 2016). ....                                             | 31 |
| <b>Figure 13.</b> Capture d'écran du site PDB. ....                                                                                                                     | 34 |
| <b>Figure 14.</b> Sites géographiques des zones de collectes du matériel biologique (web1). ....                                                                        | 37 |
| <b>Figure 15.</b> Procédure d'extraction d'EAC et EHx. ....                                                                                                             | 38 |
| <b>Figure 16.</b> Procédure d'extraction des alcaloïdes (AK) à partir de la matière végétale solide. ....                                                               | 39 |
| <b>Figure 17.</b> Procédure d'extraction des alcaloïdes à partir du jus de fruits de <i>P.granatum</i> . ....                                                           | 40 |
| <b>Figure 18.</b> Application du test de CMI en microplaque. ....                                                                                                       | 43 |
| <b>Figure 19.</b> Photo en surface du LCR (code PDB : 1LCR ; Cygler et Schrag, 1999) avec l'état ouvert du couvercle obtenu à partir du logiciel PyMol .....            | 44 |
| <b>Figure 20.</b> Structures chimiques de la Lepidine B et E (Shukla et al., 2011). ....                                                                                | 48 |
| <b>Figure 21.</b> Représentation graphique des rendements d'extractions. ....                                                                                           | 51 |
| <b>Figure 22.</b> Pourcentages des fractions alcaloïdiques contenues dans le fruit du grenadier. ....                                                                   | 52 |
| <b>Figure 23.</b> Résultat de la galerie API Cand. ....                                                                                                                 | 54 |
| <b>Figure 24.</b> Photos des microplaques incubée 24h à 30°C avec la réaction des puits à l'INT. ....                                                                   | 55 |
| <b>Figure 25.</b> Représentation de la meilleure pose d'amarrage de la Lepidine B & E avec le site actif de la lipase de <i>Candida rugosa</i> . ....                   | 65 |
| <b>Figure 26.</b> Représentation de la meilleure pose d'amarrage de la lépidine B & E sur le site actif de la Serine/threonine phosphatase de <i>C. albicans</i> . .... | 67 |
| <b>Figure 27.</b> Représentation de la meilleure pose d'amarrage de la lépidine B & E sur le site actif de la phosphomannose isomerase de <i>C. albicans</i> . ....     | 69 |
| <b>Figure 28.</b> Représentation de la meilleure pose d'amarrage de la lépidine B & E sur le site actif de la Stérol 14-alpha diméthylase de <i>C. albicans</i> . ....  | 71 |



## Table des matières

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction .....</b>                                            | <b>2</b>  |
| <b>Synthèse bibliographique.....</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>I. Candidoses et germe pathogène <i>Candida albicans</i>.....</b> | <b>6</b>  |
| 1. Historique.....                                                   | 6         |
| 2. Généralités sur les champignons.....                              | 6         |
| 2.1. Levures .....                                                   | 7         |
| 2.2. Le genre <i>Candida</i> .....                                   | 8         |
| 2.3. Pathogénicité de <i>Candida</i> .....                           | 10        |
| 2.4. Les Candidoses .....                                            | 12        |
| 2.5. Facteurs prédisposant aux candidoses .....                      | 13        |
| 3. Les pathologies associées aux candidoses.....                     | 15        |
| 3.1. Les candidoses superficielles .....                             | 15        |
| 3.2. Candidoses profondes .....                                      | 19        |
| 4. Antifongiques et antibiorésistance .....                          | 21        |
| <b>II. Produits naturels et bioactivité .....</b>                    | <b>23</b> |
| 1. Plantes médicinales.....                                          | 23        |
| 2. les basidiomycètes .....                                          | 23        |
| 3. Métabolisme secondaire.....                                       | 25        |
| 4. Activité biologique des produits naturels.....                    | 25        |
| 5. Espèces sélectionnées pour l'étude.....                           | 26        |
| 5.1. <i>Punica granatum</i> .....                                    | 26        |
| 5.2. <i>Lepidium Sativum</i> .....                                   | 27        |
| 5.3. <i>Atriplex halimus</i> .....                                   | 28        |
| 5.5. <i>Inonotus hispidus</i> .....                                  | 29        |
| <b>III. Amarrage moléculaire.....</b>                                | <b>30</b> |
| 1.Introduction .....                                                 | 30        |
| 2. Théorie du docking.....                                           | 31        |
| 3. Notion de dynamique moléculaire DM.....                           | 32        |
| 4. Programmes utilisés .....                                         | 32        |
| 4.1. Etapes de de docking.....                                       | 33        |
| <b>Matériel et méthodes.....</b>                                     | <b>35</b> |
| <b>I. Matériel biologique.....</b>                                   | <b>36</b> |
| 1.Plantes sélectionnées et champignon.....                           | 36        |

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2. Souches fongiques.....                                                                    | 37        |
| <b>II. Méthodes .....</b>                                                                    | <b>38</b> |
| 1. Extraction des produits naturels.....                                                     | 38        |
| 2. Etude de l'activité antifongique des extraits naturels sur <i>Candida albicans</i> .....  | 40        |
| 3. Test de l'activité inhibitrice sur l'enzyme : Lipase de <i>Candida rugosa</i> (LCR) ..... | 43        |
| 4. Amarrage moléculaire .....                                                                | 45        |
| 4.1. Choix des enzymes.....                                                                  | 45        |
| A. Lipase de <i>Candida rugosa</i> (LCR).....                                                | 45        |
| B. Serine/thréonine phosphatase de <i>Candida albicans</i> (StPCA) .....                     | 46        |
| C. Phosphomannose isomérase de <i>Candida albicans</i> (PMICA) .....                         | 46        |
| D. Stérol 14-alpha demethylase de <i>Candida albicans</i> (CYP51) .....                      | 47        |
| 4.2. Choix des molécules inhibitrices .....                                                  | 47        |
| <b>Résultats et discussion.....</b>                                                          | <b>50</b> |
| 1. Extraction des métabolites secondaires .....                                              | 51        |
| 2. Identification des souches fongiques.....                                                 | 53        |
| 3. Test de l'activité antifongique .....                                                     | 54        |
| 3.1. Extraits de <i>Punica granatum</i> .....                                                | 56        |
| 3.2. Extrait d' <i>Inonotus hispidus</i> .....                                               | 57        |
| 3. Extrait d' <i>Atriplex halimus</i> .....                                                  | 58        |
| 3.5. Extrait de <i>Lepidium sativum</i> .....                                                | 59        |
| 4. Inhibition de la lipase de <i>Candida rugosa</i> (LCR).....                               | 60        |
| 5. Amarrage moléculaire .....                                                                | 62        |
| 5.1. Lipase de <i>Candida rugosa</i> (LCR) .....                                             | 63        |
| 5.2. La Serine/threonine phosphatase de <i>C. albicans</i> (StPCA) .....                     | 66        |
| 5.3. Phosphomannose isomerase de <i>C. albicans</i> (PMICA) .....                            | 67        |
| 5.4. Stérol 14-alpha diméthylease de <i>C. albicans</i> (CYP51).....                         | 69        |
| <b>Conclusion.....</b>                                                                       | <b>72</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>                                                      | <b>75</b> |
| <b>Annexe</b>                                                                                |           |



# ***Introduction***

L'incidence des infections fongiques a considérablement augmenté, contribuant ainsi à la morbidité et la mortalité. Cela est dû à une augmentation de la résistance aux antimicrobiens et le nombre restreint de médicaments antifongiques, qui causent de nombreux effets secondaires (Sardi *et al.*, 2013).

L'espèce de *Candida albicans* est un champignon dimorphe qui existe sous forme d'un commensal d'animaux à sang chaud, y compris les humains, considérés comme pathogènes fongiques humains majeurs qui causent à la fois les infections des muqueuses et celles des tissus profonds. Des données récentes suggèrent que la majorité des infections produites par ce pathogène sont associées à la croissance des biofilms (Sardi *et al.*, 2013 ; Rathod *et al.*, 2015 ; Weerasekera *et al.*, 2016 ; Ben-Ami, 2018).

La sécrétion d'enzymes hydrolytiques par ces levures pathogènes a été proposée comme l'un des facteurs de virulence en favorisant la pénétration active dans les cellules hôtes (Pereira *et al.*, 2015). La lipase de *C. albicans*, qui est une enzyme extracellulaire impliquée dans le mécanisme d'invasion par son hydrolyse des triacylglycérols, établis l'infection (Gacser *et al.*, 2007 ; Mayer *et al.*, 2013 ; Benarous *et al.*, 2015). De plus en se référant à l'étude d'Ismail *et al.* (2018), trois enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire sont également importantes dans la recherche et la conception de médicaments antifongiques. La première sera impliquée dans la déphosphorylation d'une variété de substrats protéiques (sérine / thréonine phosphatase), tandis que la seconde est une enzyme importante responsable de l'isomérisation réversible du D-mannose 6 phosphate et du D-fructose 6-phosphate (phosphomannose isomérase). La troisième est Stérol 14- $\alpha$  déméthylase qui sera utilisée par les cellules eucaryotes pour la biosynthèse des stérols (Lamb *et al.*, 1997 ; Roux *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2016 ; Markus *et al.*, 2017 ; Hargrove *et al.*, 2017).

Ces dernières années, la recherche sur les plantes médicinales a attiré une attention globale surtout sur les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle (Cowan, 1990). Du fait de l'apparition de la résistance multiple des microorganismes pathogènes humains aux antibiotiques, les microbiologistes s'intéressent beaucoup à l'usage d'extraits naturels comme sources d'antimicrobiens.

Les extraits de plantes et des composés d'origine végétale sont des sources précieuses pour la médecine traditionnelle dans le traitement et la prévention d'un large éventail de maladies, notamment les maladies infectieuses telles que les candidoses (Mahmoudvand *et al.*, 2014).

En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires. Il s'agit de molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Jain *et al*, 2019).

Pour mieux comprendre et interpréter les interactions effectuées dans les complexes molécules inhibitrices-enzymes, nous avons utilisé l'amarrage moléculaire, l'un des outils bioinformatiques permettant la mise en évidence de tout type de liaisons existant entre le ligand et le site actif ainsi que le taux d'interaction plus l'énergie engendré par cet accouplage moléculaire. Le docking est considéré comme une technique accompagnant les études *in vitro* ou carrément un moyen pour la proposition de nouvelles structures cibles, étant donné que la structure atomique d'une macromolécule, comme une enzyme, il devrait être possible de trouver de nouvelles molécules qui s'y lient, modulant son activité. Nous considérons ici un aspect de ce domaine : découverte de ligands inhibiteurs basée sur la structure (Shoichet *et al*, 2002).

Dans cette étude, nous avons procédé à un ensemble d'études *in vitro* et *in silico* afin de trouver des inhibiteurs de la croissance des levures pathogènes à l'Homme : *Candida albicans* sur la base des extraits et molécules d'origine naturelles.

Le travail commence par une introduction, une partie bibliographique, une partie expérimentale et se termine avec une conclusion et perspectives. La partie bibliographique se compose d'une synthèse de données théoriques de trois grands domaines : les candidoses, les extraits naturels et bioactivités, et l'amarrage moléculaire. Concernant la partie pratique, elle représente l'ensemble des expériences et protocoles expérimentaux appliquées *in vitro* et *in silico* exprimé en matériel et méthodes et résultats et discussion.

Nous rappelons que cette étude est une continuité des travaux précédents réalisés dans le même laboratoire des sciences fondamentales, Université Amar Telidji-Laghouat-, dans le cadre d'obtention des diplômes de magister et doctorat, elle rentre dans l'un des thèmes de recherche de l'équipe de Modélisation moléculaire des mécanismes d'inhibition enzymatique des molécules bioactives dirigée par Dr. Khedidja BENAROUS. Ces recherches précédentes ont menés aux 15 publications internationales et 12 communications internationales.

Ainsi, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur les effets des extraits naturels

des plantes : *Lepidum sativum*, *Punica granatum* , *Atriplex halimus* et *Inonotus hispidus* sur l'activité antimicrobienne de *Candida albicans* par la méthode de microdilution, ainsi sur l'activité enzymatique de la lipase. De même aucun travail scientifique n'a été publié sur la modélisation moléculaire des quatre enzymes microbiennes avec ces ligands.

.



***Synthèse  
bibliographique***

## **I. Candidoses et germe pathogène *Candida albicans***

### **1. Historique**

Les infections existent probablement depuis très longtemps, puisque l'on retrouve les traces décrites d'Hippocrate décrivant le muguet buccal au IV<sup>ème</sup> siècle avant Jésus -Christ (Anaissie, 1992).

Cependant il faut attendre le début du XIX<sup>ème</sup> siècle pour voir apparaître la mycologie médicale et plus précisément en 1839 pour que Langenbeck décrive pour la première fois le champignon responsable du muguet chez l'homme (Knoke et Bernhardt, 2006). Quelques années plus tard, ce champignon est nommé *Oidium albicans*, puis *Monilia albicans* à cause de son rôle dans les moniliooses, puis *Candida albicans* (*C. albicans*) en 1923 par **Berkhout**, pour différencier le pathogène humain des champignons du genre *Monilia* (Barnett, 2004). En plus, en 1932, il propose le nom de *Candida* au genre regroupant toutes les levures anascosporées produisant du mycélium vrai ou du pseudo-mycélium (Ripert, 2013).

Dès la deuxième moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle, les descriptions et les observations cliniques vont se multiplier puis, à partir de la moitié du XX<sup>ème</sup> siècle (1950) avec l'arrivée et la large utilisation des antibiotiques, le nombre de candidoses ne cessera pas d'augmenter (Ripert, 2013).

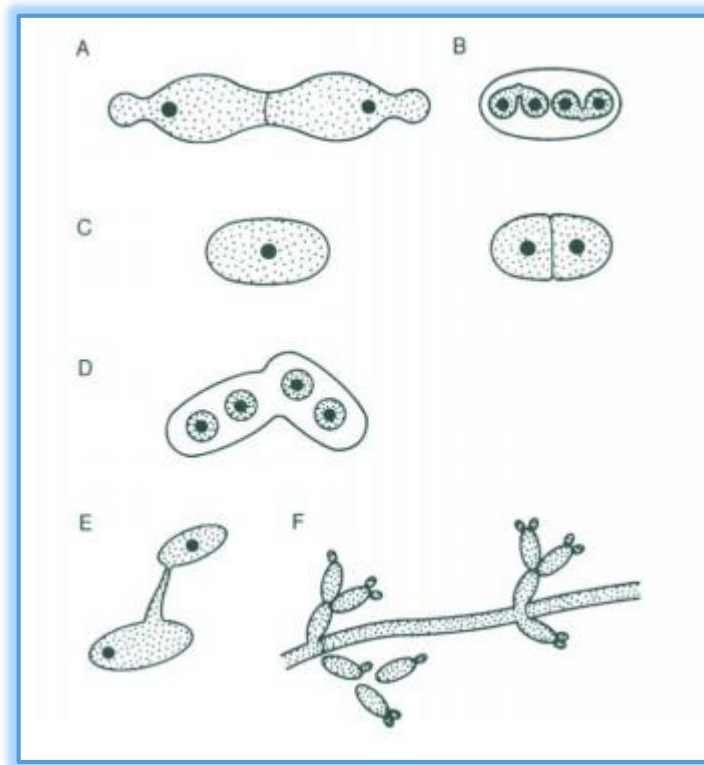
### **2. Généralités sur les champignons**

Les champignons ou mycètes sont des eucaryotes, et possèdent donc un noyau entouré d'une membrane nucléaire, ainsi que différents types d'organites cytoplasmiques limités par des membranes. Ils sont plus grands que les bactéries et peuvent constituer des assemblages de grande taille (Hart et Shears, 1999), et leur paroi cellulaire est constituée de chitine et non de peptidoglycane (Geraled, 2015). On distingue trois groupes majeurs de champignons : les moisissures, les levures et les champignons macroscopiques (Madigan et Martinko 2007; Willey *et al.*, 2013 ). En majorité, ils vivent libres dans l'environnement et participent activement à la dégradation de la matière organique d'origine végétale. Certaines espèces fongiques se comportent en pathogènes obligatoires : c'est le cas des dermatophytes ou de certains champignons dimorphiques. Les autres, beaucoup plus nombreuses, sont considérées comme des pathogènes opportunistes, autrement dit des organismes habituellement non pathogènes, mais capables de devenir parasites à l'occasion d'une diminution des défenses immunitaires de l'hôte (Guillot et Dannaoui, 2016). Parmi les agents pathogènes de ce règne, on trouve des levures comme *C. albicans* ou *Cryptococcus*

*neolormans*, et des dermatophytes formant des filaments mycéliens complexes comme *Epidermophyton floccosum* (Hart et Shears, 1997).

## 2.1. Levures

Les levures sont des mycètes qui se développent principalement ou exclusivement dans un état unicellulaire (figure 1). Beaucoup se trouvent sur les surfaces des plantes où ils sont capables d'exploiter naturellement les nutriments exsudés, Ils sont abondants sur les feuilles et les fruits et dans les nectars de fleurs. On trouve d'autres levures à la surface et dans les intestins des animaux, en particulier insectes, et quelques-uns sont des agents pathogènes de l'homme et des animaux à sang. Non filamenteux, sont généralement sphériques ou ovales ces champignons produisent des ascospores, certaines basidiospores et certaines anamorphe, sans phase sexuelle (Carlile *et al.*, 2001 ; Tortora *et al.*, 2012).



**Figure 1.** Diversité des formes de levures (Carlile *et al.*, 2001).

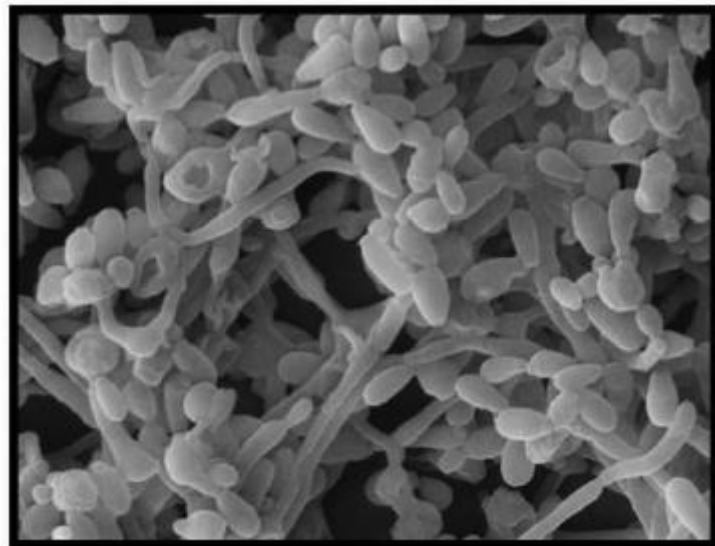
**A**, *Saccharomyces ludwigii*. Le bourgeonnement provient de la base et des extrémités des cellules. Les deux cellules mères ne sont pas encore séparées. **B**, *S. ludwigii*. Les ascospores germent et s'accouplent dans l'asque pour rétablir l'état diploïde. **C**, *Schizosaccharomyces pombe*. La division cellulaire est par fission binaire. **D**, *S. pombe*. Ascospore, la production suit immédiatement l'accouplement pour rétablir l'état haploïde. **E**, *Sporobolomyces sp.* Production d'une ballistospore, qui a ensuite été déchargée de force, sur un stérigme. **F**, *Candida albicans*. Production de cellules de levure naissantes, à partir d'une hyphe.

## **2.2. Le genre *Candida***

### **a. Caractères morphologiques**

Le genre *Candida* dénombre plus de 300 espèces parmi lesquelles seule une minorité, dont *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* et *C.dubliniensis* peuvent être pathogènes(Akpan et Morgan ,2002).

L'espèce *C.albicans* (figure 2), est un micro-organisme, il s'agit d'une levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multilatéral, productrice de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture (Develoux et Bretagne, 2005). Qu'elle se trouve tant sur la peau que sur la muqueuse des sujets sains, elle vit d'habitude dans la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal et le vagin (Pignatta, 2010).



**Figure 2.** Biofilm de *Candida albicans* observé au microscope électronique à balayage (Sardi *et al.*, 2013).

*C. albicans* peut exister sous quatre stades morphologiques différents :

#### **➤ Les blastospores ou blastoconidies**

La forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4  $\mu\text{m}$  avec parfois un bourgeon de formation .Cette cellule peut émettre un bourgeon qui donnera une cellule fille identique à la cellule mère) (Sudbery, 2001).

#### **➤ Le pseudo – mycélium**

Mesurant de 500 à 600  $\mu\text{m}$  de longueur et de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien( Sudbery, 2001) .Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel

génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants (Barelle *et al.*, 2006).

✓ **Le mycélium**

Le mycélium vrai s'observe avant tout avec *C. albicans* ainsi qu'avec quelques autres espèces. Au début de la germination, le bourgeon formé va s'allonger et donner naissance à une structure tubulaire allongée ( qui mesure 2 à 3 fois la longueur de la cellule mère , au diamètre régulier, le tiers environ de celle de la cellule qui lui a donné naissance ), à ce stade, il y a continuité cytoplasmique entre la blastospores et ce « tube germinatif » cette formation s'observe chez un nombre limité d'espèces, assez vite pour *C. albicans* et *C. dubliniensis* (en moins de 3heures) (Ripert, 2013).

✓ **Chlamydoespores**

Ce sont de volumineuses cellules (10 à 15 micromètre), sphériques, à double paroi et plus épaisse, réfringentes, le plus souvent terminales, mais pouvant être latérales (Nobile *et al.*, 2003).

Les chlamydoespores peuvent être induites à se former dans des conditions limitées oxygène, éléments à basse et température (Nobile *et al.*, 2003). Les chlamydoespores sont la forme de résistance de *C. albicans* (Ingle *et al.*, 2017).

**b. Taxonomie (Akpan et Morgan, 2002).**

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Saccharomycetes

Ordre : Saccharomycetales

Famille : Saccharomycetaceae

Genre : *Candida*

Espèce : ***Candida albicans***

### **c. Cycle de vie**

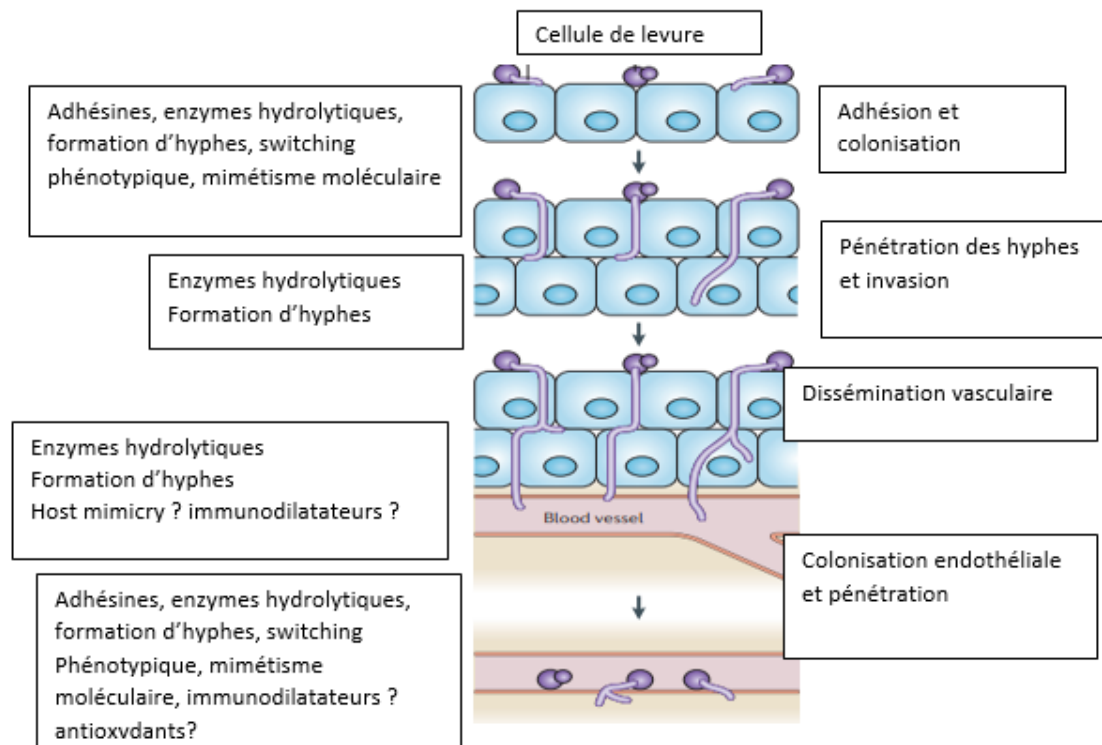
Les études portant sur les échanges de matériel génétique entre différentes souches de *C. albicans* ont montré que la multiplication se faisait la plupart du temps de manière clonale (bourgeonnement) mais des recombinaisons ont également été observées (Hull et Heitman, 2002). La reproduction sexuée a été formellement démontrée par deux études utilisant des approches différentes en 2000 (Herre *et al.*, 2004), il s'agit d'un évènement rare puisqu'elle ne se produirait, *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*, qu'une fois momentanément tétraploïde à une cellule diploïde se produit sans méiose, par simple perte aléatoire de chromosomes formant un cycle para sexuel (Gow, 2002 ; Forche *et al.*, 2008).

L'examen du génome de *C. albicans* a permis d'identifier des orthologues de plusieurs gènes impliqués dans la méiose chez d'autres champignons. Par contre, certains gènes importants paraissent manquer. Ceci suggère que si la méiose se produit chez *C. albicans*, ce pourrait être selon des modalités différentes des autres champignons (Miller et Jhonson, 2002 ; Dujon, 2010).

### **2.3. Pathogénicité de *Candida***

Une des caractéristiques principales de son pouvoir pathogène est sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales liées à sa variabilité structurale et antigénique, l'expression des molécules impliquées dans l'adhérence aux cellules de l'hôte, la formation de biofilm (Trofa *et al.*, 2008), ainsi que la sécrétion d'enzymes hydrolytiques telles que les aspartyl protéases (Sap), les phospholipases et les lipases (Sugiyama *et al.*, 1999 ; Trofa *et al.*, 2008).

L'adhérence aux tissus de l'hôte est essentielle pour initier et maintenir l'interaction spécifique hôte/levure avec les mannoprotéines de la paroi de la levure (Gaur *et al.*, 1999). Les biofilms sont des structures très organisées de microorganismes (généralement bactéries ou champignons) attachés les uns aux autres et encastrés dans une matrice polymérique extracellulaire ayant une épaisseur variant entre 50 et 350  $\mu\text{m}$  (Baillie et Douglas, 2000). On peut retrouver les structures de biofilms un peu partout dans l'environnement ainsi qu'à l'intérieur du corps humain sur des cathéters, des prothèses ou encore sur la paroi des vaisseaux sanguins. À ce jour, très peu de médicaments ont démontré une efficacité antifongique significative contre les structures de biofilms (Mukherjee *et al.*, 2005).



**Figure 3.** Invasion des tissus par *C. albicans* ainsi que les facteurs de virulence impliqués (Naglik *et al.*, 2003 ; Gow *et al.*, 2012).

Dans un premier temps (figure3), les blastopores (cellules fongiques bourgeonnantes) adhéreront à une surface pour ensuite bourgeonner et créer des micro colonies (détectées entre la 3 et 4 heures).

Des études de microscopie ont révélées que la formation du biofilm se faisait selon trois phases de développement : la phase initiale (0 à 11 heures), la phase intermédiaire (12 à 30 heures) et la maturation (31 à 72 heures) (Chandra *et al.*, 2001). Ensuite, entre la 4e et 8e heure, les pseudohyphes et les hyphes apparaîtront. Les microcolonies seront ensuite rattachées aux pseudohyphes et hyphes créant ainsi une monocouche confluyente (Phase intermédiaire). Les cellules bourgeonnantes formeront la couche basale du biofilm tandis que les pseudohyphes et hyphes (cellules filamenteuses) formeront le corps du biofilm.

Lors de la phase intermédiaire, il y aura le développement d'un film opaque composé de matériel extracellulaire recouvrant les microcolonies fongiques. Puis, lors de la phase de maturation, la quantité de matrice extracellulaire augmentera considérablement en fonction du temps jusqu'à ce que le biofilm devienne mature (Lawrence *et al.*, 1991).

Suivant la figure 3, plusieurs facteurs de virulence sont impliqués dans le phénomène d'invasion des tissus de l'hôte par ce microorganisme pathogène, nous citons (Calderone et Fonzi, 2001 ; Naustin, 2013 ; Pereira *et al.*, 2015 ) :

- ✓ Les adhésines de surface
- ✓ La formation de biofilms (hyphes)
- ✓ Switching de phénotype
- ✓ Antibio-résistance
- ✓ Hydrophobicité de surface
- ✓ Sécrétion d'enzymes lytiques

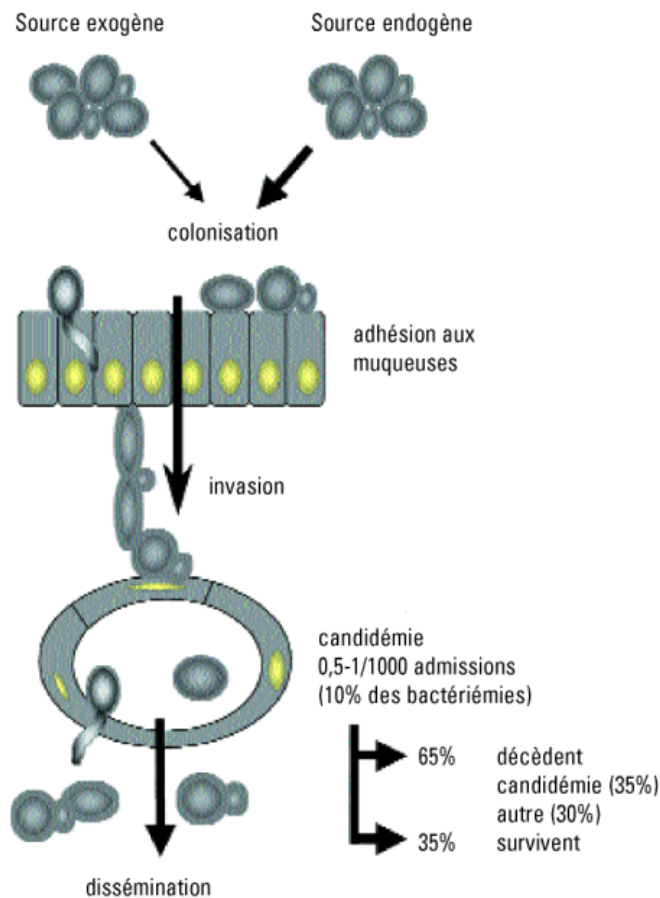
La sécrétion d'enzymes hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires (Schaller *et al.*, 2005).

Les lipases sont caractérisées par leur capacité à catalyser l'hydrolyse des liaisons ester des mono, di et triacylglycérols et même des phospholipides (Hube, 2000). Les phospholipases jouent également un rôle important dans la pathogenèse de *Candida* car elle est capable d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons ester des glycérophospholipides (Trofa *et al.*, 2008).

## **2.4. Les Candidoses**

Les candidoses sont des infections dues au genre *Candida*, elles sont en augmentation dans certains groupes à risque. Parmi les nombreuses espèces connues, seules certaines peuvent être pathogènes pour l'homme ; *C. albicans* reste la plus fréquente (Pilly, 2012). Plusieurs autres espèces de *Candida*, notamment *C. tropicalis* et *C. krusei*, peuvent jouer un rôle dans les candidoses (Tortora *et al.*, 2011). Contrairement aux autres champignons pathogènes, ces deux organismes sont des membres de la flore normale du tractus digestif, de l'appareil respiratoire, du vagin et de la bouche (Brandt et Ndowa, 2008). Chez les individus sains, ils ne provoquent pas de la maladie parce que leur développement est inhibé par les autres microorganismes et d'autres mécanismes de résistance (Willey *et al.*, 2013) mais, si l'équilibre de la flore normale et de l'immunocompétence est perturbé, *Candida* peut se multiplier rapidement et provoquer une candidose (Guillot et Dannaoui, 2015).

Les *Candida* sont devenus des agents pathogènes importants (figure 4). Dans certains hôpitaux, ils représentent 10% des infections sanguines nosocomiales (Willey *et al.*, 2013) de plus aucun autre champignon pathogène ne produit un spectre de maladies aussi variés chez l'homme que *Candida*, les infections affectent en majorité la peau ou les muqueuses.



**Figure 4.** Pathogénie des infections à *Candida* (Eggigmann et Pittet, 2002).

## 2.5. Facteurs prédisposant aux candidoses

L'ampleur de l'infection fongique dépend d'une part de facteurs liés à l'hôte dont : Des facteurs intrinsèques tels que l'âge, le sexe ou un affaiblissement général de l'immunité dû à certaines maladies comme le diabète, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou les cancers, et des facteurs extrinsèques tels que des traitements médicamenteux ou chirurgicaux (Akpan et Morgan, 2002).

### a. Les facteurs intrinsèques liés à l'hôte

- **Âge**

Cette affection est liée avec l'âge, elle touche surtout les femmes jeunes et d'âge moyen, la femme enceinte, mais beaucoup plus rarement la femme âgée ou la petite fille de plus la prévalence de candidose œsophagienne augmente avec l'âge, un âge supérieur à 65 ans (Géniaux, 1996 ; Behrens *et al.*, 2014).

- **Les maladies**

Toute maladie affaiblissant les défenses immunitaires de l'hôte est susceptible d'induire le déclenchement d'une candidose. L'immunodéficience peut être due à la maladie du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), ou cancer (Redding *et al.*, 1999).

- **Les cancers**

Plusieurs facteurs favorisent l'apparition d'infections opportunistes au cours d'un cancer (Redding *et al.*, 1999).

Les muqueuses buccales sont une porte d'entrée principale pour agents pathogènes opportunistes, y compris l'espèce *Candida*. C'est le cas dans les cavités non stériles telles que la bouches, la gorge, les bronches, le tube digestif, les organes génitaux. Le cancer des cellules du sang (leucémie) entraîne une insuffisance de l'immunité cellulaire ou hormonale favorisant le développement de maladies opportunistes telle que la candidose, en plus les progrès accomplis dans le traitement des hémopathies malignes et des cancers sont liés à l'utilisation de traitements de plus intensifs (radiothérapie, chimiothérapie, greffes), affaiblissant les défenses de l'hôte et favorisant le développement de maladies opportunistes telles que la candidose (Redding *et al.*, 1999 ; Ship *et al.*, 2007).

En se référant aux mêmes auteurs cités ci-dessus, la candidose orale par exemple est une infection significative chez les patients traités par chimiothérapie et radiothérapie pour le cancer.

- **Le SIDA**

Avant la trithérapie, l'incidence des candidoses dues au genre *Candida*, causant principalement des infections orales, a augmenté de façon exponentielle dans les hôpitaux, et notamment chez les patients immunodéprimés atteints du virus du SIDA. Dans les années 1980, le développement de nouveaux traitements antifongiques tels que le fluconazole n'a pas permis de stopper ce phénomène, mais au contraire a favorisé l'émergence de nouvelles souches résistants (Ruhnke *et al.*, 1994).

Selon de Repentigny *et al.* (2004), environ 90% des patients infectés par le VIH développeront une candidose oro-pharyngées durant leur maladie et qu'au moins 75% d'entre eux souffrent d'une candidose œsophagienne associée.

- **Diabète**

Les sucres contribuent à la prolifération des levures, ce qui peut expliquer la prévalence accrue d'infections à levures chez les patients atteints de diabète sucré, les femmes atteintes de diabète sont prédisposées au développement d'infections des voies urinaires (IVU) (Pappas, 2006).

#### **b. Les facteurs extrinsèques**

- **Les antibiotiques**

La colonisation du tractus gastro-intestinal par des espèces de candida est présente chez environ 30% des adultes normaux. Cependant, chez les patients recevant des antibiotiques, les taux de colonisation avoisinent les 100%(Tammy et Jack, 2001).

Comme il existe peu de preuves que les antibiotiques systémiques influent directement sur la prolifération ou la virulence des espèces de candida, il est probable que les antibiotiques contribuent à la colonisation les espèces de candida en supprimant la flore bactérienne endogène, principalement dans l'intestin et les tractus génitales inférieures et éventuellement dans les zones superficielles voisines le méat urétral (Fischer *et al.*, 1982).

- **Les traitements immunosuppresseurs**

Plusieurs études ont confirmé que la corticothérapie, les différents médicaments immunosuppresseurs ainsi que la chimiothérapie et radiothérapie provoquent une baisse de l'immunité ainsi que la sécheresse de la muqueuse, qui représentent les conditions favorables au développement des levures opportunistes tel que le genre Candida et spécialement *C.albicans* (Chambers *et al.*, 2006 ; Golecka *et al.*, 2006 ; Pereira *et al.*, 2014).

### **3. Les pathologies associées aux candidoses**

Les candidoses provoquent des infections superficielles au niveau du revêtement cutané (peau), des muqueuses (digestives et urogénitales) ainsi que des atteintes profondes touchant de nombreux organes, notamment le foie, les reins (Ripert, 2013).

#### **3.1.Les candidoses superficielles**

Les candidoses superficielles (figure 5), qui sont de loin les plus fréquentes, peuvent affecter la peau, les phanères ou les muqueuses (oro-pharyngée, vaginales...). Elles sont habituellement bénignes, même si elles présentent parfois un caractère récidivant (Pihet et Marot, 2013).

**a. Candidoses cutanées**

Les lésions habituellement érythémateuses partent du fond des plis, plus ou moins fissurés, suintants et recouverts d'un enduit blanchâtre. On distingue classiquement :

- **L'intertrigo des grands plis**

Il touche les plis axillaires, inguinaux, sous mammaires, fessiers. La lésion s'étend de part et d'autre du pli avec un contour irrégulier mal limité avec parfois une bordure en forme de collerette plus ou moins squameuse au-delà de laquelle on peut observer des petits îlots périphériques émiétés (Yapo *et al.*, 2016).

- **Onyxis et périonyxis**

Les onychomycoses à *Candida sp* sont beaucoup plus fréquentes aux mains qu'aux pieds. Les femmes sont plus fréquemment atteintes car plus souvent exposées aux principaux facteurs de risque locaux que sont les contacts prolongés et répétés avec l'eau et les produit d'entretien, le port de gants de protection, les microtraumatismes et les abus de soins de manucure. La contamination résulte le plus souvent d'une auto-inoculation à partir d'un foyer digestif ou génital et *C.albicans* est l'espèce la plus souvent incriminée (Torres-Rodríguez et López-Jodra, 2000 ; Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie, 2014 )

Classiquement, et selon Ameen *et al.* (2014), l'onychomycose à *Candida* peut se présenter sous plusieurs formes :

- ✓ Paronychie chronique avec dystrophie secondaire des ongles
- ✓ Infection distale des ongles
- ✓ Candidose cutanéomuqueuse chronique
- ✓ Candidose secondaire

**b. Candidose digestive**

Forme essentiellement due à *C.albicans* qui vit en saprobiose dans tout le tractus, mais le mauvais état général des hôtes et leur dépression immunitaire révèle la pathogénicité (Euzéby, 2008).

Les causes de l'apparition d'une mycose digestive pathogène sont un déséquilibre de la flore intestinale ou plus fréquemment, une défaillance du système immunitaire. La mycose digestive est particulièrement fréquente dans les stades avancés de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), dans ce cadre, les localisations les plus fréquentes sont la bouche, ou l'œsophage. Les symptômes de la mycose digestive sont des dysphagies, des troubles de l'alimentation, des douleurs à la déglutition ou parfois des troubles du transit (Horde, 2017).

- **Candidose buccale**

*Candida* est la cause la plus fréquente des infections fongiques orales. Ce champignon est présent dans la bouche de 30 à 60 % des adultes en bonne santé et, par conséquent, son isolement ne signifie pas nécessairement un processus pathologique. Toutefois, le nombre de véritables infections à *Candida* est à la hausse, pour des raisons iatrogènes (Runge *et al.*, 2009).

La candidose buccale classique est parfois qualifiée de pseudo-membraneuse ou appelée « muguet » à cause des plaques blanches présentes sur la muqueuse buccale, le palais, la langue ou l'oropharynx ; ces plaques s'enlèvent facilement, laissant un tissu mis à nu légèrement hémorragique (Taihi *et al.*, 2012).

La candidose hyperplasique se présente également sous forme de plaques blanches, mais qui ne peuvent pas être enlevées facilement (Runge *et al.*, 2009).

La candidose atrophique chronique est la forme la plus commune de la candidose orale et se retrouve chez 60% des patients porteurs de prothèse dentaire. Il se présente comme un épaissement érythémateux de la muqueuse sous la prothèse dentaire (Runge *et al.*, 2009).

- **La candidose gastro-intestinale**

Elles sont souvent liées à la prise prolongée d'antibiotique qui détruisent la flore bactérienne intestinale et permettent à *C. albicans* de proliférer ; ces candidoses ont un aspect de pseudomembranes blanches adhérentes à la muqueuse inflammatoire, parfois ulcérée. Semblables au muguet buccal. Elles s'observent sur différents segments du tube digestif (œsophage, estomac, intestin), la levure est souvent décelable dans les fèces. Cette atteinte est associée en général à un déficit immunitaire sévère (SIDA, agents immunosuppresseurs) (Flattery *et al.*, 1996).

- c. **Candidose génitale**

- **Chez la femme**

La candidose vulvo-vaginales (CVV) est une infection mycosique très répandue qui affecte une large proportion de femme en âge de procréer. La CVV récidivante constitue un problème majeur qui affecte le confort de certaines femmes (Amouri *et al.*, 2010).

Les espèces les plus fréquemment impliquées sont *C.albicans* (70%), *C.glabrata* (19%) , *C .parapsilosis* (5%) ,*C .krusei* (2%) , *C .tropicalis* (1,5%),*C .lusitaniae* (0,2%) (Richter *et al.*, 2005).

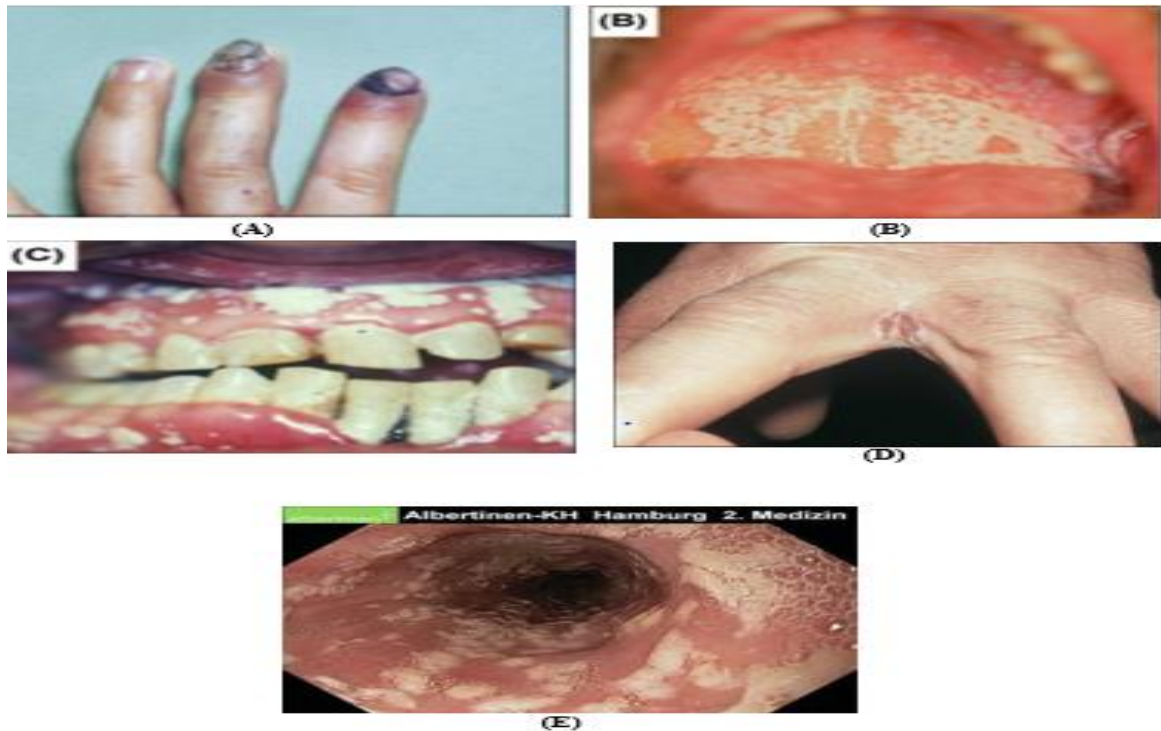
Selon les résultats de l'étude d'Anane *et al.* (2010), *Candida albicans* a été l'espèce la plus fréquemment isolée (81,16 %) suivi de *C. glabrata* (12,2 %). La symptomatologie était faite essentiellement par des leucorrhées (89,70 %), du prurit vulvaire (77,28 %) et de la dyspareunie (49,12 %). La tranche d'âge la plus touchée était celle comprise entre 20 et 39 ans.

On estime que 75% des femmes connaîtront un épisode au moins de candidose vaginale durant leur vie, 40% à 45% plusieurs épisodes.

Le développement du (CVV) a été lié à plusieurs facteurs y compris l'utilisation récente d'antibiotiques et de contraceptifs oraux, la présence de diabète sucré, habitudes alimentaires, gastro-intestinales colonisation par l'organisme, sanitaire et vêtement de protection pratiques, contagiosité sexuelle (Anane *et al.*, 2010 ; Mazza,2011).

- **Chez l'homme**

Les levures du genre *Candida* sont transmissibles aux hommes au cours des rapports sexuels et entraînent une balanite, qui peut dès lors aussi être considérée comme les maladies sexuellement transmissibles (MST) (Rodin et Kolator, 1976). On observe surtout cette infection du gland chez les hommes non circoncis. La maladie débute par des vésicules sur le pénis, qui se développent en plaques érythémateuses et sont accompagnées d'un prurit important et de fortes sensations de brûlure (Willey *et al.*, 2013).



**Figure 5.** Candidoses superficielles, (A) Onyxis. (B) et (C) Orale. (D) Intertrigo des petits plis. (E) Œsophagienne.

(Tsui, 2016)

### 3.2. Candidoses profondes

Les candidoses profondes, encore appelées systémiques, recouvrent les septicémies à *Candida* et les affections viscérales profondes dont le point de départ est le plus souvent une dissémination hématogène. Rares il y a quelques années, elles surviennent surtout chez des patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs, dans les services de réanimation médicale ainsi que dans les unités d'oncohématologie. A ce titre, elles occupent désormais le 4ème rang des infections nosocomiales en Europe et aux Etats-Unis (Munoz *et al.*, 2004). Les septicémies à *C. albicans* peuvent avoir deux origines (Drouhet *et al.*, 1979).

- Une origine endogène à partir d'une infection préexistante au niveau digestif (le muguet), la dissémination se fait alors par le système porte Pour atteindre des organes plus profonds.
- Une origine exogène, où les filaments mycéliens qui envahissent le tube digestif peuvent traverser la muqueuse intestinale, les diverses couches de la paroi et pénétrer dans les capillaires. *C. albicans* peut se disséminer dans tous les organes en particulier les reins et les tissus profonds en donnant des abcès.

### **a. Les Candidémies**

La Candidémie est l'infection du sang qui présente le taux de mortalité le plus élevé, plusieurs études font état de plus de 50% de décès (Anaissie *et al.*, 1989). Les deux principaux facteurs de risques sont l'immunosuppression (habituellement comme conséquence d'une chimiothérapie pour le traitement d'une hémopathie maligne ou d'une tumeur solide et le traitement dans une unité de soins intensifs (Jagarlamudi *et al.*, 2000). Selon Verduyn *et al.* (1999), les facteurs de risques secondaires (souvent combinés) sont : Âge, azotémie, cathéters intraveineux, chimiothérapie, barrière muqueuse endommagée, maladie du greffon contre l'hôte, hémodialyse, hyperglycémie, utilisation à long terme d'antibiotiques à large spectre, neutropénie, nutrition parentérale, stéroïdes, chirurgie (multiple, étendue, abdominale). Même si *C.albicans* demeure l'espèce la plus fréquemment impliquée (environ 50%), les espèces non-albicans ne sont pas rares, *C.glabrata* est isolée dans 10% à 16% des cas (Voss *et al.*, 1999), alors que *C.parapsilosis* est responsable de 11% à 21% des Candidémies (Viscoli *et al.*, 1999).

- **Cardiaques**

Les endocardites à champignons représentent moins de 10% de toutes les endocardites. Ces dernières années, on constate néanmoins une augmentation de leur fréquence (Gilleece et Fenelon, 2000).

Les endocardites fongiques se caractérisent par un délai de survenue souvent très tardif (jusqu'à 16 mois) après l'épisode candidémique. Les champignons responsables sont *C.albicans* (28%) (Ellis *et al.*, 2001).

Le taux de mortalité de l'endocardite infectieuse était de 82% dans les années 1960, depuis les années 1990, il a diminué entre 40% et 56% (Rubinstein et Lang, 1995).

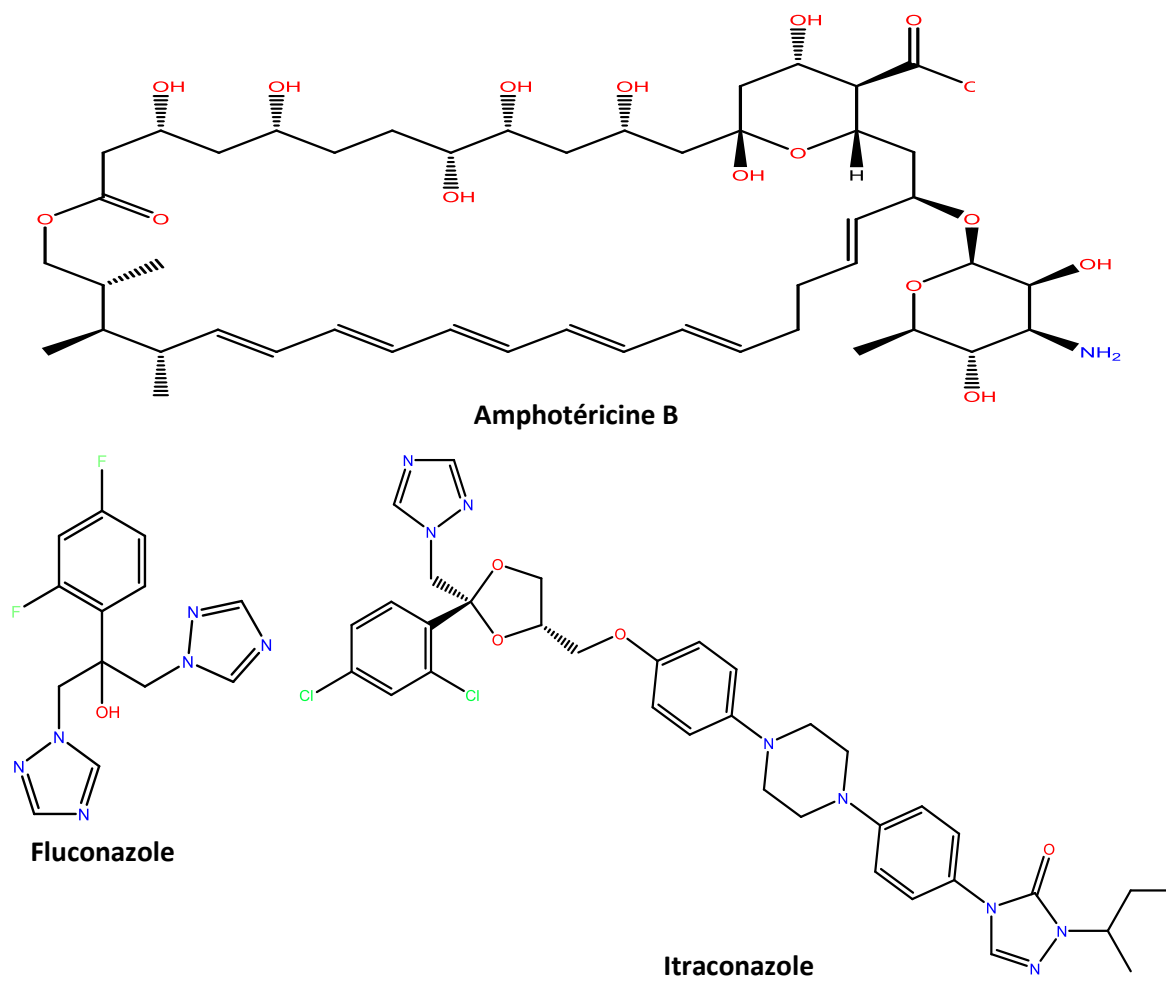
- **Pulmonaires**

Les candidoses pulmonaires sont observées chez les patients dont la cavité buccale est largement colonisée par le *Candida* (infection par inhalation) ou comme conséquence de la dissémination hématogène du champignon (El-Ebiary *et al.*, 1997).

Comme les autres candidoses, les candidoses pulmonaires sont généralement causées par *C.albicans* même si l'on note une hausse des cas causés par des espèces non-*albicans* tel que *C.tropicalis* et *C.kruei* (Wingard *et al.*, 1991).

#### 4. Antifongiques et antibiorésistance

La gestion des infections fongiques est nettement limitée par problèmes de profils d'innocuité, de résistance et d'efficacité des médicaments. Le traitement actuel des mycoses invasives utilise un nombre réduit de médicaments antifongiques, tels que l'amphotéricine B, fluconazole et itraconazole (figure 6).



**Figure 6 .** Molécules antifongiques : Amphotéricine. Fluconazole. Itraconazole (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006). .

Autres nouveaux agents antifongiques, des anciennes et nouvelles familles chimiques, comme le voriconazole, posaconazole, ravuconazole, caspofungine et micafungine, ont été introduits dans le traitement des infections d'origine fongique. Certaines autres molécules comme l'albaconazole et l'anidulafungine entre autres être introduit bientôt pour une utilisation clinique (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006).

Selon Arendrup (2014), La résistance des espèces du genre *Candida* aux antifongiques peut être intrinsèque ou acquise et peut être rencontrée chez le patient exposé au traitement mais aussi celui qui ne prend pas le médicament. Un traitement antifongique préalable confère une pression de sélection et sensibilise notoirement la résistance possible chez les patients qui échouent au traitement, ce qui nécessite des tests de sensibilité.

En se référant à Whaley et al. (2017) les mécanismes de résistance de *C. albicans* aux antifongiques azolés peut être figurer dans plusieurs états :

- ✓ La présence du point de mutation dans le gène *ERG11*
- ✓ Augmentation de l'expression du gène *ERG11*
- ✓ L'aneuploïdie qui peut favoriser l'adaptation génétique à l'exposition aux azoles
- ✓ Les pompes d'efflux à cassette ATP et les principaux transporteurs facilitateurs réduisent l'accumulation intracellulaire d'azoles
- ✓ L'altération des stérols membranaires dû à l'inactivation d'Erg3 est remplacée par d'autres molécules alternatives dans la membrane de levure.

Nous ajouton un autre paramètre important inclus dans le phénomène de la résistance qui sont les biofilms, considérés comme la forme de croissance la plus répandue des cellules *Candida* et un puissant agent causal des résistances aux antifongiques. Pour l'instant, aucun facteur de résistance spécifique n'a été identifié comme seul responsable pour la résistance accrue aux agents antifongiques présentée par les biofilms. Au lieu de cela, la formation de biofilm est un phénomène multifactoriel complexe, qui doit encore être pleinement élucidé et compris. Les différents mécanismes, qui peuvent être responsables de la résistance intrinsèque des espèces de *Candida* comprennent la haute densité de cellules dans le biofilm, les effets de la matrice du biofilm, la présence de cellules persistantes, l'expression des gènes et augmentation des stérols sur la membrane des cellules de biofilm (Silva et al., 2017).

## **II. Produits naturels et bioactivité**

### **1. Plantes médicinales**

Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé les plantes trouvées dans la nature pour traiter et soigner les différentes maladies (Sanago, 2006).

Environ 65- 80% de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (El Hilal *et al.*, 2015).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constitutions des plantes sont utilisées directement comme agent thérapeutique, mais aussi comme matière première pour la synthèse de médicaments ou comme modèle pour les composés pharmacologiquement actifs (Tardivon et Chadouli, 2012).

Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs ou certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes (Salhi *et al.*, 2010).

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires et leurs substances elles utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées comme médicaments, une croyance bien répandue est que toute plante soigne (Salhi *et al.*, 2010).

Selon Croteau (2000), les plantes produisent un assortiment vaste et diversifié de composés organiques, qui sont indispensables à la croissance et au développement du végétal (métabolites primaires) ou autres (métabolites secondaires) ayant un rôle spécifique pour chaque plante.

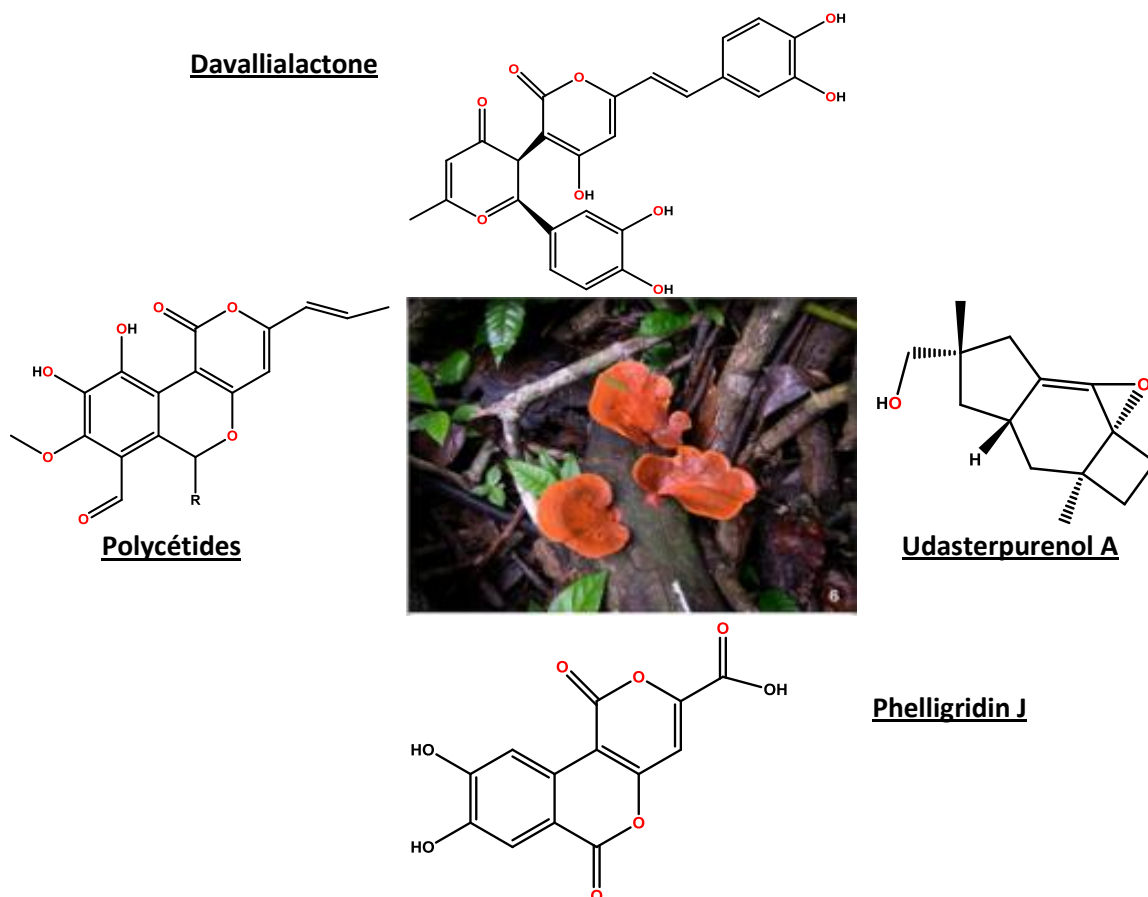
### **2. les basidiomycètes**

Les travaux de Blackwell en 2011 ont montré la biodiversité et la richesse du règne : *Fungi* en espèces appartenant à ce large monde d'être vivants, il s'agit de champignons pas encore bien identifiés (presque 100.000 identifiés et exploités). Les basidiomycètes font partie de ce grand groupe, synthétisent une gamme de molécules bioactives selon Özdal *et al.* (2019) (phénols, polysaccharides, pigments, tocophérols, terpènes et stéroïdes) à haute valeur thérapeutique. Ces molécules ont des activités pharmacologiques telles que : antimicrobien,

antiviral, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tumoral, antiallergique, antvieillessement, antidiabétique, anti-Alzheimer et hypocholestérolémiant (De Silva *et al.*, 2013)

Néanmoins, les champignons sont connus pour leur accumulation des métabolites secondaires (figure 7) antibactériens et antifongiques afin de survivre à l'hostilité de leur environnement naturel. Ainsi, certains médicaments antimicrobiens actuellement sur le marché ont été isolé en tant que métabolites secondaires fongiques. Ceux-ci inclus antibiotiques, nommément pénicillines, céphalosporines et acide griséofulvine, strobilurines et échinocandines (Sum *et al.*, 2019).

Cependant, le même auteur (Sum *et al.*, 2019) signale que ces champignons sont moins étudiés de manière intensive malgré le fait qu'elles contiennent de nouveaux composés d'origines biogénétiques différentes ayant des activités antimicrobiennes potentielles.



**Figure 7.** Métabolites secondaires produits par les basidiomycètes (Photo de *Pycnoporus sp* par Blackwell, 2011 ; De Silva *et al.*, 2013).

### **3. Métabolisme secondaire**

Les plantes produisent une vaste gamme de composés organiques dont la grande majorité ne semble pas participer directement à la croissance et au développement du végétal (Jain *et al.*, 2019) mais par contre malgré leurs fonctions restent inconnus, ils jouent un rôle important dans la défense contre les prédateurs et les pathogènes ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (Croteau, 2000 ; Judd *et al.*, 2002).

Macheix *et al.* (2005) ; Macheix *et al.* (2006) ont cités plusieurs rôles que jouent les polyphénols par exemple dans la physiologie du végétal ou bien dans ses interactions avec l'environnement, de ce fait ils participent :

- ✓ À la rigidification des parois cellulaires des vaisseaux du bois (la lignine). Cela permet d'une part la conduction de la sève brute à l'intérieur de la plante et d'autre part la formation d'une structure rigide qui participe au port dressé des végétaux ligneux.
- ✓ Au maintien de l'équilibre oxydo-réduction des cellules. Aussi ils sont impliqués dans certaines réactions d'oxydoréduction qui se déroulent soit dans la mitochondrie au cours de la respiration soit dans le chloroplaste pendant la photosynthèse.
- ✓ A l'attraction de certains oiseaux et insectes qui sont sensibles à certaines couleurs produites par des pigments de nature phénolique (anthocyanes, flavonols, pigments bruns).
- ✓ A la protection des végétaux contre le rayonnement solaire parce que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV.
- ✓ Aux interactions entre plantes et microorganismes ainsi que la régulation des gènes de nodulation chez les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* fait intervenir des flavonoïdes.

### **4. Activité biologique des produits naturels**

Jusqu'aujourd'hui les scientifiques s'intéressent aux molécules d'origine naturelle afin de mettre en évidence leurs activités biologiques notamment antimicrobiennes, nous citons dans le tableau 1 quelques groupes de métabolites secondaires avec mode d'action sur les cellules fongiques (*Candida albicans*).

**Tableau 1.** Quelques molécules d'origine naturelle avec pouvoir antifongique.

| Molécule     | Espèce                     | Action sur<br><i>C.albicans</i>                                      | Référence                     |
|--------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| pinosresinol | <i>Sambucus williamsii</i> | Double couche membranaire                                            | Hwang <i>et al.</i> , 2010    |
| carvacrol    | <i>Lavandula multifida</i> | Induction de la mort cellulaire<br>Inhibition de la filamentation    | Zuzarte <i>et al.</i> , 2012  |
| Curcumin     | <i>Curcuma longa</i>       | Inhibe la formation de biofilm<br>Inhibe le contrôle morphogénétique | Ansari <i>et al.</i> , 2013   |
| Berberine    | /                          | Dysfonctionnement de la mitochondrie                                 | Dhamgaye <i>et al.</i> , 2014 |
| udalactarane | <i>Phlebia uda</i>         | Action antifongique (sur <i>Fusarium</i> )                           | De silva <i>et al.</i> , 2013 |

## 5. Espèces sélectionnées pour l'étude

### 5.1. *Punica granatum*

Le grenadier (figure 8) est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3cm de diamètre. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace (Benoit, 2013),



**Règne :** Plante

**Embranchement :** Spermaphytes

**Famille :** *Punicaceae*

**Genre :** *Punica*

**Espèce :** *Punica granatum* L.

**Appellations locales :** الرمان

**Partie utilisée :**

Graines et écorce.

**Figure 8.** Classification botanique de *Punica granatum* (le grenadier) (Ravindran., 2017).

*Punica granatum* est beaucoup cultivée dans le bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc...etc). De même en Amérique, on le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, et en Bulgarie (Kanoun *et al.*, 2014).

La partie utilisée de la plante est le fruit frais, le jus, l'écorce de fruit ou de l'arbre, les fleurs (Chebaibi *et al.*, 2011).

Il est utilisé comme remède populaire pour les troubles respiratoires, améliorer la digestion ou lutter contre les flatulences, anti-inflammatoire, antiparasite, antifongique, insecticide (Iserin, 2001), antidiarrhéique, apéritif (Baba aissa, 1999), de plus beaucoup d'études précédemment rapportées ont révélé plusieurs activités biologiques telles que les anti-cancérigènes, antimicrobiens, antioxydants et antiviraux (Malik *et al.*, 2005 ; Cassano *et al.*, 2011 ; Turfan *et al.*, 2011).

### **5.2.*Lepidium Sativum***



**Règne :** Plantae

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Famille :** *Brassicaceae*

**Genre :** *lepidium*

**Espèce :** *Lepidium sativum* L

**Appellations locales :** حب الرشاد

**Partie utilisée :** graines.

**Figure 9.** Classification botanique de *Lepidium sativum* (cresson alénois) (Prajapati *et al.*, 2014 ; Ravindran., 2017).

*Lepidium sativum* est une plante herbacée, dressée, de couleur plus ou moins glauque. Sa tige est glabre, finement striée, profusément ramifiée et pousse jusqu'à 50-80 cm d'hauteur (Wadhwa et al, 2012).

### **Dans le monde**

L'origine du cresson alénois est assez floue : Afrique du Nord ou de l'Est, Moyen-Orient, Asie de l'Ouest, mais on pense qu'il pourrait s'agir de l'Ethiopie et des pays avoisinants. Sa domestication s'est probablement faite en Asie occidentale. Il était cultivé dans l'Antiquité en Grèce et en Italie et peut-être aussi en Egypte (Jansen, 2007).

### **En Algérie**

Espèce méditerranéenne commune dans le tell et parfois cultivée (Baba aissa, 1999). Cresson alénois est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement des troubles hyperactifs des voies respiratoires, tels que l'asthme, la bronchite et la toux. Les graines sont considérées comme galactagogue, emménagogue et recommencé dans les domaines suivants : inflammation, bronchite, douleurs musculaires et rhumatismes en plus ils sont considérés comme antidiabétiques, des laxatifs, hypocholestérolémiants, des cicatrisations des fractures, des analgésiques, des coagulants, anti diarrhéique et anticancéreux (Doke et Guha, 2014).

### **5.3. *Atriplex halimus***



**Règne :** Plantae

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Caryophyllales

**Famille :** Chenopodiaceae

**Genre :** *Atriplex*

**Espèce :** *Atriplex halimus*

**Appellations locales :** القطف

**Partie utilisée :** feuilles

**Figure 10.** Classification botanique d'*Atriplex halimus* (Walker et al., 2014).

Est un arbuste halophyte largement répandu réparties dans les régions arides et semi-arides du bassin méditerranéen et de l'est de l'Arabie saoudite, à altitudes inférieures à 900 m. Il pousse sur une variété de sols, de texture fine à grossière, de plus plusieurs études ont montré que cette espèce (*A. halimus*) la capacité de vivre dans des sols à degrés élevés de salinité ce qui permet de les classer dans la catégorie « euhalophyte », ainsi qu'elle est adaptée aux sites ayant des étés avec intensité lumineuse et température très élevées. Depuis qu'il possède le C4voie de carboxylation, la température optimale pour la photosynthèse est relativement élevée, environ 35 ° C (Walker *et al.*, 2014).

L'étude de la composition chimique montre la présence de métabolites secondaires chez *A. halimus*, tels que tanins, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes et résines et elle contient jusqu'à 10% de chlorure de sodium (Benhammou *et al.*, 2009).

*halimus* est utilisé comme laxatif, en cas de douleur à l'estomac, contre les vers intestinaux, pour réguler les excréctions de la vésicule biliaire et traiter les maux de poitrine. Les tribus bédouines du Néguev utilisent la plante pour traiter les douleurs musculaires et les maladies intestinales chez les animaux, nourrir les moutons et les chèvres et parfumer la cuisine. Les feuilles sont comestible mais trop salé pour être mangé seules (El Souda *et al.*, 2015).

### **5.5.*Inonotus hispidus***

*Inonotus hispidus* (*Basidiomycetes*), communément appelé «Sorret el btoum», est un champignon parasite vivant de préférence sur une variété d'arbres à feuilles caduques et se trouve sur l'arbre *Pistacia atlantica* en Algérie (Nasser Ali *et al.*, 1996; Benarous *et al.*, 2013).



**Règne :** *Fungi*

**Famille :** *Hymenochaetaceae*

**Genre :** *Inonotus*

**Espèce :** *Inonotus hispidus*

**Appellations locales :** Sorret Elbtoum, سرّة البطم

**Partie utilisée :** Fruits

**Figure 11.** Le polypore hérissé, *Inonotus hispidus* (Dai, 2010) et sa classification (Végh, 1987 ; Vukojević *et al.*, 2016).

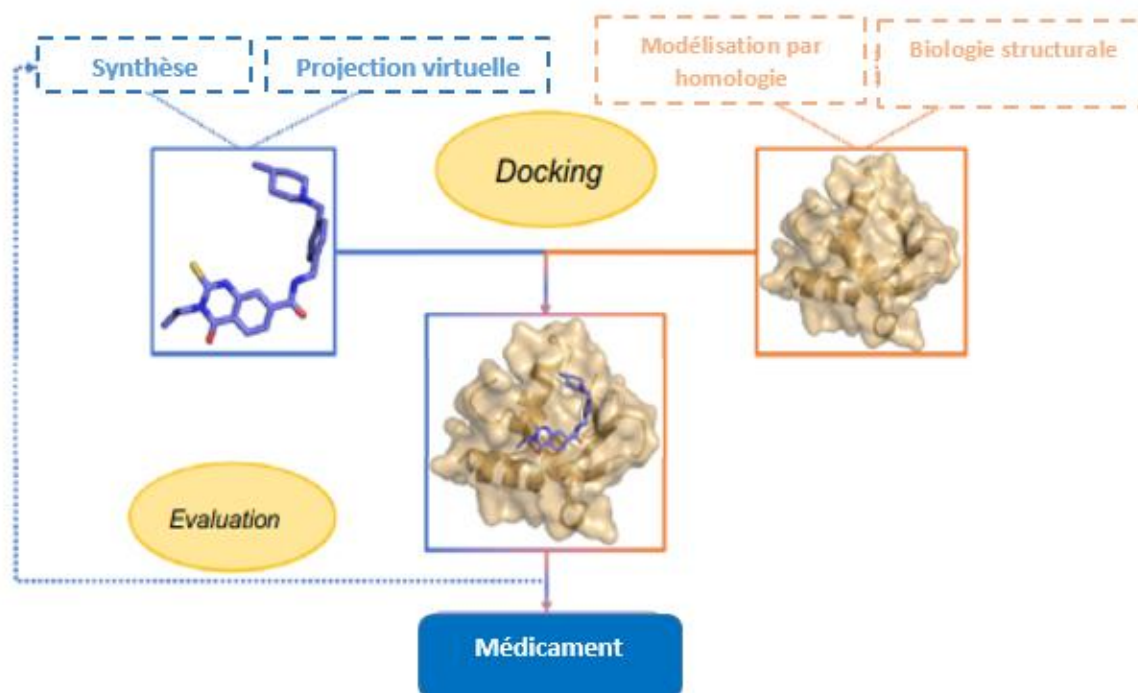
Ce champignon est utilisé dans la médecine folklorique pour le traitement de l'ulcère gastrique (Yousfi *et al.*, 2009) et il est connu de son activité antivirale (Awadh Ali *et al.*, 2003).

### III. Amarrage moléculaire

#### 1.Introduction

De nouvelles techniques bioinformatiques sont devenues des outils de découverte de médicament, il s'agit de l'amarrage moléculaire qui explore le comportement de petites molécules dans le site de liaison d'une protéine cible. Plus les structures protéiques sont déterminées expérimentalement utilisant la cristallographie aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire (RMN) spectroscopie, plus l'amarrage moléculaire est spécifique (Pagadala *et al.*, 2017).

Les expériences sur une seule molécule *in vitro* permettent de caractériser la réponse mécanique de la matière biologique à l'échelle nanométrique. Cependant, ils ne révèlent pas le mécanisme sous-jacents à la fonction mécanique. Celles-ci ne peuvent être facilement étudiées que par les simulations de dynamique moléculaire de modèles structuraux atomiques : «*in silico* » (par analyse informatique).



**Figure 12.** Résumé d’une approche de la conception de médicament à base de la structure (de Ruyck *et al.*, 2016).

De ce fait les expériences sur une seule molécule, dans lesquelles des forces sont utilisées pour explorer la réponse et la fonction des macromolécules, sont devenues un outil puissant complétant et guidant les expériences *in vitro* (figure 12) sur une seule molécule (Stomayor *et al.*, 2007).

## 2. Théorie du docking

Le but de l’amarrage moléculaire selon Meng *et al.* en 2011 qui a donné un simple aperçu sur la théorie de docking, est de donner une prédiction sur le complexe ligand- structure de récepteur en utilisant des méthodes de calcul. L’amarrage peut être réalisé à travers deux étapes interdépendantes :

- D’abord par échantillonnage des conformations du ligand dans le site actif de la protéine
- Puis classer ces conformations via une fonction de notation.

Idéalement, l’échantillonnage des algorithmes devraient être capables de reproduire le mode de liaison expérimental et la notation de la fonction doit également la classer au premier rang parmi toutes les conformations générées.

Les programmes exécutent ces tâches à travers un processus cyclique, dans lequel la conformation du ligand est évaluée par des fonctions de notation spécifiques. Ce processus est récursif jusqu'à ce qu'il converge vers une solution d'énergie minimale (Ferreira *et al.*, 2015).

### **3. Notion de dynamique moléculaire DM**

La flexibilité du site de liaison cible est un aspect essentiel mais souvent négligé dans l'amarrage moléculaire. Les enzymes et les récepteurs peuvent subir des changements conformationnels au cours du processus de reconnaissance, certaines protéines entreprennent des changements conformationnels importants, qui peut impliquer des éléments de structure secondaire et tertiaire. Ces problèmes de flexibilité peuvent être traités par l'utilisation de techniques telles que la dynamique moléculaire.

La dynamique moléculaire applique les équations de mouvement de Newton, décrites dans la mécanique classique, à spécifier la position et la vitesse de chaque atome dans le système étudié. En conséquence, la trajectoire et l'évolution temporelle d'un complexe ligand-récepteur peut être examinée. Initialement, la configuration est attribuée aux atomes dans le but de reproduire la température et la pression de vrai système. A partir du calcul des forces agissant sur chaque particule, il est possible de déterminer la position et la vitesse de chacun de ces atomes à un moment postérieur. Ces calculs sont répétés effectuées jusqu'à ce que les trajectoires moléculaires soient intégrées pour un intervalle de temps donné (Ferreira *et al.*, 2015).

### **4. Programmes utilisés**

De nos jours, comme une variété de programmes d'accueil sont disponibles pour la communauté scientifique, une compréhension globale des avantages et limites de chaque programme d'amarrage a fondamentalement mené à des résultats plus raisonnables. Au cours des deux dernières décennies, plus de 60 stations d'accueil différentes des outils et des programmes ont été élaborés à la fois pour l'utilisation commerciale et académique (Pagadala *et al.*, 2017).

Nous citons par exemple l'étude de Wang *et al* (2016) qui analyse les performances de dix programmes de docking, dont cinq programmes commerciaux (LigandFit, Glide, GOLD, MOE Dock et Surflex-Dock) et cinq programmes académiques (AutoDock, AutoDock Vina,

LeDock, rDock et UCSF DOCK) en se basant sur un vaste ensemble de données de 2002 complexes protéine-ligand à partir de PDBbind (version 2014).

Le but a été systématiquement évalué en examinant les Précisions de la prévision de la disposition de liaison (puissance d'échantillonnage) et de l'estimation de l'affinité de liaison (notation puissance).

Les résultats ont montré que GOLD et Le Dock avaient la meilleure puissance d'échantillonnage et AutoDock Vina avait la meilleure puissance de notation.

De ce fait nous avons choisi le programme AutoDock Vina comme un programme de docking dans cette étude.

#### **4.1.Etapes de de docking**

L'étude des forces de liaison protéine-ligand nécessite le passage par plusieurs étapes pour arriver à un modèle plus conforme de complexité moléculaire (Rauf *et al.*, 2015 légèrement modifié)

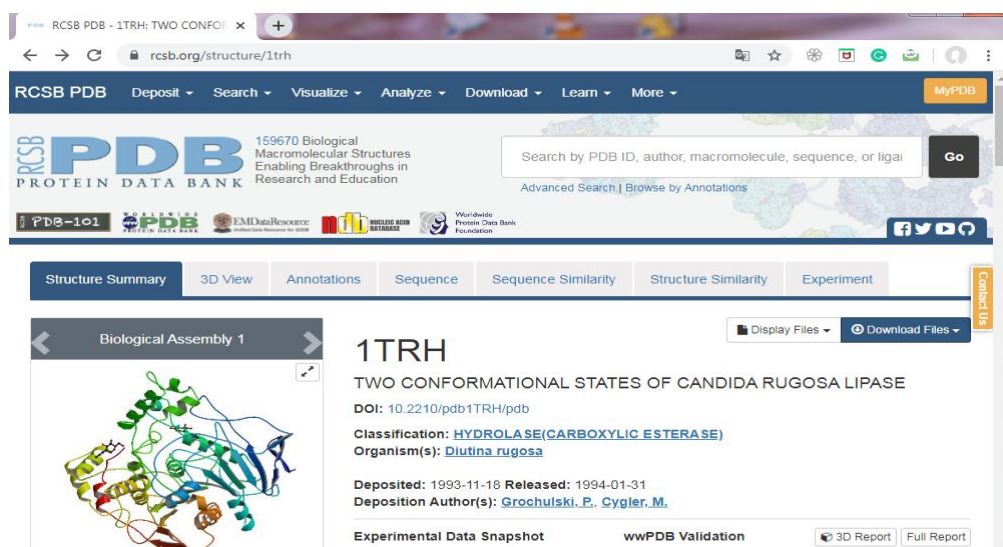
➤ Récupération des fichiers de protéines requis dans les principales bases de données

Cette étape consiste à télécharger la protéine cible à partir de la base de donnée PDB (protein data bank)(figure 13), puis le choix se fait sur l'une des deux chînes protéiques A ou B après élimination de tout type d'hétéroatomes à l'aide du logiciel Discovery Studio Visualizer 4.0.

➤ Récupération de molécules de ligand à partir de différentes bases de données de ligands

On peut utiliser les banques de données comme Drug bank ou Pubchem pour sélectionner les molécules de ligand / médicament souhaitées ou bien la structure du ligand peut être dessiné à l'aide de logiciels disponibles comme Chemdraw. Cependant, il sera plus pratique de télécharger le fichier de la banque de données.

Le téléchargement de fichier doit être en pdb parce que le logiciel Autodock ne peut reconnaître que les fichiers au format pdb.



**Figure 13.** Capture d'écran du site PDB.

➤ Préparation des formats PDBQT pour le ligand et la protéine

Les formats Pdbqt de la protéine et du ligand sont préparés à l'aide du logiciel Autodock tools. À partir de ces deux fichiers on peut générer les paramètres de recherche qui sont par la suite édités et ajustés tels que le nombre de conformations générés, la précision de recherche et bien d'autres.

➤ Étude d'amarrage à l'aide de d'AutoDock Vina

Le programme procède à la recherche du complexe ligand-cible le plus favorable par le déplacement et le changement de la conformation du ligand et à chaque configuration, l'énergie d'interaction est évaluée en mécanique moléculaire avec un champ de force spécifique.

➤ Analyse des résultats



***Matériel et  
méthodes***

## I. Matériel biologique

### 1. Plantes sélectionnées et champignon

Dans la région de Laghouat, plusieurs recettes et mélanges de plantes sont utilisées pour le traitement de symptômes dus aux infections causées par le germe pathogène *Candida sp.*

Nous avons sélectionné ces espèces en se basant sur plusieurs critères à savoir :

- Le traitement de candidoses en médecine traditionnelle
- La disponibilité du produit naturel et sa richesse en composés bioactifs
- La découverte de nouvelles molécules et composés ayant une activité antifongique par le ciblage d'un groupe de métabolites secondaire.

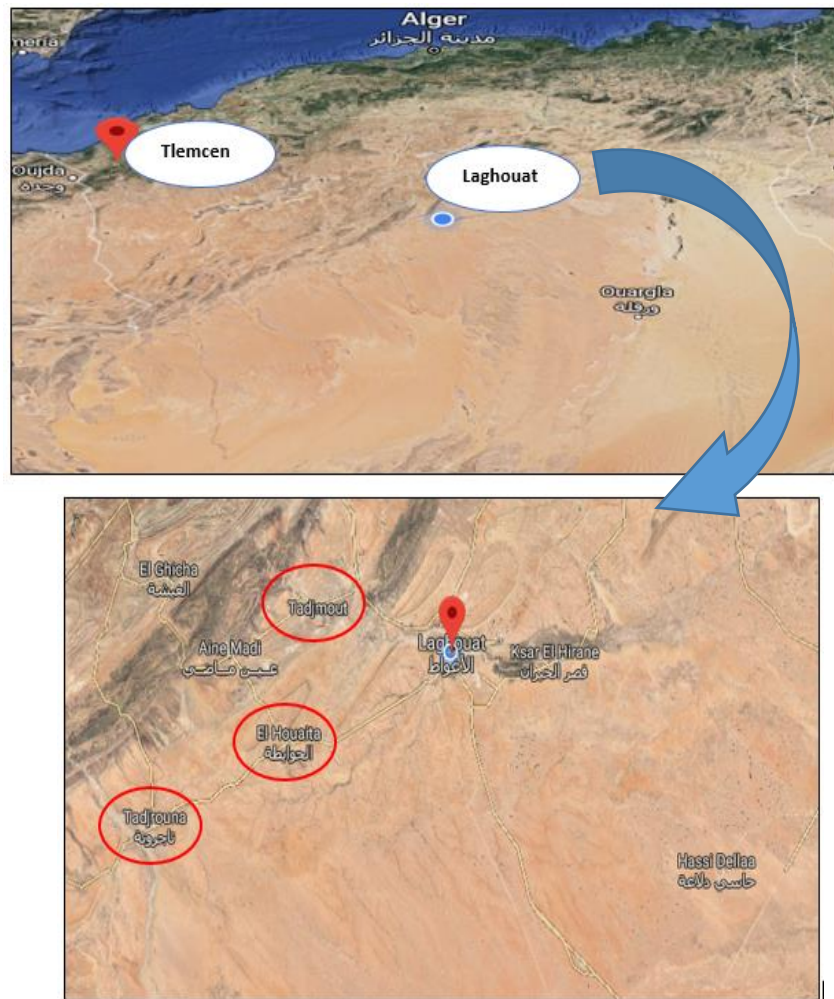
La récolte du matériel biologique étudié a été faite durant la période d'octobre 2016 jusqu'au juin 2018, dans plusieurs régions de la wilaya de Laghouat (*Tadjemout, Tadjrouna et El-houaita*) et la wilaya de Tlemcen (figure 14). Le tableau 2 regroupe les plantes et le champignon, les régions de collecte ainsi que leurs coordonnées géographiques.

Les espèces collectées ont été identifiées par l'équipe de recherche du laboratoire de recherche des sciences fondamentales –Université Amar Telidji –Laghouat.

Après la collecte des échantillons, le matériel végétal, si nécessaire, est séché dans un endroit sec, aéré et à l'abri de la lumière, à la fin de cette opération, la partie ciblée a subi un broyage en poudre fine qui représente le produit végétal (PV) et sera conservé jusqu'à l'utilisation. Concernant le fruit de *P.granatum*, nous avons utilisé le jus frais.

**Tableau 2.** Espèces végétales et champignon étudiés avec régions de collecte (Web1).

| Matériel biologique      | Partie utilisée      | Région de collecte | Altitude | Longitude        | Latitude      |
|--------------------------|----------------------|--------------------|----------|------------------|---------------|
| <i>Lepidium sativum</i>  | Graines              | Tadjemout          |          |                  |               |
| <i>Atriplex halimus</i>  | feuilles             |                    | 898m     | 2° 31' 24" E     | 33° 52' 47" N |
| <i>Punica granatum</i>   | Fruit (écorce , jus) | Tlemcen            | 715m     | 1° 19' 12" Ouest | 34° 53' 24" N |
| <i>Inonotus hispidus</i> | Entier               | El houaita         | 914m     | 2°26' 45" E      | 33° 38' 43" N |



**Figure 14.** Sites géographiques des zones de collectes du matériel biologique (web1).

## 2. Souches fongiques

Des isolats au niveau de l'institut Pasteur d'Alger ainsi qu'une souche de référence conservée au laboratoire vétérinaire régional de Laghouat ont été testées dans cette étude, le tableau ci-dessous regroupe les quatre germes pathogènes.

**Tableau 3.** Références des souches fongiques testées.

| Souche                  | référence  | Origine |
|-------------------------|------------|---------|
| <i>Candida albicans</i> | M2         | IPA     |
| <i>Candida albicans</i> | M3         | IPA     |
| <i>Candida albicans</i> | IPA 200    | IPA     |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 | LVRL    |

IPA : institut Pasteur d'Alger, LVRL : laboratoire vétérinaire régionale de Laghouat.

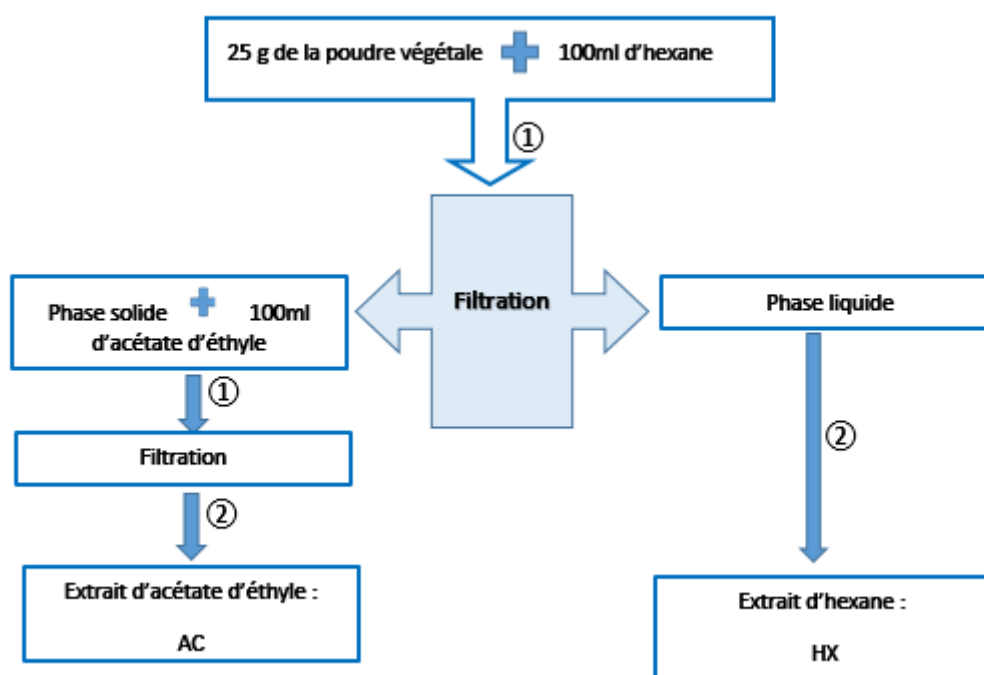
## II. Méthodes

### 1. Extraction des produits naturels

Les produits naturels ont été obtenus selon les protocoles d'extraction à froid solide-liquide ou liquide-liquide.

#### a. Extraction des métabolites par solvants organiques

Dans le but d'avoir deux types d'extraits (figure 15), nous avons employé deux solvants organiques de polarité différente : l'hexane et l'acétate d'éthyle, avec une technique simple qui est la macération à froid pour cela nous avons appliqué le protocole détaillé dans la figure 15. Premièrement 25g de la poudre végétale de chaque espèce est mis dans 100ml de l'hexane, laissé à l'ombre et à température ambiante pendant 24h puis filtré, la phase liquide subit une évaporation sous vide à 45°C pour séparer le solvant du résidu sec, ce dernier (HX) est conservé à la fin à 4°C jusqu'à utilisation. La deuxième extraction sert à mettre la matrice végétale résultante de la première extraction dans un autre solvant : acétate d'éthyle (100ml), et nous avons procédé les mêmes étapes décrites ci-dessus pour avoir à la fin l'extrait AC.



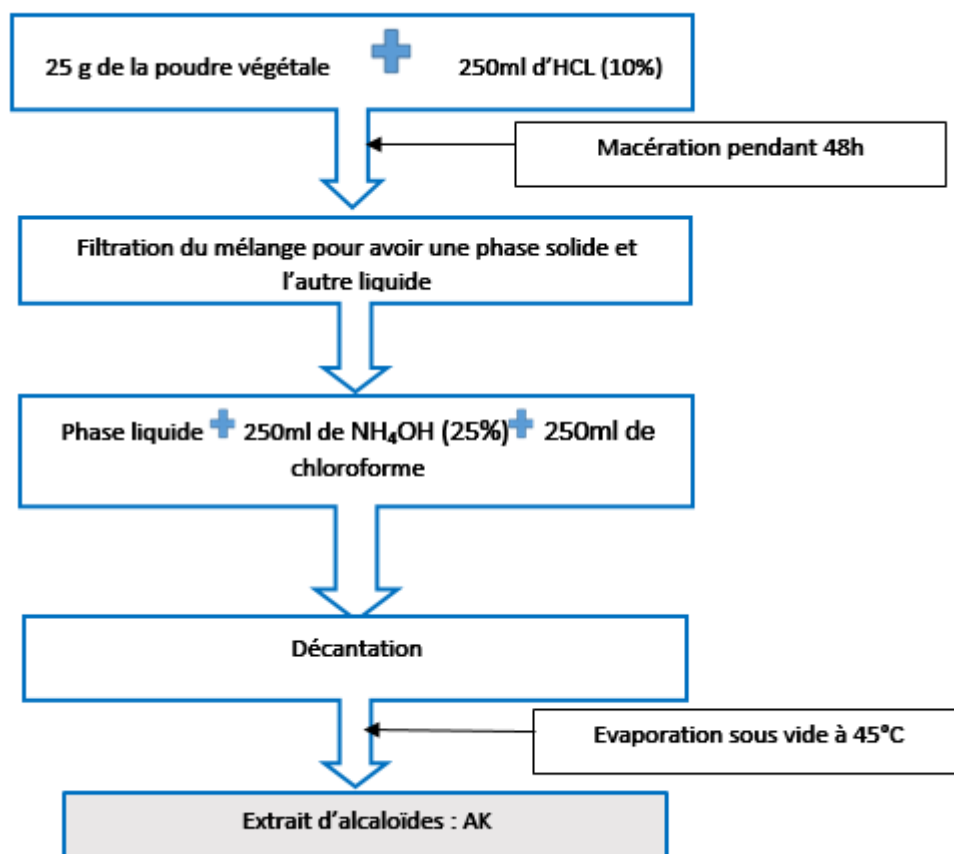
① : Macération à température ambiante et à l'ombre, pendant 24h.

② : Evaporation à 45°C sous pression réduite.

**Figure 15.** Procédure d'extraction d'AC et HX.

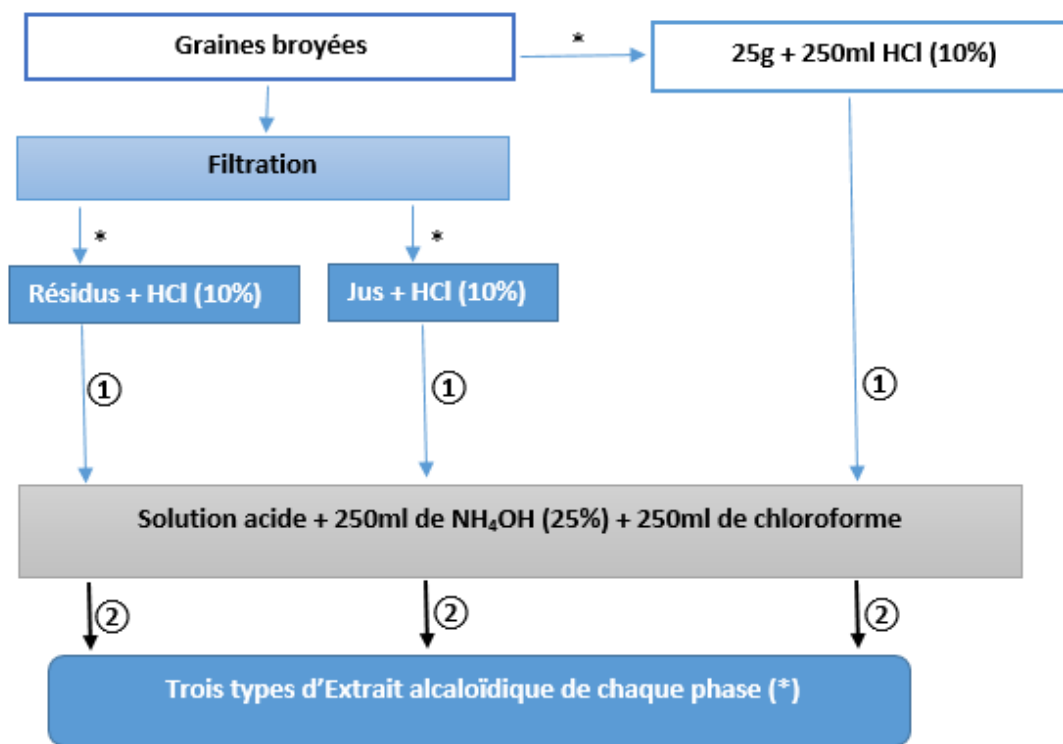
### b. Extraction des alcaloïdes

L'extrait était obtenu en procédant pour la première fois le protocole détaillé dans la figure 16. Dans cette étude, une quantité de 25g de la poudre végétale est ajoutée à 250ml d'une solution acide (HCl à 10%), et laissée macérée pendant 48h à température ambiante puis filtrée en ajoutant 250ml d'une solution basique ( $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25% ) au mélange, à la fin un solvant organique est utilisé pour extraire les alcaloïdes à partir de la phase aqueuse, et à l'aide d'une ampoule à décantation, ce mélange va se séparer en deux phases : une phase aqueuse acido-basique et l'autre organique, cette dernière va subir une évaporation sous vide pour avoir à la fin un extrait d'alcaloïdes (AK).



**Figure 16.** Procédure d'extraction des alcaloïdes (AK) à partir de la matière végétale solide.

En ce qui concerne le jus des graines de *P.granatum*, nous avons eu trois types d'extraits, tout dépend de la nature de la première phase employée. La figure 17, illustre la méthode suivie dans cette partie d'extraction des alcaloïdes à partir du fruit de grenadier.



① : Macération à température ambiante et à l'ombre, pendant 24h.

② : Evaporation à 45°C sous pression réduite

**Figure 17.** Procédure d'extraction des alcaloïdes à partir du jus de fruits de *P.granatum*

## **2. Etude de l'activité antifongique des extraits naturels sur *Candida albicans***

### **a. Tests confirmatifs**

Pour la certitude de la pureté des souches à cause de la sensibilité des tests de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à un ensemble de tests de confirmation de la forme (macroscopique et microscopique) et des critères biochimiques des cellules microbiennes obtenues à partir de laboratoires spécialisés (Institut Pasteur d'Alger, Laboratoire Vétérinaire Régionale de Laghouat).

#### ➤ Isolement sur milieu solide

Cette technique de routine dans la microbiologie permet l'étude morphologique des colonies ainsi que les isoler sous forme dispersée. La culture a été faite dans une gélose Sabouraud Chloramphénicol.

➤ Coloration de Gram et aspect microscopique

Les cellules fongiques apparaissent sous microscope optique et à grossissement 40x individuelles avec coloration Gram positive et d'une forme ovale (Harley et Prescott, 2002 ; Boussebouda, 2005).

➤ Galerie API Candida

Elle se présente sous la forme de Kits multi-tests (tableau 4), intégrés en microplaques, chaque cupule contient un milieu de culture déshydraté qui correspond à l'identification d'un caractère métabolique. A l'aide du manuel d'usage de la galerie API (Biomérieux), nous avons réalisé le test résumé dans les étapes ci-dessous.

Le test nécessite une culture jeune des microorganismes en milieu liquide, après ouverture de la plaque API dans une zone stérile, quelques gouttes d'eau distillée stériles ont été mises pour créer une atmosphère humide.

La deuxième étape sert à introduire l'inoculum dans les cupules à l'aide d'une pipette Pasteur stérile suivant les recommandations d'usage de la galerie, puis incubation à 30°C pendant 24 à 48h.

Finalement la lecture des résultats se fait à l'aide d'un tableau de lecture qui permet à la fin de donner un code d'identification de la souche en comparant avec la référence.

**Tableau 4.** Tests biochimiques d'identification des levures (Biomérieux, 2016).

| Test (kit)  | Composant                               | Caractère biochimique recherché |
|-------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
| <u>GLU</u>  | D-glucose                               | Dégradation des sucres          |
| <u>GAL</u>  | D-galactose                             |                                 |
| <u>SAC</u>  | D-saccharose                            |                                 |
| <u>TRE</u>  | D-tréhalose                             |                                 |
| <u>RAF</u>  | D-raffinose                             |                                 |
| <u>βMAL</u> | 4-nitrophényl-βD-maltopyranoside        | β MALtosidase                   |
| <u>αAMY</u> | 2-chloro-4-nitrophényl-αD maltotrioside | α AMYlase                       |
| <u>βXYL</u> | 4-nitrophényl-βD-xylopyranoside         | β XYLosidase                    |
| <u>βGUR</u> | 4-nitrophényl-βD-glucuronide            | β GURonidase                    |
| <u>URE</u>  | Urée                                    | UREase                          |

**b. Test du pouvoir antifongique des extraits par la méthode de microdillution**

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à l'aide de microplaque stérile et un révélateur de cellules vivantes : l'iodonitrotetrazolium (INT). En se référant aux méthodes *in vitro* de l'évaluation de l'activité antimicrobienne (Ferriera *et al.*, 2013 ; Gwee *et al.*, 2014 ; Balouiri *et al.*, 2016) ; Nous avons procédé les étapes suivantes :

- La préparation des extraits

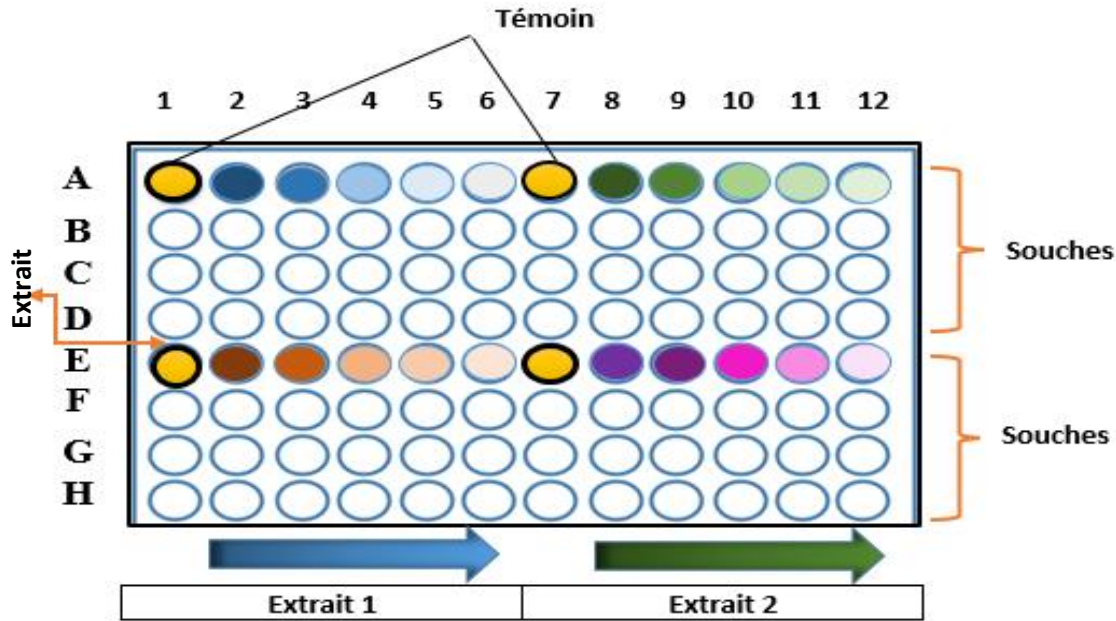
Les extraits naturels ont été premièrement dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO à 10%), pour avoir des concentrations dans les puits de la microplaque allant de 0,125 mg/ml à 4 mg/ml.

- La pré-culture

Des souches de *Candida albicans* (ATCC 10123, Mg33, Mg54, M92) ont été cultivées dans un milieu solide (gélose Sabouraud) pendant 48h et à 30°C avant le test, à partir de cette culture une quantité de cellules fongiques était mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm pour avoir une transmittance de 90% qui correspond à une concentration cellulaire de 0,5 à  $2,5 \times 10^3$  UF/ml.

- Le test

Des microplaques stériles de 96 puits destinées pour les expérimentation en microbiologie ont été utilisé pour ce test (figure 18), un volume de 100µl de milieu liquide GYP (bouillon de Glucose Yeast Peptone) est versé dans les puits, puis 100µl de la solution d'extrait est ajouté au premier puit pour procéder des dilutions successives du premier puit au dernier d'un ordre de 1 : 2. Finalement, un volume de 100µl de l'inoculum est ajouté et la plaque est incubée à 30°C pendant 48h. Un puit de chaque souche contenant que du DMSO 10% et l'inoculum représente le contrôle positif. Le fluconazole (FLU 50mg gélules) est un antifongique commercialisé pour le traitement des candidoses était testé dans le but d'évaluer la sensibilité des souches microbiennes.



**Figure 18.** Application du test de CMI en microplaque.

- La lecture

Les microplaques incubées à 30°C et pendant 24 à 48h vont subir un test de cellules vivantes dans chaque puit, à l'aide du réactif INT, en ajoutant 40 µl de ce dernier avec concentration de 0,2mg/ml.

La révélation de cellules vivantes se fait par le virage de couleur des puits du jaune au rouge ou pourpre après 5 à 30min de réaction. La CMI est considérée comme la celle ajoutée au premier puit n'ayant présenté aucune forme de croissance microbienne.

### c. Détermination du pouvoir fongicide (CMF) des extraits

Après la lecture des résultats du test de la concentration minimale inhibitrice, un test complémentaire des puits considérés comme CMI, repiqués etensemés en surface sur un milieu solide (gélose sabouraud), puis incubation à 30°C pendant 48h, les boîtes ne montrant aucune croissance microbienne sous forme de colonies, contiennent une concentration minimale fongicide (CMF).

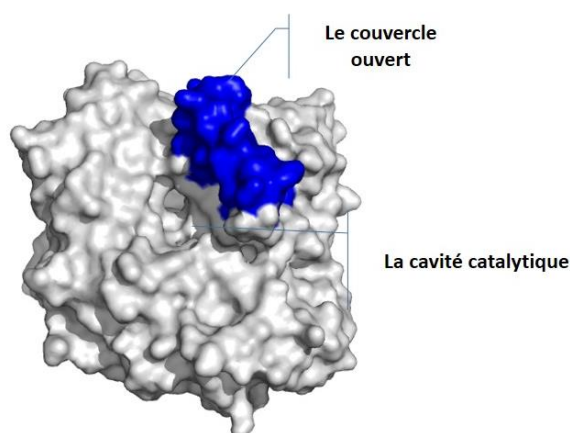
### 3. Test de l'activité inhibitrice sur l'enzyme : Lipase de *Candida rugosa* (LCR)

Cette étude est une continuité des travaux de Benarous et *al.* (2013), où les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique ont été optimisés (tableau 5), le choix de cette enzyme (figure 19) est basé sur plusieurs conditions (détaillées dans la partie bibliographique).

**Tableau 5.** Paramètres cinétiques de la LCR (Benarous, 2014).

| Paramètre       | valeur | unité                               |
|-----------------|--------|-------------------------------------|
| $1/V_{\max}$    | 13.07  | min/mM                              |
| $1/K_m$         | 2      | 1/mM                                |
| $V_{\max}$      | 0.08   | mM/min                              |
| $K_m$           | 0.56   | mM                                  |
| $K_{cat}$       | 1.92   | min <sup>-1</sup>                   |
| $K_{cat} / K_m$ | 3.45   | Min <sup>-1</sup> .mM <sup>-1</sup> |

**$V_{\max}$**  : vitesse maximale de la réaction ;  **$K_m$**  : constante de Michaelis-Menten ;  **$K_{cat}$**  : constante catalytique,  **$K_{cat} / K_m$**  : l'efficacité catalytique de l'enzyme ;  $[E]=8,7 \times 10^{-3}$  mM



**Figure 19.** Photo en surface du LCR (code PDB : 1LCR ; Cygler et Schrag, 1999) avec l'état ouvert du couvercle obtenu à partir du logiciel PyMol

Ce test est basé principalement sur une technique d'analyse biochimique : UV-visible (Benarous et *al.*, 2015), dont le changement de la couleur du milieu réactionnel est essentiel pour savoir mesurer la quantité d'enzymes inhibées par le produit naturel testé, de ce fait, nous avons choisi le p-nitrophenyl-laurate (p-NPL) comme substrat de couleur transparente qui donne après l'action de la LCR le produit : p-nitrophenol avec une couleur jaune qui est détectée par le spectrophotomètre à la longueur d'onde  $\lambda = 405\text{nm}$ .

Nous commençons le protocole par la préparation d'une série de dilutions des extraits naturels dans l'éthanol de 0,5 à 2 mg/ml, suivi par la préparation du substrat dans le 2-propanol (10Mm) puis dilué dans une solution tampon phosphate saline 1 :10 (v : v).

Dans une microplaque stérile, un volume de 20  $\mu\text{l}$  de l'extrait dilué est ajouté à 20  $\mu\text{l}$  d'une solution enzymatique (0.5mg/ml) et incubés pour 15mn à 37°C. Après pré-incubation, la réaction enzymatique est initiée par l'ajout d'un volume de 180  $\mu\text{l}$  de la solution du substrat au mélange, pour avoir à la fin 220  $\mu\text{l}$  du milieu réactionnel dans chaque puits de la plaque. Le mélange est incubé pendant 20 min à 37°C. Les mesures de l'absorbance du produit de

la réaction enzymatique ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques : Biotek ELX 800 UV. Après avoir lu les absorbances, nous pouvons déterminer les valeurs de I% (Equation\*), et tracer les graphes  $I\% = f(C)$ , puis calculer les  $IC_{50}$ , qui représente la concentration d'extrait pouvant inhiber 50% des enzymes dans un milieu réactionnel.

$$I\% = \left[ 1 - \left( A_{\text{extrait}} / A_{\text{control}} \right) \right] \times 100$$

Equation \*

Avec : I % : le pourcentage d'inhibition.  $A_{\text{extrait}}$  : l'absorbance de l'activité lipolytique en présence de l'extrait végétal.  $A_{\text{control}}$  : l'absorbance de l'activité lipolytique en absence de l'extrait végétal.

#### **4. Amarrage moléculaire**

Dans cette partie et après l'étude *in vitro*, nous avons procédé à une étude de modélisation moléculaire pour des enzymes d'un grand intérêt dans la cellule de *C.albicans*, afin de comprendre le mécanisme inhibiteur de quelques extraits et molécules d'origine naturelle sur la croissance des cellules microbiennes, et de chercher un meilleur arrangement moléculaire entre les molécules choisies comme inhibitrices de l'activité enzymatique et des enzymes jouant un rôle clé dans la vie cellulaire de ces levure pathogènes à l'homme. De ce fait, le meilleur modèle d'amarrage moléculaire et par conséquent apparaît plus stable avec énergie d'interaction la plus faible, sera proposé comme l'un des outils de recherche de produits pharmaceutiques pour le traitement de la candidose.

##### **4.1. Choix des enzymes**

La base de la sélection des enzymes pour l'application *in silico* était une recherche bibliographique approfondi (Berman *et al.*, 2000 ; Roux *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2016 ; Markus *et al.*, 2017 ; Ismail *et al.*, 2018) à fin d'avoir un nombre d'enzymes qui sont impliquées dans le métabolisme cellulaire et jouent un rôle important dans le mécanisme d'invasion.

Quatre enzymes de l'espèce fongique *C.albicans* sont ciblées pour cette étude, à savoir : Lipase de *Candida rugosa*, Serine/threonine phosphatase, Phosphomannose isomerase , Sterol 14- $\alpha$  demethylase (CYP51) de *Candida albicans*.

### **A. Lipase de *Candida rugosa* LCR**

Cette enzyme avec un code PDB ID : 1 LPP (Grochulski *et al.*, 1994), constituée de 549 acides aminés (AA) avec trois ligands co-cristallisés :

- L'acide 1-hexadecanosulfonique (HDS)
- L'ion calcium
- Le n-acétyl-d-glucosamine avec molécule d'eau

Durant la préparation du fichier de docking, les deux molécules de HDS (analogues de substrat) ont été enlevés. La poche du site actif de LCR est exceptionnelle et complètement différente de celles des autres lipases. Dans cette enzyme, le site de liaisons des acides gras scissiles est situé dans un tunnel à l'intérieur de la protéine avec une large entrée à droite. Ce tunnel est au moins de 22 Å de longueur et un diamètre de 4 Å, et formé de la triade catalytique : Ser209, His 449, Glu 341, plus les AA du trou d'oxyanion Gly 124 et Ala 210 et d'autres AA : Phe125, Met213, Val245, Pro246, Phe296, Ser301, Leu302, Arg303, Leu304, Leu307, Phe345, Tyr361, Phe362, Ser365, Phe366, Val409, Leu410, Leu413, Gly414, Phe415, Phe532 et Val534 (Grochulski *et al.*, 1994 ; Schmitt *et al.*, 2002, Benarous, 2014).

### **B. Serine/thréonine phosphatase de *Candida albicans* (StPCA)**

Selon Chen *et al.* (2016), cette enzyme avec un code PDB ID : 5JPF, constituée de 317 acides aminés (AA) avec trois ligands co-cristallisés :

- L'ion de Manganèse II
- L'ion malonate
- La microcystine LR comme toxine avec molécules d'eau

Durant la préparation du fichier pour le docking, la toxine microcystine en tant qu'inhibiteur de l'enzyme est enlevée. La poche du site actif de StPCA est formée de trois groupes d'acides aminés : le premier est composé de Asp222, His231, Asp257, Arg261, Asn289, His290, Arg386, His413, Tyr437 ; le deuxième est constitué de Arg297 et Val298, alors que le dernier groupe s'agit de Tyr299 (Chen *et al.*, 2016).

### **C. Phosphomannose isomérase de *Candida albicans* (PMICA)**

Selon Ahmed *et al.* (2018), cette enzyme avec un code PDB ID : 5NW7, constituée de 455 acides aminés (AA) avec deux ligands co-cristallisés :

- L'ion de Zinc
- Le [(2~{R},3~{R},4~{S})-5-diazanyl-2,3,4-tris(oxidanyl)-5-oxidanylidene-pentyl] dihydrogène phosphate.

Durant la préparation du fichier pour le docking, le ligand en tant qu'inhibiteur de l'enzyme est enlevé. La poche du site actif de la PMICA est composée de la triade catalytique suivante : Glu294, Glu138 & Lys136 avec deux autres groupes d'acides aminés : (Lys310, Leu108, Tyr16, Lys100, Gln111 & Arg304); (Tyr130, Val302, Asn129, Asp300 & Met296).

#### **D. Stérol 14-alpha demethylase de *Candida albicans* (CYP51)**

Selon Alqahtani *et al.* (2018), cette enzyme avec un code PDB ID : 5FSA, constituée de 490 acides aminés (AA) avec deux ligands co-cristallisés :

- L'hème
- Le posaconazole

Durant la préparation du fichier pour le docking, le ligand antifongique est enlevé. La poche du site actif de CYP 51 est composée de deux sites : AC1 et AC2 composés de Ala61, Leu121, Phe126, Ile131, Phe228, Pro230, Phe233, Gly307, Leu376, His377, Ser506, Ser507, Met508 et de Tyr118, Ile131, Leu139, Lys143, Gly308, Thr311, Pro375, Ile379, Arg381, Pro462, His468, Arg469, Lys470, Ile471, respectivement.

#### **4.2.Choix des molécules inhibitrices**

Parmi les critères de sélection des molécules pour l'étude *in silico* sont :

- Les molécules doivent être d'origine naturelle
- Ayant une activité ou au moins contenues dans un extrait montrant *in vitro* une activité antifongique (contre *C.albicans*) et une activité inhibitrice sur la LCR.

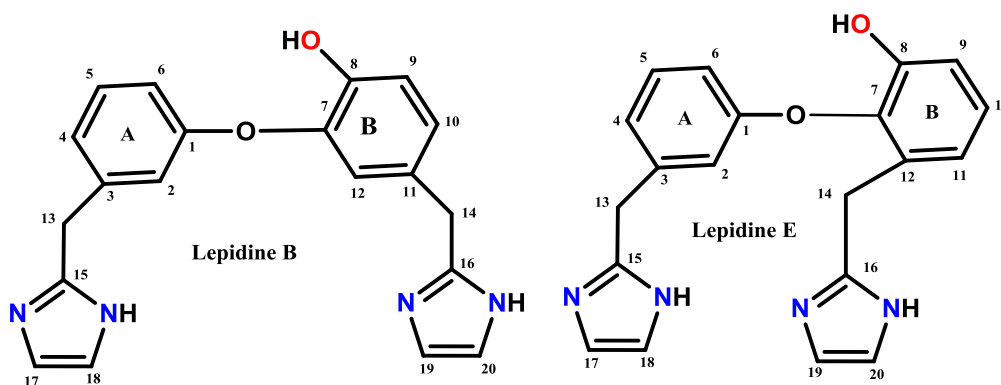
Après plusieurs recherches bibliographiques, et en se basant sur les résultats de nos expérimentations dans cette étude, nous avons visé l'extrait alcaloïdique de *Lepidium.sativum*, dont les composés majoritaires de ce dernier sont un groupe rare d'alcaloïdes imidazoliques : les lepidines et semi-lepidines (Maier *et al.*, 1998 ; Shukla *et al.*, 2011 ; Kwapong *et al.*, 2018).

Suivant les références citées ci-dessus, nous avons choisi deux composés majoritaires de cet extrait : Lepidine B et Lepidine E ; sachant que :

- Lepidine B est le composé majoritaire avec 1.1%, pour le deuxième composé, Lepidine E, il représente 0.88% (ils sont presque équivalents).
- Il a été publié par Maier *et al.*, en 1998 que Lepidine E est un isomère de la Lepidine B, de sorte que dans la lepidine B le cycle est lié au groupement imidazole par le carbone 12 (C12), tandis que chez la Lepidine E, il est attaché à son C11.

A travers cette étude, nous allons déterminer l'effet des structures des deux composés présentées dans la figure 21 sur l'activité des différentes enzymes investiguées. Les structures de la Lepidine B et E (figure 20) ont été obtenues à partir de la base de données PubChem (Kim *et al.*, 2016) et assemblées avec Discovery Studio Visualizer v4.0.

Les fichiers PDB des quatre enzymes ont été téléchargés à partir de Protein Data Bank (PDB) (Bencurova *et al.*, 2018). Pour le docking, les protéines doivent être préparées en enlevant toutes les molécules d'eau inutiles, hétéroatomes et tout ligand ou solvant co-cristallisé. Les molécules d'eau impliquées dans les interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur ont été laissées pour la simulation. Les charges partielles et hydrogènes polaires ont été ajoutés aux structures en utilisant l'Autodock tools (ADT) (version 1.5.4). L'amarrage moléculaire été effectué à l'aide du programme : Autodock Vina (Trott *et al.*, 2010) dans une stations de travail de huit CPU et pendant 48 h.



**Figure 20.** Structures chimiques de la Lepidine B et E (Shukla *et al.*, 2011).

Le logiciel utilise des boîtes rectangulaires pour le site liaison, le centre de la boîte a été réglé et affiché en utilisant ADT. La boîte en grille de chaque enzyme est affichée dans le tableau 5 avec 1 Å de point de séparation dans le milieu du site actif de chaque protéine. En ce qui concerne la flexibilité de la chaîne latérale durant cet amarrage spécifique, les torsions flexibles dans les ligands étaient libres, et les angles dièdres acycliques ont été autorisés à

tourner librement (Martins *et al.*, 2011). Les paramètres par défaut ont été utilisés, sauf que le nombre de conformations de sortie a été défini à un. Le nombre de tours d'amarrage été réglé sur 50 tours. Les solutions obtenues égales à 50 conformations pour chaque enzyme et ligand. Toutes ces solutions sont très bien étudiées. La « graine aléatoire » est aléatoire. Les conformations préférées sont celles qui ont la plus faible énergie de liaison dans le site actif. Finalement, les résultats générés d'amarrage sont directement chargés dans le logiciel Discovery Studio visualizer, v4.0.

Les structures des quatre enzymes co-cristallisées avec des ligands inhibiteurs et caractéristiques, ainsi les paramètre d'amarrage ont été obtenues à partir de PDB (Protein Data Bank) et montrées dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Les enzymes cibles avec paramètres du docking.

| Enzyme                                                    | PDB ID | Ligands                                              | Nombre de molécules d'eau | x*y*z centre de grille | x*y*z taille de la grille |
|-----------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| Lipase de <i>Candida rugosa</i>                           | 1LPP   | Ca <sup>2+</sup> , NAG, acide 1-Hexadecanosulfonique | HOH674, HOH724            | 65,462x52,896x-10,469  | 22x20x24                  |
| Serine/threonine phosphatase de <i>C. albicans</i>        | 5JPF   | Mn <sup>2+</sup> , MLI, Microcystine LR              | HOH101,102,103,104,618    | 147,018x-9,071x18,34   | 22x12x26                  |
| Phosphomannose isomerase de <i>C.albicans</i>             | 5NW7   | Zn <sup>2+</sup> & 9C2                               | HOH 615, 645, 673, 732    | 21,193x16,481x9,854    | 10x18x12                  |
| Sterol 14-alpha demethylase (CYP51) de <i>C. albicans</i> | 5FSA   | Posaconazole & Hem                                   | HOH2052                   | 195,506x-5,037x38,928  | 40x40x40                  |



***Résultats et  
discussion***

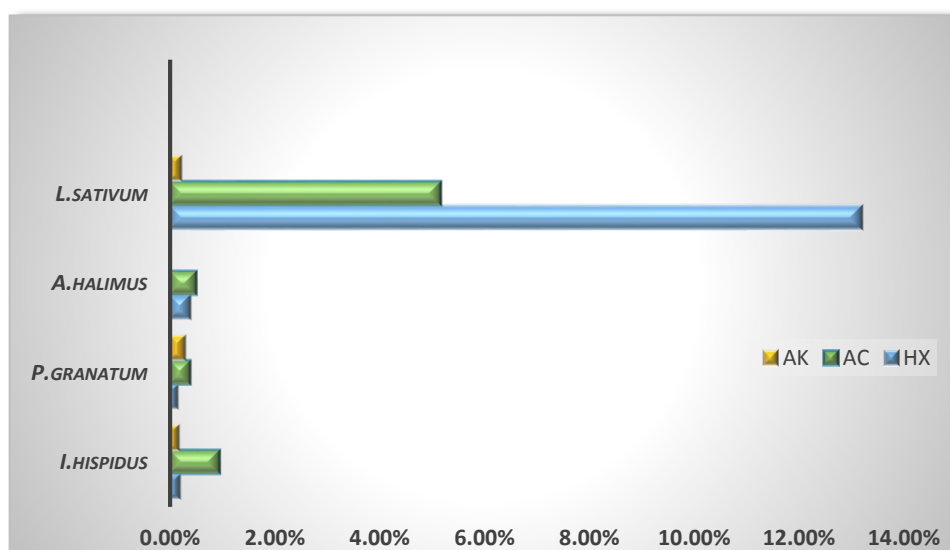
### 1. Extraction des métabolites secondaires

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 07 et la figure (21), où nous remarquons la richesse des plantes et champignon en métabolites avec différentes quantités allant de 13.2% jusqu'au 0.16%, variant selon le type de solvant, méthode d'extraction, espèce biologique et partie utilisé de cette dernière.

**Tableau 7.** Rendements, aspects et couleurs des extraits obtenus.

| Extrait           |    | Rendement (%) | Aspect et couleur |
|-------------------|----|---------------|-------------------|
| <i>L.sativum</i>  | HX | 13.2          | Huile jaune       |
|                   | AC | 5.16          | Huile jaune       |
|                   | AK | 0.2           | Poudre jaunâtre   |
| <i>A.halimus</i>  | HX | 0.4           | Pate vert foncé   |
|                   | AC | 0.52          | Pate verte        |
| <i>P.granatum</i> | HX | 0.16          | Pate marron       |
|                   | AC | 0.4           | Pate marron       |
|                   | AK | 0.27          | Poudre blanche    |
| <i>I.hispidus</i> | HX | 0.2           | Pate brune        |
|                   | AC | 0.96          | Pate jaune        |
|                   | AK | 0.16          | Poudre jaune      |

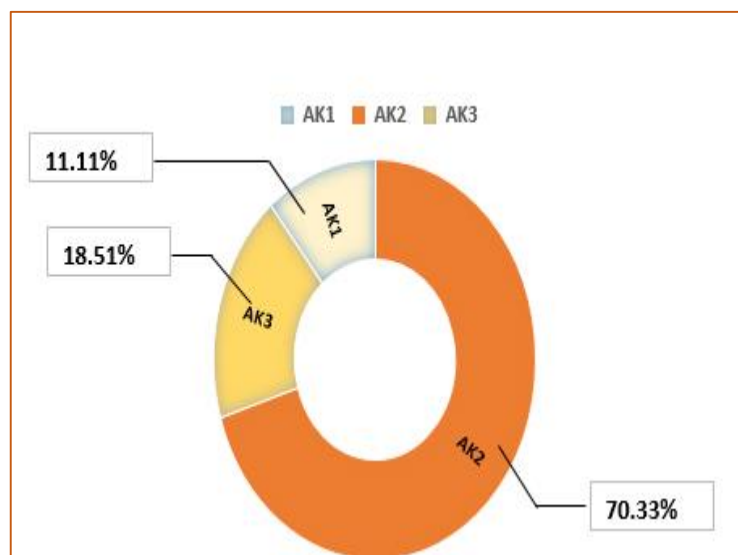
Les graines de *L.sativum* ont été plus riches en métabolites à savoir l'extrait hexanique (HX) suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (AC) par rapport aux autres extraits obtenus.



**Figure 21.** Représentation graphique des rendements d'extractions.

Parmi les matières naturelles testées, seuls le jus du fruit de grenadier et les graines du *L.sativum* ont présenté des quantités importantes en alcaloïdes (AK).

Sachant que la méthode employée pour la séparation de trois phases du jus de grenadier a donné les valeurs exprimées dans le graphique de la figure 22.



**Figure 22.** Pourcentages des fractions alcaloïdiques contenues dans le fruit du grenadier.

Il apparaît que la fraction la plus riche en ce type de métabolites secondaires était les résidus (AK2) issus de la filtration du jus avec le pourcentage le plus élevé (70,33%) suivi de celui du jus filtré (AK3).

Au cours du processus d'extraction, les solvants diffusent dans le matériel végétal solide et solubilisent des composés de polarité similaire. La polarité du solvant influe sur la quantité et la composition en métabolite secondaire d'un extrait (Javed *et al.*, 2012 ; Jones et Kinghorn, 2012). De plus selon Amarti *et al.*, (2010), les compositions chimiques du point de vue variations sont en rapport avec certains facteurs écologiques, la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante ou même les facteurs génétiques, ce qui explique la différence en quantité des extraits obtenus dans notre étude, entre les espèces végétales et même la différence des extraits de la même plante avec solvants.

Il était confirmé aussi que les facteurs environnementaux y compris les facteurs édaphiques du sol et des conditions météorologiques, localisation géographique, conditions climatiques, méthode d'extraction et collecte saisonnière (Alqahtani *et al.*, 2018), ainsi que les pratiques agronomiques et les conditions du stockage (Bourgou *et al.*, 2008), ont un grand rôle dans la qualité et la quantité des produits naturels.

On peut comparer nos résultats avec ceux obtenus par Chatoui et *al.* (2016) où les rendements d'extraction à partir des graines de *L.sativum* ont été élevés : extrait de méthanol (34,2%) suivi d'extrait d'acétate d'éthyle (19,1%) et enfin l'extrait d'éther de pétrole (14,2%), cette différence peut s'expliquer par les facteurs cités ci-dessus. De plus Comme décrit dans l'étude de Wadhwa et *al.* (2012), les graines de *L. sativum* peuvent contenir des alcaloïdes tels que la lépidine, la glucotropaeoline, la N, N'-dibenzylurée, la N, N'-dibenzylthiourée, l'acide sinapique et son ester de choline (sinapine), cela confirme la quantité d'alcaloïdes obtenue dans notre étude suivant un protocole d'extraction spécifique.

Les résultats obtenus après l'extraction de métabolites à partir du fruit de *P.granatum* montrent la richesse de ce dernier en différents composés phytochimiques avec polarité et nature biochimique variées ce qu'a été montré par l'étude de Bhandary et *al.* (2012) dont le test d'un large groupe de métabolites dans trois types d'extraits du fruits (aqueux, ethanologique et chloroforme) a confirmé la présence de triterpénoides, glycosides, alcaloïdes, saponines, flavonoïdes, tannins et vitamine C.

L'*A.halimus* ou G'ttaf est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement en premier lieux des maladies digestives et génitales à cause de sa richesse en polyphénols, tannins et saponines (pauvre en alcaloïdes) (Hadjadj *et al.*, 2015 ; Ounaissia *et al.*, 2020) ; ainsi que le rendement de métabolites peut atteindre jusqu'à 6 % de la matière végétale sèche en utilisant le méthanol comme solvant (Ounaissia *et al.*, 2020), ce qui est différent de notre cas avec l'acétate d'éthyle et l'hexane où le rendement enregistré était plus bas (0.5% t 0.4% respectivement).

Concernent le champignon *I.hispidus* nous remarquons aussi sa richesse en métabolites avec un rendement important en AC (0.96%) par rapport aux deux autres extraits (HX et AK), ce résultat reste proche à celui obtenus par Benarous et *al.* en 2013 (1.46 %) .

## **2. Identification des souches fongiques**

Les résultats obtenus après l'isolement des souches sur milieu solide où la croissance des levures est bonne avec couleur blanche ainsi que sous microscope les cellules apparaissent ovales colorées en violet après une coloration de Gram , ont confirmé les caractéristiques morphologiques ainsi que biochimiques (figure 23) des cellules de l'espèce *Candida albicans*.



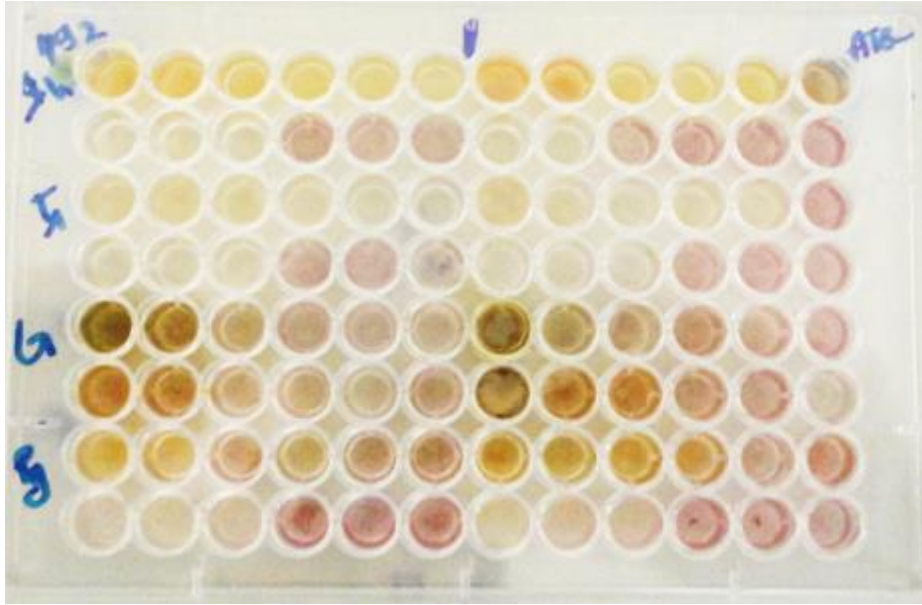
**Figure 23.** Résultat de la galerie API Cand.

### 3. Test de l'activité antifongique

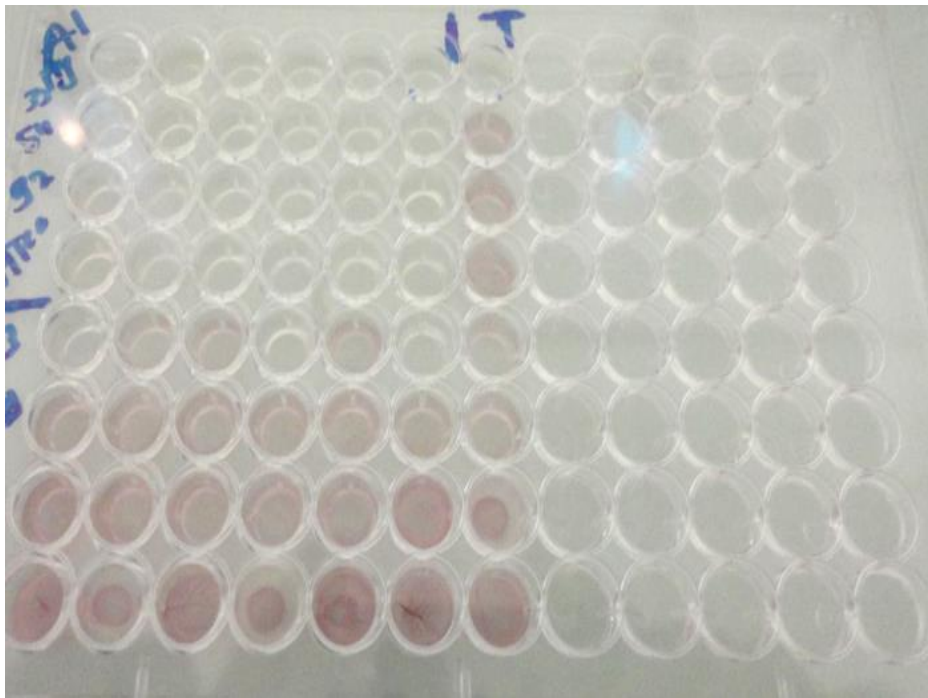
L'étude de Sadik *et al.* (2018), montre que *C. albicans* est l'espèce du genre *Candida* qui provoquent des infections fongiques à virulence extrême chez l'Homme. De plus, ces levures colonisent normalement 80% du microbiote des individus en bonne santé qui peuvent se transformer en pathogènes dans des conditions spéciales.

Les résultats obtenus dans ce test (figure 25) ont révélé une activité modérée vers puissante sur la croissance des cellules microbiennes, dont les CMI enregistrées avec l'extrait alcaloïdique du jus de grenadier étaient les plus faibles suivi de celles d'AC d'*I.hispidus*, tandis que les souches ont montré une résistance à la présence d'extrait HX d'écorce de *P.granatum* dans le milieu.

De plus, certains auteurs (Arif *et al.*, 2009) montrent dans leurs recherches qu'un grand groupe de métabolites secondaires de plantes (tanins, terpénoïdes, saponines, alcaloïdes, flavonoïdes et autres composés) possèdent des propriétés antifongiques *in vitro*. Avec faible effets secondaires, un coût réduit comparés aux produits pharmaceutiques conventionnels, les produits naturels extraits de plantes font une alternative aux fongicides synthétiques pour le traitement des maladies d'origine fongique (Doddanna *et al.*, 2013).



(a)



(b)

**Figure 24.** Photos des microplaques incubée 24h à 30°C avec la réaction des puits à l'INT.

(a) Résultats des extraits HX et AC (b) Résultats des extraits AK.

La différence d'action entre les extraits d'une même plante prouve la complexité et la diversité des composés, le changement du solvant d'extraction a fait la différence entre les trois extraits en quantité et en qualité. Par conséquent, leur influence sur le pouvoir

antimicrobien (tableau 8, 9, 10 et 11), ce qui est confirmé par la littérature (Rio *et al.*, 2005 ; Tiwari *et al.*, 2011 ; Seidel *et al.*, 2012 ; Routray *et al.*, 2013 ; Prado *et al.*, 2014).

### 3.1.Extraits de *Punica granatum*

Nous remarquons d'après le tableau 8, que les trois extraits de *P. granatum* ont une activité antifongique, avec l'enregistrement du plus fort pouvoir dans le cas de l'extrait AC (CMI : 0,5 mg/ml) suivi de l'extrait AK. En revanche, l'extrait HX a montré la plus faible activité inhibitrice. Parmi les quatre souches testées, la souche M3 a présenté une sensibilité élevée par rapport aux autres souches (croissance inhibée dans tous les cas avec faible dose d'extrait : 0,5mg/ml).

**Tableau 8.** Activité antifongique des extraits de *P.granatum* (CMI, CMF)

| Extrait          | Plante                                  | CMI (mg/ml)<br>(code des souches<br>testées) | CMF (mg/ml)            | Reference                            |
|------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| HX               | <i>P. granatum</i><br>(ecorce)          | PI (A)<br>PI (I)<br>PI (M2)<br>0,5 (M3)      | /<br>/<br>/<br>>0.5    | Nos résultats                        |
| AC               | <i>P. granatum</i><br>(ecorce)          | 1(A)<br>2 (I)<br>1 (M2)<br>0,5 (M3)          | >1<br>>2<br>>1<br>>0.5 | Nos résultats                        |
| AK               | <i>P. granatum</i> (arilles)            | 1 (A)<br>2 (I)<br>1(M2)<br>1 (M3)            | >1<br>>2<br>>1<br>>1   | Nos résultats                        |
| FLU              | /                                       | 0,7 (A)<br>0.175 (I)<br>1 (M2)<br>1 (M3)     |                        | Nos résultats                        |
| Lectine (PgTel)  | <i>P.granatum</i> (fruit)               | 0,05                                         |                        | Da silva <i>et al.</i> , 2018        |
| Ethanol          | <i>P.granatum</i> (arilles,<br>graines) | >1                                           |                        | Anibal <i>et al.</i> , 2013          |
| Ethanol          | <i>P.granatum</i> (ecorce)              | 0,125                                        |                        | Anibal <i>et al.</i> , 2013          |
| Ethanol          | <i>P.granatum</i> (fruit)               | 0,5                                          |                        | Anibal <i>et al.</i> , 2013          |
| Punicalgine      | <i>P.granatum</i> (ecorce)              | 0,0039                                       |                        | Endo <i>et al.</i> , 2010            |
| Acetate d'éthyle | <i>P.granatum</i> (ecorce)              | 0,0039                                       |                        | Endo <i>et al.</i> , 2010            |
| Methanol         | <i>P.granatum</i> (ecorce)              | 0,250                                        |                        | Bassiri-Jahromi <i>et al.</i> , 2015 |
| Gel              | <i>P.granatum</i> (fruit)               | 0,15                                         |                        | Vasconcelos <i>et al.</i> , 2006     |

CMI : concentration minimale inhibitrice, HX: extrait hexanique, AC: extrait d'acétate d'éthyle, AK: extrait alcaloïdique, FLU: fluconazole, PI : pas d'inhibition, (A): *C.albicans* ATCC 10231, (I): *C.albicans* IPA200, (M2): *C.albicans* M2, (M3): *C.albicans* M3.

L'efficacité des extraits du fruit de grenadier sur les levures pathogènes : *Candida albicans*, a été prouvée par plusieurs études (tableau 8), nous citons qu'avec la même souche de *C.albicans* (ATCC 10123), l'auteur Patel et ses collaborateurs (2017) ont trouvé que l'extrait aqueux des écorces de *P.granatum*, peut inhiber la croissance fongique à 900µg (diamètre de 25mm).

L'activité antimicrobienne de *P. granatum* est largement étudiée (tableau 8), cette importante activité de la grenade est due à la richesse de son péricarpe en composé phénoliques, flavonoïdes, tannins (Haslam et al, 1996), et selon Dahham et al. (2010), l'activité antifongique peut être expliquée par la présence de punicalagine, castagalagine, granatine, catechine, gallocatechine, kaempferol et quercétine. Dans une autre étude présentée par Endro et al, (2010), la punicalagine est citée comme une source de forte activité antifongique contre *C. albicans*. Nous ajoutons que, les travaux de Jahromi et al, (2018) montrent *in vivo* que l'extrait de l'écorce de *P. granatum* a une efficacité contre les candidoses orales dues à *C. albicans*.

### **3.2. Extrait d'*Inonotus hispidus***

Les résultats obtenus dans ce test sont montrés dans le tableau 9, où l'activité des extraits est proche à celle de la molécule antifongique de référence (FLU). Nous citons que l'extrait AK n'a aucun effet sur la croissance cellulaire avec concentration de 4mg/ml, de plus l'extrait AC paraît le plus fort avec 0,125 mg/ml en inhibant la croissance. Nous remarquons aussi que les souches fongiques ne présentent pas la même sensibilité à la présence des extraits dans le milieu, comparativement aux concentrations de FLU, l'influence de l'extrait AC sur les cellules avec des concentrations proches est remarquable, tandis que nous observons le contraire dans le cas de l'extrait HX. La concentration minimale fongicide était variable et majoritairement supérieure à la CMI.

Il a été rapporté par Suay et al. (2000), que les basidiomycètes peuvent produire un large groupe de composés antimicrobiens, de plus dans l'étude de Benarous et al. (2015) sur la même espèce de champignon (*I.hispidus*), nous trouvons que la quantification de polyphénols et de flavonoïdes dans plusieurs fractions de solvants différents a montré la richesse de l'extrait d'acétate d'éthyle en polyphénols et flavonoïdes parmi toutes les fractions testées. De ce fait, nous pouvons expliquer l'efficacité de cet extrait dans notre étude par la présence de ces métabolites biologiquement actifs (Teodoro et al., 2015 ; Karak, 2019).

**Tableau 9.** Activité antifongique des extraits de *I.hispidus* (CMI, CMF)

| Extrait          | Plante                     | CMI (mg/ml)<br>(code des souches<br>testées) | CMF (mg/ml)                | Reference                        |
|------------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| HX               | <i>I.hispidus</i> (fruit)  | 2(A)<br>1 (I)<br>0,25 (M2)<br>>5 (M3)        | >2<br>> 1<br>>0,25<br>/    | Nos résultats                    |
| AC               | <i>I.hispidus</i> (fruit)) | 0,125A)<br>0,125 (I)<br>1 (M2)<br>1 (M3)     | >0,125<br>>0,125<br>2<br>1 | Nos résultats                    |
| AK               | <i>I.hispidus</i> (fruit)  | >5                                           |                            | Nos résultats                    |
| FLU              | /                          | 0,7 (A)<br>0,175 (I)<br>1 (M2)<br>1 (M3)     |                            | Nos résultats                    |
| Methanol         | <i>I.hispidus</i> (fruit)  | 1.71                                         |                            | Angelini <i>et al.</i> ,<br>2019 |
| Methanol         | <i>I.hispidus</i> (fruit   | 6.4                                          |                            | Pala <i>et al.</i> , 2019        |
| Acétate d'éthyle | <i>I.hispidus</i> (fruit)  | 6.4                                          |                            | Pala <i>et al.</i> , 2019        |

CMI: concentration minimale inhibitrice, HX: extrait hexanique, AC: extrait d'acétate d'éthyle, AK: extrait alcaloïdique, FLU: fluconazole, (A): *C.albicans* ATCC 10231, (I): *C.albicans* IPA200, (M2): *C.albicans* M2, (M3): *C.albicans* M3.

### 3. Extrait d'*Atriplex halimus*

Un pouvoir antifongique des extraits de feuilles d'*A.halimus* est observé à partir du test CMI (tableau 10), les résultats figurant dans le tableau montrent l'efficacité de l'extrait AC par rapport à celui HX, avec CMI de 0,5 et 1 mg/ml, respectivement, sur la souche M2, tandis que dans les deux cas la souche IPA 200 présente une résistance contre les composés naturels.

Ces résultats peuvent être comparés avec ceux obtenus par plusieurs travaux scientifiques (tableau 9), la composition des feuilles de cette plante en métabolites secondaires possédant une action inhibitrice sur les cellules microbiennes a été prouvée par les scientifiques (Benhammou *et al.*, 2009 ; Rahman *et al.*, 2011 ; Chikhi *et al.*, 2014 ; El-Aasr *et al.*, 2016), tout dépend de la nature chimique du solvant d'extraction et la technique correspondante.

**Tableau 10.** Activité antifongique des extraits d'*A.halimus* (CMI)

| Extrait         | Plante                      | CMI (mg/ml)<br>(code des souches<br>testées) | Reference                        |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|
| HX              | <i>A.halimus</i> (feuilles) | >5(A)<br>>5 (I)<br>1 (M2)<br>2 (M3)          | Nos résultats                    |
| AC              | <i>A.halimus</i> (feuilles) | 2(A)<br>>5 (I)<br>0,5 (M2)<br>2 (M3)         | Nos résultats                    |
| FLU             | /                           | 0,7 (A)<br>0,175 (I)<br>1 (M2)<br>1 (M3)     | Nos résultats                    |
| Ether de pétrol | <i>A.halimus</i>            | 0,39                                         | Ibrahim <i>et al.</i> ,<br>2018  |
| Ether de pétrol | <i>A. lindleyi</i>          | 0,0625                                       | El Souda <i>et al.</i> ,<br>2015 |
| Ethanol         | <i>A.lindleyi</i>           | 0,0625                                       | El Souda <i>et al.</i> ,<br>2015 |
| Chloroforme     | <i>A.lindleyi</i>           | 0,0625                                       | El Souda <i>et al.</i> ,<br>2015 |

CMI: concentration minimale inhibitrice, HX: extrait hexanique, AC: extrait d'acétate d'éthyle, AK: extrait alcaloïdique, FLU: fluconazole, (A): *C.albicans* ATCC 10231, (I): *C.albicans* IPA200, (M2): *C.albicans* M2, (M3): *C.albicans* M3.

### 3.5. Extrait de *Lepidium sativum*

Le tableau 11 montre que les deux extraits de graines de *L. sativum* ont une activité remarquable contre toutes les souches de *C. albicans* testées. La valeur maximale de CMI de 9 mg / ml étant enregistrée dans le test contre IPA200, suivie de la concentration 4,5 mg / ml inhibant M2 et M3, ce qui peut être observé également pour l'extrait d'AK contre les quatre souches et enfin une très faible valeur de HX a arrêté la croissance de la souche ATCC10231. De plus, aucune activité fongicide n'a été obtenue des CMI sur milieu gélose Sabouraud.

Le contrôle positif (test de fluconazole) démontre la variabilité de sensibilité des quatre souches à la molécule antifongique pharmaceutique.

**Tableau 11.** Activité antifongique des extraits de *L.sativum* (CMI)

| Extrait               | Plante                                | CMI (mg/ml)<br>(cde de souches testées)       | Reference                        |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|
| HX                    | <i>L. Sativum</i> (graines)           | 2,25 (A)<br>> 4,5 (I)<br>4,5 (M2)<br>4,5 (M3) | Nos résultats                    |
| AC                    | <i>L. Sativum</i> (graines)           | >5                                            | Nos résultats                    |
| AK*                   | <i>L. Sativum</i> (graines)           | 4,5 (A)<br>4,5 (I)<br>4,5 (M2)<br>4,5 (M3)    | Nos résultats                    |
| FLU                   | /                                     | 0,7 (A)<br>0,175 (I)<br>1 (M2)<br>1 (M3)      | Nos résultats                    |
| Methanol              | <i>L. Sativum</i> (graines)           | 15                                            | Bhasin <i>et al.</i> , 2012      |
| Hexane                | <i>L. Sativum</i> (graines)           | 3                                             | Bhasin <i>et al.</i> , 2012      |
| Ethyl-acetate         | <i>L. Sativum</i> (graines)           | NI                                            | Bhasin <i>et al.</i> , 2012      |
| Ethanol               | <i>L. Sativum</i> (graines)           | >10                                           | Zia-Ul-Haq <i>et al.</i> , 2011  |
| Ether de petrol       | <i>L.sativum</i> (graines)            | 47,5                                          | Alqahtani <i>et al.</i> , 2018   |
| Methanol              | <i>Teucrium polium</i>                | 12,5                                          | Masomi <i>et al.</i> , 2016      |
| Methanol              | <i>Piper nigrum</i>                   | 25                                            | Masomi <i>et al.</i> , 2016      |
| Methanol              | <i>Pistachia vera</i>                 | 25                                            | Masomi <i>et al.</i> , 2016      |
| Ethyle acétate        | <i>Cordia macleodii</i><br>(feuilles) | 1                                             | Sandip <i>et al.</i> , 2018      |
| Hexane                | <i>Miliusa tomentosa</i>              | 0,5                                           | Sandip <i>et al.</i> , 2018      |
| Alcaloïdes            | <i>Lupines angustifolius</i>          | 0,250                                         | Erdermoglul <i>et al.</i> , 2007 |
| Berberine (alcaloïde) | /                                     | 0,200                                         | Dhamgaye <i>et al.</i> , 2014    |

CMI : concentration minimale inhibitrice, HX : extrait hexanique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, AK : extrait alcaloïdique (\*: lepidine B=0.05mg, lepidine E= 0.04mg) , FLU: fluconazole, (A): *C.albicans* ATCC 10231, (I): *C.albicans* IPA200, (M2): *C.albicans* M2, (M3): *C.albicans* M3.

D'après la bibliographie, cette plante était largement étudiée pour ses activités biologiques notamment les graines qui sont riches en métabolites secondaires, ceci apparait clair avec les différentes concentrations inhibitrices sur la même espèce pathogène mais avec plusieurs solvants et techniques d'extraction.

#### 4. Inhibition de la lipase de *Candida rugosa* (LCR)

La détermination du pouvoir inhibiteur des extraits sur la LCR, est obtenue après le traçage des graphiques  $I\% = f(C)$ , nous avons pu avoir les IC<sub>50</sub> montrés dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Inhibition de la Lipase par quelques extraits de plantes.

| Plante                     | Extrait          | IC50<br>mg/ml | Lipase                | Référence                    |
|----------------------------|------------------|---------------|-----------------------|------------------------------|
| <i>L.sativum</i>           | HX               | 1,4           | <i>Candida rugosa</i> | Nos résultats                |
|                            | AC               | 1,7           |                       |                              |
|                            | AK*              | 2,2           |                       |                              |
| <i>P.granatum (ecorce)</i> | AC               | 1,9           |                       |                              |
| <i>P.granatum (jus)</i>    | AK1              | 2,2           |                       |                              |
|                            | AK2              | 1,8           |                       |                              |
|                            | AK3              | 0,7           |                       |                              |
| <i>I.hispidus</i>          | AC               | 1,1           |                       |                              |
| <i>A.halimus</i>           | HX, AC           | T.N           |                       |                              |
| <i>Lepidium sativum</i>    | Hydroalcoolique  | 0.0013        | Pancréatique          | Seyedan <i>et al</i> , 2015  |
| <i>Anthemis palestina</i>  | /                | 0.107         | Pancréatique          | Seyedan <i>et al</i> , 2015  |
| <i>Adonis palaestina</i>   | /                | 0.94          | Pancréatique          | Seyedan <i>et al</i> , 2015  |
| <i>Achillea santolina</i>  | Acétate d'éthyle | 0.37          | <i>Candida rugosa</i> | Benarous <i>et al</i> , 2013 |
| <i>Achillea santolina</i>  | Acétate d'éthyle | 4.83          | <i>Candida rugosa</i> | Benarous <i>et al</i> , 2013 |
| <i>Zizyphus lotus</i>      | Acétate d'éthyle | 0.45          | <i>Candida rugosa</i> | Benarous <i>et al</i> , 2013 |
| <i>Orlistat</i>            | /                | 0.068         | <i>Candida rugosa</i> | Benarous <i>et al</i> , 2017 |
| <i>Origanum majorana</i>   | /                | 0.26          | <i>Candida rugosa</i> | Benarous <i>et al</i> , 2017 |
| <i>Plantago ciliata</i>    | /                | 0.29          | <i>Candida rugosa</i> | Benarous <i>et al</i> , 2017 |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | Méthanol         | 1.29          | Olive                 | Belfeki <i>et al</i> , 2016  |
| <i>Mentha viridis</i>      | Méthanol         | 1.44          | Olive                 | Belfeki <i>et al</i> , 2016  |

HX: extrait hexanique, AC: extrait d'acétate d'éthyle, AK: extrait d'alcaloïdes. (\*: lepidine B=0.025mg, lepidine E=0.020mg). T.N : test non réalisé.

D'après le tableau 12, nous déduirons que tous les extraits testés ont montré un effet inhibiteur de l'activité enzymatique de LCR, avec un pouvoir élevé de l'extrait AK3 (*P.granatum*) et une activité faible par rapport aux reste des extraits qui est AK de *L.sativum*.

De plus, nous citons des valeurs intéressantes dans le milieu réactionnel enregistrées avec 0,7mg d'extrait alcaloïdique et 1,1mg d'extrait AC.

En se référant à la littérature (Schaller *et al.*, 2005 ; Gacser *et al.*, 2007) comme cité précédemment dans la synthèse bibliographique, cette recherche a été réalisé pour tester l'activité anti-lipase, l'un des facteurs les plus virulents qui facilite l'invasion de l'hôte dans la candidose.

Par conséquent, pour interpréter les résultats du test de microdilution, nous avons testé les extraits de plantes sur l'inhibition de la lipase de *Candida rugosa* et essayons de trouver une corrélation entre la croissance des cellules de *Candida* et l'inhibition de la lipase extracellulaire.

Comparativement à de nombreuses études clarifiées dans le tableau 12, nous pouvons dire que nos extraits contiennent une molécule ou des composés actifs qui pourraient affecter négativement l'activité de la lipase. L'utilisation d'un autre système de solvants (eau et alcool) et la nature de la lipase testée et la source du matériel végétal peuvent expliquer la différence entre les résultats de ces études et nos résultats.

L'extrait d'acétate d'éthyle (AC) dans cette étude était plus actif que d'autres extraits de différentes familles de plantes en prenant l'exemple d'*Achilla santolina* ( $IC_{50} = 4,83$  mg/ml) et *Chrysophyllum cainito* où 1mg d'extrait d'acétate d'éthyle peut inhiber 21,5% des lipases pancréatiques réactives (Benarous *et al.*, 2013 ; Briones *et al.*, 2018).

Nos expériences approuvent que les constituants phytochimiques des graines de *L. sativum* en tant que composés phénoliques, alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides et stéroïdes sont classés comme inhibiteurs de la lipase (Doke et Guha, 2014 ; Ahmad *et al.*, 2015 ; Kadeppagari *et al.*, 2015).

Selon le test de microdilution, nous remarquons que l'inhibition de l'activité de la lipase est liée à l'inhibition de la croissance des cellules fongiques dans les tests d'extraits HX, AC et AK des produits naturels. En revanche, l'extrait AC (*L.sativum*) n'a pas montré d'inhibition pour la croissance cellulaire lorsque le même extrait a une activité significative contre la lipase.

## **5. Amarrage moléculaire**

Cette étude était effectuée dans le but de confirmer les résultats expérimentaux et proposer de nouveaux antifongiques, l'amarrage moléculaire a permis de simuler les interactions des composés étudiés dans le site catalytique des quatre enzymes de *Candida albicans* et *Candida rugosa*.

Nous confirmons que la présente étude et à travers les résultats d'amarrage moléculaire obtenus pour les quatre enzymes testées, est effectuée pour la première fois en donnant de nouvelles propositions de modèles des complexes inhibiteur-enzyme *in silico* qui n'ont jamais été publiés au paravent. Des expériences d'amarrage ont été menées pour prédire

l'orientation de la Lepidine B & E afin de mieux comprendre les principaux aspects structuraux de la liaison.

Le docking moléculaire permet le calcul de l'énergie de liaison, le rapport de répétition de la meilleure position et les acides aminés impliqués dans différentes interactions avec les ligands qui sont bien détaillés dans le tableau 13.

L'étude d'amarrage montre que la Lepidine B & E se lie fortement au site actif des quatre enzymes qui sont présentées dans les figures 25-28.

### **5.1. Lipase de *Candida rugosa* (LCR)**

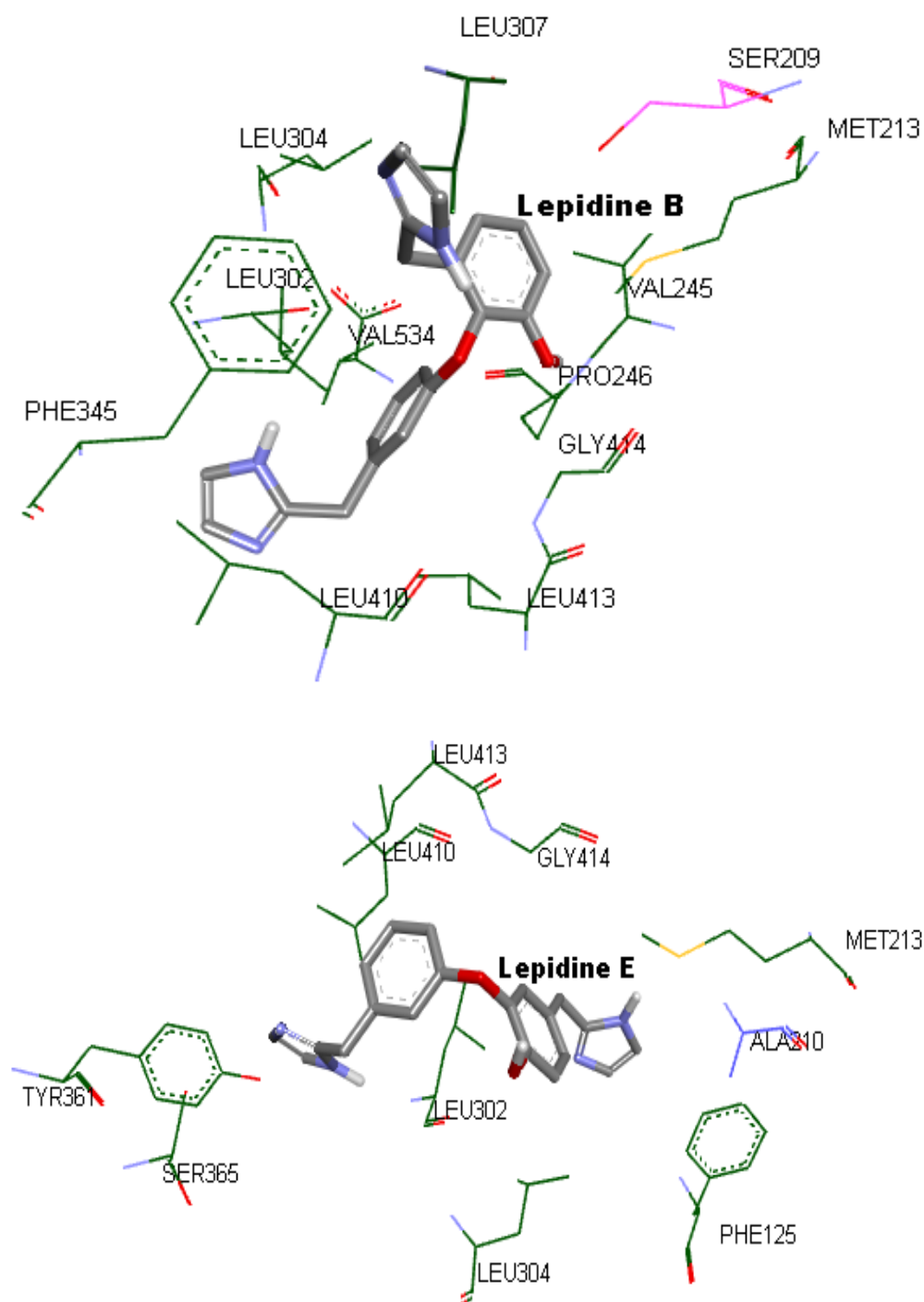
Pour cette enzyme avec PDB ID : 1LPP (Grochulski *et al.*, 1994), dans la position la plus fréquentée du complexe de Lepidine B & E-LCR, nous n'avons pas trouvé des liaisons hydrogènes.

Les interactions hydrophobes avec différents types se forment avec les cycles imidazole et benzène des deux ligands et les acides aminés à savoir :  $\pi$ -alkyl avec Leu302, Leu304, Val245, Val534, Gly414, Leu413 et Leu 410; interaction de  $\pi$ -  $\pi$  (forme de T) avec Phe345;  $\pi$ -sigma avec Met213 du Lepidine E.

De plus, de ces interactions hydrophobes, nous avons enregistré des liaisons  $\pi$ -  $\pi$  empilés avec Phe125 et  $\pi$ -soufre avec Met213. La meilleure position d'amarrage et la plus répétée est présentée dans la figure 26 pour la Lepidine B (38%) et la Lepidine E (52%).

**Tableau 13.** Les résultats des interactions entre les composés (Lépidine B et E) et les 4 enzymes.

| Enzyme                                                     | Alcaloïde  | Taux de répétition % | Energie de liaison libre (kcal mol <sup>-1</sup> ) | Résidus proches                                                                                              | Interactions hydrophobes                                                                                   | Liaison hydrogène                    | longueur(Å)                  |
|------------------------------------------------------------|------------|----------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Lipase de <i>C. rugosa</i> (LCR)                           | Lépidine B | 38                   | -8.6                                               | Ser209, Phe345, Leu302, Leu304, Met213, Val245, Gly414, Leu413, Leu410                                       | $\pi$ - $\pi$ forme de T ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ -sigma                                               | -                                    | -                            |
|                                                            | Lépidine E | 52                   | -10.4                                              | Ala210, Phe125, Met213, Leu302, Leu304, Gly414, Leu413, Leu410, Ser365, Tyr361                               | $\pi$ - sulfur ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ -sigma ;<br>$\pi$ - $\pi$ empliée                              | -                                    | -                            |
| Serine/threonine phosphatase de <i>C. albicans</i> (StPCA) | Lépidine B | 80                   | -6.6                                               | Arg386, Tyr299, Trp371, Val295, Val298, Val388,                                                              | $\pi$ - cation ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ -sigma ;<br>$\pi$ - $\pi$ stacked                              | MLI504                               | 2.04                         |
|                                                            | Lépidine E | 32                   | -6.4                                               | Arg261, Tyr299, Arg386, Trp371, MLI504                                                                       | $\pi$ - cation ;<br>$\pi$ - anion<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ - $\pi$ forme de T                            | -                                    | -                            |
| Phosphomannose isomerase de <i>C. albicans</i> (PMICA)     | Lépidine B | 68                   | 9.6                                                | Lys136, Met296, Glu138, Val302, Arg304, Tyr130, Asn129, Glu294, Gln111                                       | $\pi$ - cation ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ - $\pi$ forme de T ; $\pi$ -sulfur                             | Gln111<br>HOH732<br>Val302<br>Arg304 | 2.42<br>2.06<br>2.26<br>2.08 |
|                                                            | Lépidine E | 52                   | 11.8                                               | Met296, Glu294, Lys100, Gln111, Zn <sup>2+</sup>                                                             | $\pi$ - cation ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ - $\pi$ forme de T ; $\pi$ -anion                              | Lys100<br>Zn <sup>2+</sup>           | 1.99<br>2.60                 |
| Sterol 14-alpha demethylase (CYP51) de <i>C. albicans</i>  | Lépidine B | 62                   | -8.5                                               | Leu87, Leu88, His377, Pro230, Tyr505, Leu108, Arg304, Asp300, HOH648, HOH673, Val302, Arg304, Tyr130, Asn129 | $\pi$ - $\pi$ forme de T ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ -sigma                                               | His377<br>Tyr505<br>Val302<br>Arg304 | 2.47<br>2.21<br>2.52<br>2.16 |
|                                                            | Lépidine E | 46                   | -8.7                                               | Leu376, Met508, Leu121, Phe233, Pro230, Leu87, Met92, Phe380, Tyr401                                         | $\pi$ - $\pi$ forme de T ;<br>$\pi$ -alkyl ;<br>$\pi$ -sigma ; $\pi$ -<br>$\pi$ empilée;<br>$\pi$ - sulfur | Met508                               | 2.37                         |

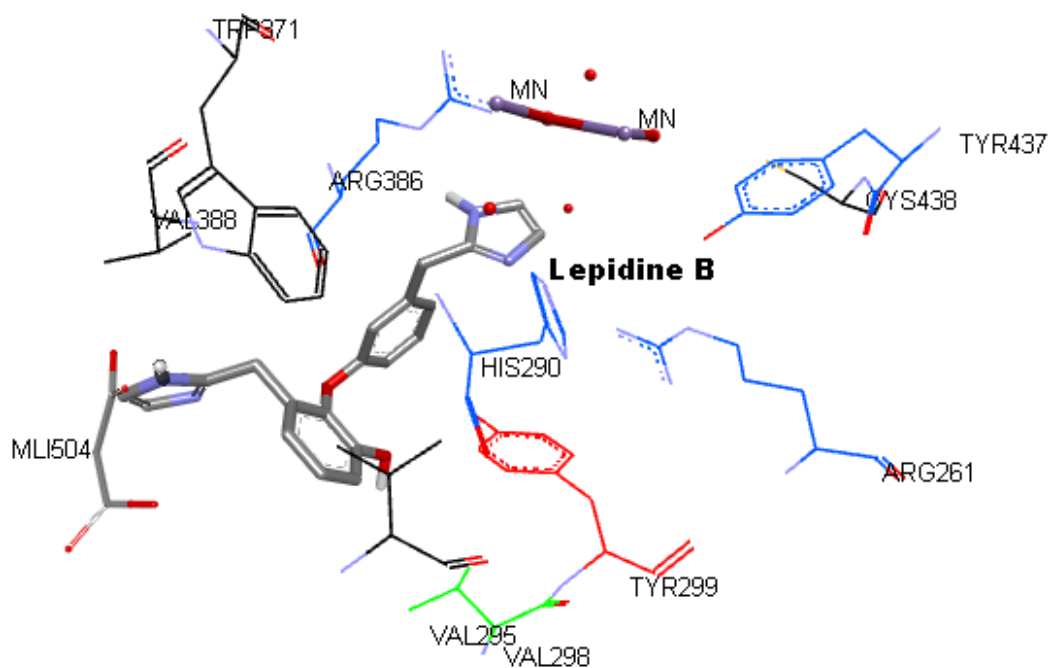


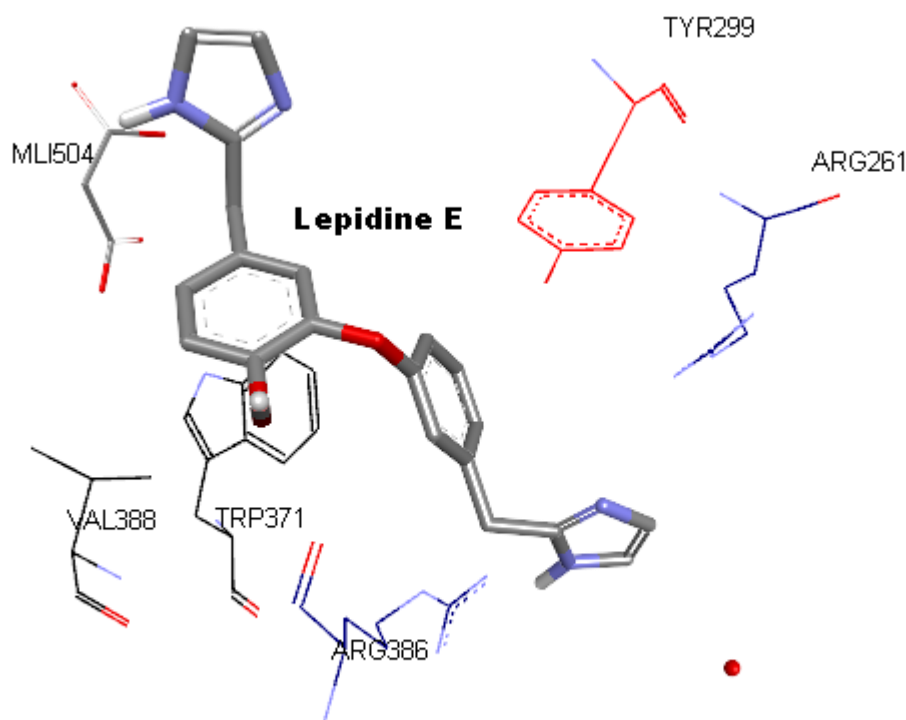
**Figure 25.** Représentation de la meilleure pose d’amarrage de la Lepidine B & E avec le site actif de la lipase de *Candida rugosa*. Lepidine B & E est illustré en gris. Le ligand est représenté sous forme de bâtonnets. Les différents sous-sites du site actif ont été colorés : triade catalytique en rose, trou d’oxyanion en bleu, poche de liaison acyle en vert.

### 5.2. La Serine/threonine phosphatase de *C. albicans* (StPCA)

Cette enzyme avec PDB ID : 5JPF (Chen *et al.*, 2016), la position du docking la plus répétée est avec un rapport de 80% de Lepidine B et 32% de Lepidine E. Nous avons constaté que la lépidine B se lie étroitement dans la cavité catalytique plus que la lépidine E. Aucune liaison hydrogène pour les deux ligands n'a été trouvée, sauf avec le ligand MLI504 avec distance interatomique (ID) = 2,04 Å.

La lépidine B se lie avec des interactions hydrophobes de différents types:  $\pi$ -alkyle avec Arg386, Val295 et Val298;  $\pi$ -sigma avec Val388,  $\pi$ - $\pi$  empilé avec Trp371. La plupart d'entre eux se forment entre les groupes imidazole et benzène de la lépidine B. Pour la lépidine E, moins d'interactions sont observées entre les groupes imidazole et benzène avec ces acides aminés : Arg386 ( $\pi$ -alkyle) et Trp371 ( $\pi$ - $\pi$  en forme de T). La meilleure position d'amarrage et la plus répétée est présentée dans la figure 27 pour la lépidine B & E.



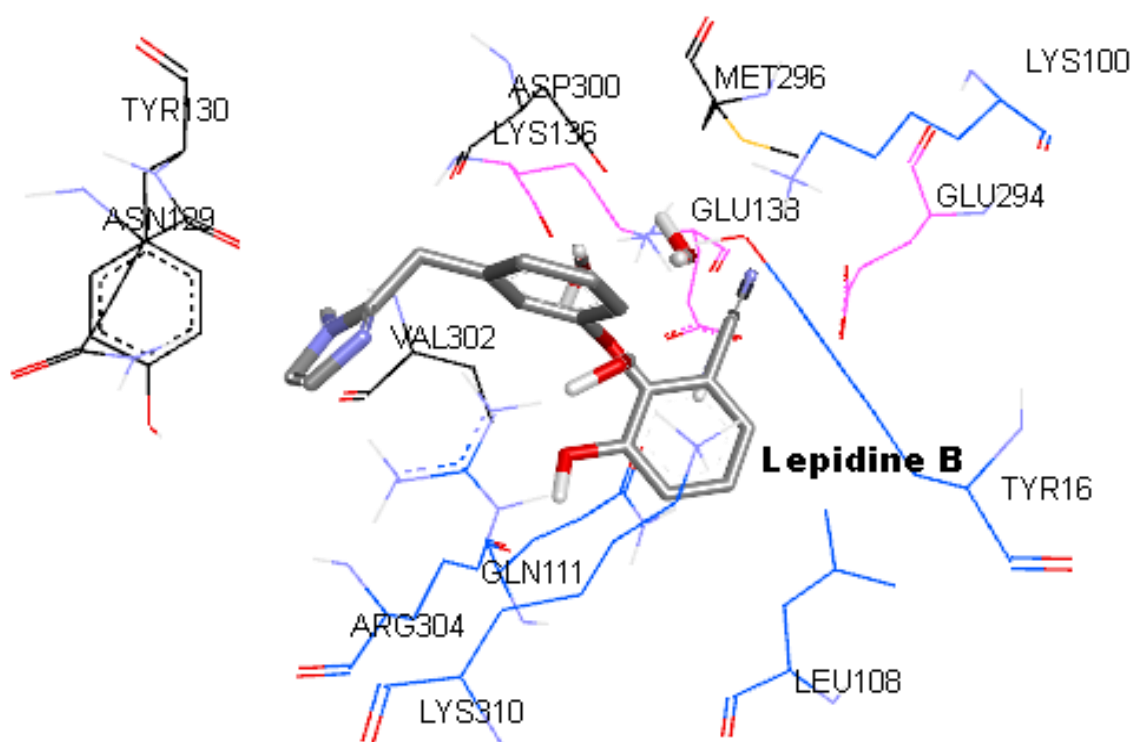


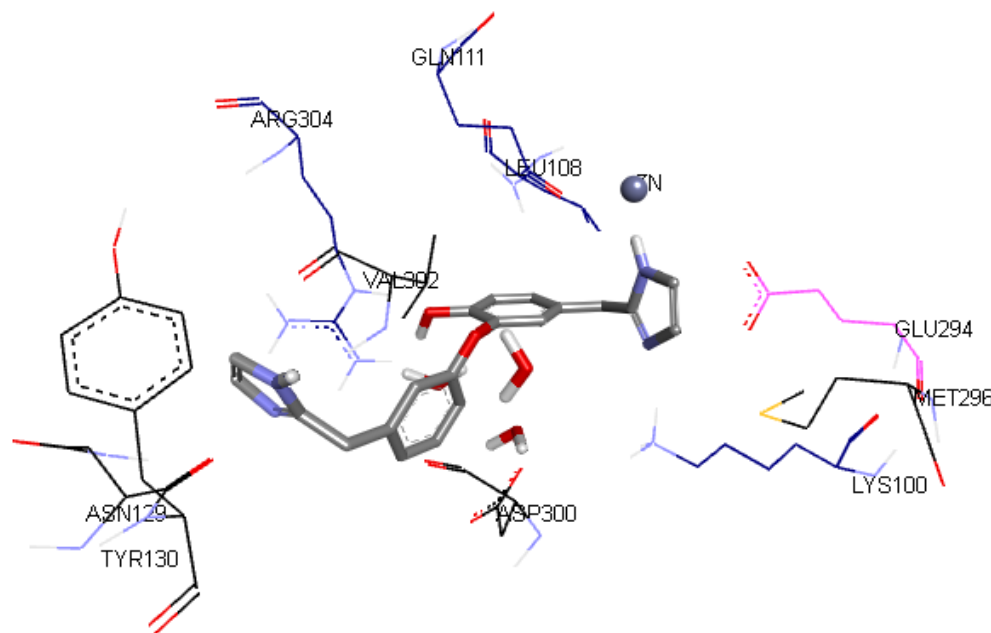
**Figure 26.** Représentation de la meilleure pose d’amarrage de la lépidine B & E sur le site actif de la Serine/threonine phosphatase de *C. albicans*. Lepidine B & E est illustré en gris. Le ligand est rendu sous forme de bâtonnets. Les différents acides aminés du site actif ont été colorés : triade catalytique en rouge, site périphérique en bleu, poche de liaison acyle en noir.

### 5.3.Phosphomannose isomerase de *C. albicans* (PMICA)

L’enzyme avec PDB ID:5NW7 (Ahmad *et al.*, 2018). Le complexe PMICA-lepidine B, avec un taux de répétition de 68%, nous avons enregistré les deux types d’interactions : liaisons hydrogène et interactions hydrophobes. Cinq liaisons hydrogènes ont été trouvées, la première est avec C = O de Gln111 et le NH du premier cycle imidazole dans le ligand ; Deuxièmement, l’atome d’oxygène de la lépidine B et la molécule d’eau HOH732 avec un ID de 2,06 Å ; Troisièmement, le cycle benzénique du ligand et les trois molécules d’eau: HOH (648, 673, 732). Quatrièmement, NH du deuxième cycle imidazole avec C = O de Val302 ; Cinquièmement, le même groupement avec NH<sub>2</sub> de Arg304. La lépidine B se lie étroitement aux interactions hydrophobes de différents types :  $\pi$ -soufre avec Met296,  $\pi$ -alkyle avec Leu108 & Val302,  $\pi$ - $\pi$  en forme de T avec Tyr16 & Tyr130 et  $\pi$ -cation avec Lys310.

Pour le complexe (PMICA) -Lépidine E avec un taux de répétition de 52%, diverses interactions ont été décrites, comme hydrophobe, hydrogène et métal ( $Zn^{2+}$ ) avec différents acides aminés. Quatre liaisons hydrogènes se forment comme suit : NH du cycle imidazole de la lépidine E avec  $NH_2$  de Lys100 avec ID = 1,99 Å°; le même groupe avec C = O de Gln111 avec ID = 2,77 Å°; NH du deuxième groupe imidazole avec C = O de Val302 et NH d'Arg 304 avec IDs = 2,52 et 2,16 Å°, respectivement. Une interaction métallique a été enregistrée pour le NH du premier groupe imidazole de lépidine E avec  $Zn^{2+}$  avec ID = 2,60 Å°. Le  $\pi$ -soufre a été trouvé avec Met296 et le groupe imidazole du ligand ; le même groupe interagit avec Tyr130 comme  $\pi$ - $\pi$  en forme de T,  $\pi$ -alkyle est représenté entre le cycle benzénique et ces acides aminés Leu108, Gln111 & Arg304. La meilleure position d'amarrage et la plus répétée est illustrée dans la figure 28 pour la lépidine B & E.





**Figure 27.** Représentation de la meilleure pose d'amarrage de la lépidine B & E sur le site actif de la phosphomannose isomerase de *C. albicans*. Lepidine B & E est illustré en gris. Le ligand est rendu sous forme de bâtonnets. Les différents acides aminés du site actif ont été colorés : triade catalytique en rose, site périphérique en bleu, poche de liaison acyle en bleu.

#### 5.4. Stérol 14-alpha diméthylase de *C.albicans* (CYP51)

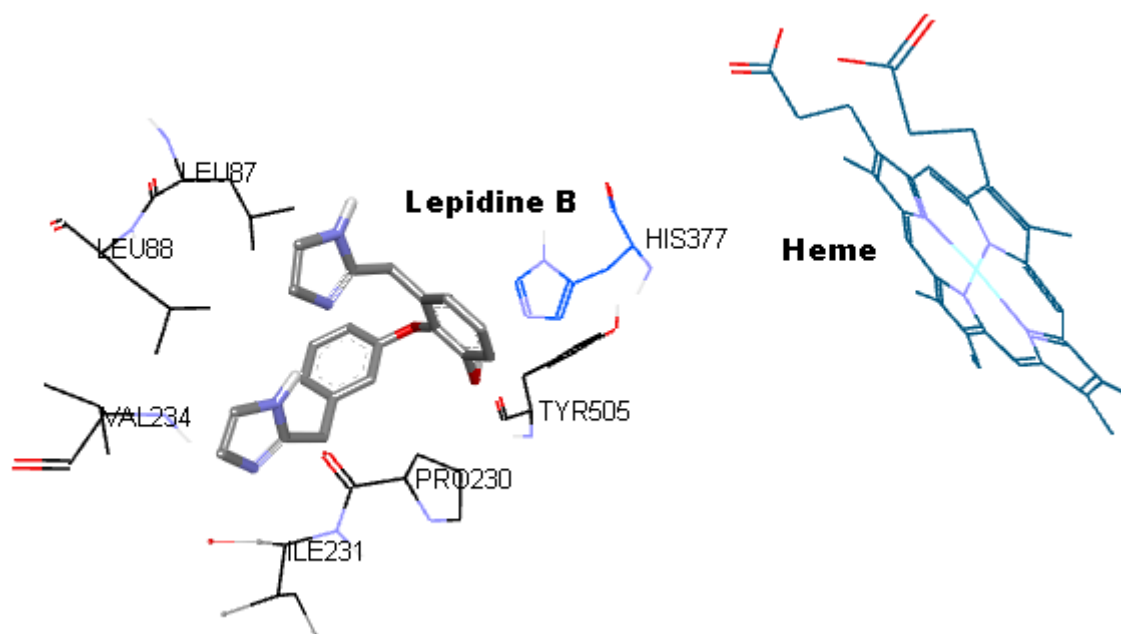
L'enzyme est caractérisée par un PDB ID : 5FSA (Hargrove *et al.*, 2017). Les simulations d'amarrage montrent pour les complexes Stérol 14-alpha diméthylase de *C. albicans*-lepidine B & E moins d'interactions que les autres complexes précédents avec un taux de répétition pour la meilleure position d'amarrage pour lepidine B 62% et lepidine E 46%.

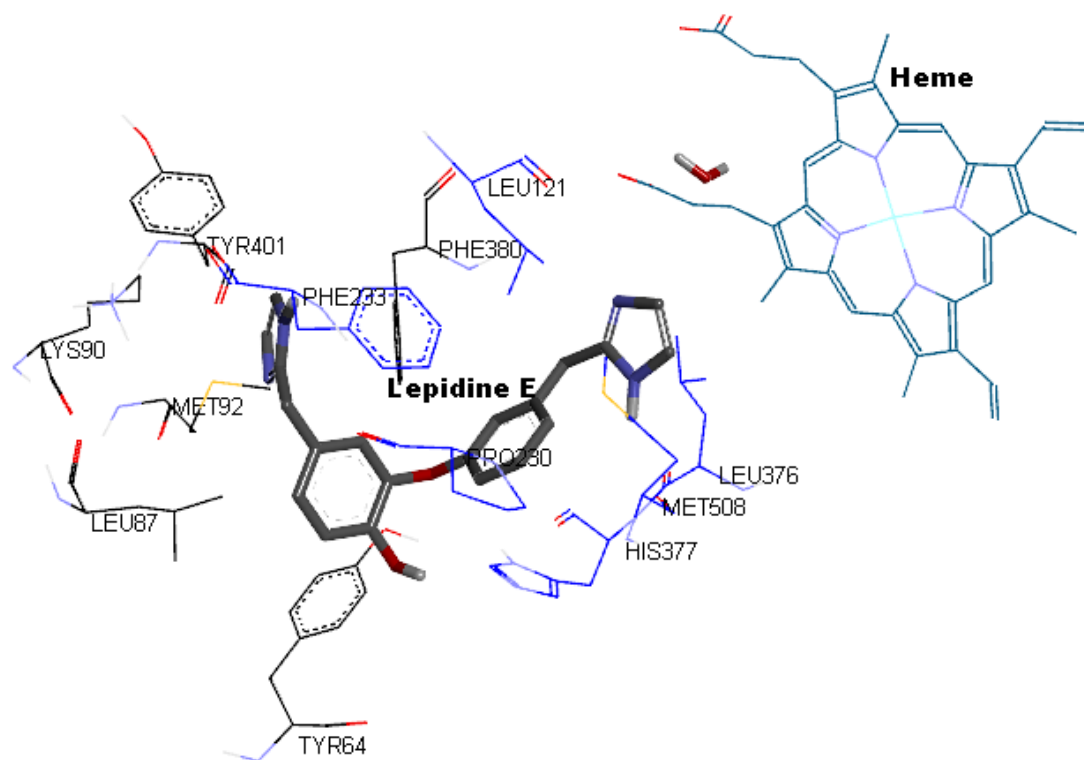
La lépidine B est étroitement liée aux acides aminés de la cavité catalytique par le biais de liaisons hydrogènes qui se forment entre le groupe imidazole du ligand et N de His377 et C=O de Tyr505 avec des valeurs ID de 2,47 Å et 2,21 Å, respectivement.

De nombreuses interactions hydrophobes se sont installées à travers le site actif avec ces acides aminés Leu87 ( $\pi$ -sigma) ; Leu 88, Pro230, Ile231 & Val234 ( $\pi$ -alkyle) et His377 ( $\pi$ - $\pi$  en forme de T). Aucun type d'interaction n'a été trouvé avec le groupement hème lié à cette enzyme.

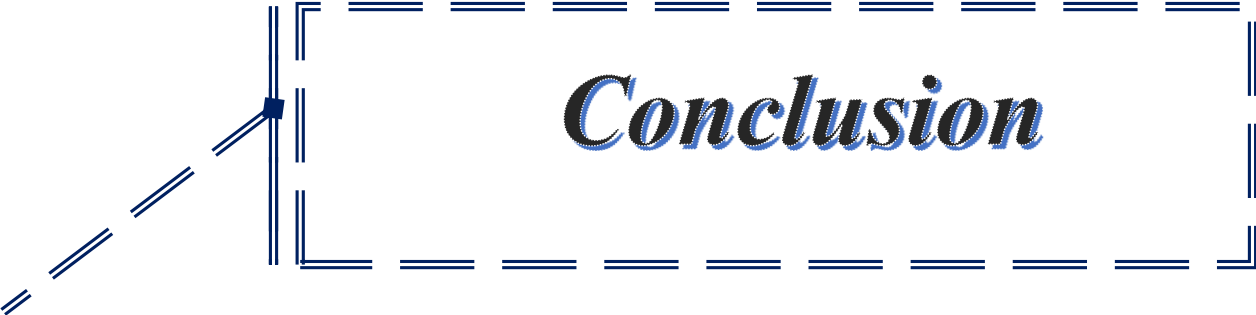
En général, des interactions un peu différentes sont enregistrées pour la lépidine E, nous décrivons ici les interactions hydrophobes trouvées entre les groupes imidazole et benzène avec ces acides aminés : Leu376 & Leu121 ( $\pi$ -sigma) ; Met508, Pro230 & Leu87 ( $\pi$ -alkyle),

Phe233 & Tyr401 (en forme de  $\pi$ - $\pi$  T); Met508 & Met92 ( $\pi$ -soufre); Phe233 & Phe380 (empilés  $\pi$ - $\pi$ ). Une liaison hydrogène a été trouvée entre NH du groupe imidazole du ligand et C = O de Met508 avec une valeur de ID : 2,37Å °. La meilleure position d'amarrage et la plus répétée est présentée dans la figure 29 pour la lépidine B & E.





**Figure 28.** Représentation de la meilleure pose d'amarrage de la lépidine B & E sur le site actif de la Stérol 14- $\alpha$  diméthylase de *C. albicans*. Lepidine B & E est illustré en gris. Le ligand est rendu sous forme de bâtonnets. Les différents acides aminés du site actif ont été colorés : triade catalytique en bleu, poche de liaison acyle en noir.



***Conclusion***

Les produits naturels restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence *in vitro* et *in silico* les propriétés antifongiques des extraits d'hexane, d'acétate d'éthyle et alcaloïdes des espèces suivantes : *Lepidium sativum*, *Punica granatum*, *Atriplex halimus* et *Inonotus hispidus* qui sont utilisées en phytothérapie.

À l'aide de deux solvants d'extraction (d'acétate d'éthyle et hexane), plus un protocole expérimental appliqué pour la première fois dans cette étude visant l'extraction d'un groupe de métabolites secondaires important : les alcaloïdes, nous avons pu obtenir trois types d'extraits. La variation des teneurs obtenues est en fonction des espèces, la partie de la plante traitée en elle-même et le protocole d'extraction suivi.

L'activité antifongique a été déterminée sur quatre souches de l'agent pathogène *C.albicans* selon la méthode de microdillution et à l'aide du INT comme révélateur de croissance microbienne. Les résultats indiquent que la majorité des produits naturels testés possèdent une activité antimicrobienne, surtout contre la *C. albicans* M2 et M3, où nous avons enregistré une CMI à 0,125 mg/ml avec l'extrait AC de l'espèce *I.hispidus* tandis que les extraits de *L.sativum* ont montré les valeurs de CMI les plus faibles dans ce groupe d'extraits .

D'une façon générale, l'activité antimicrobienne est en relation avec la souche testée, la concentration de principe actif et de la nature du solvant ou la méthode d'extraction.

La deuxième étape dans l'étude *in vitro* des activités biologiques de ces extraits était de tester l'effet inhibiteur contre la lipase de *Candida rugosa*, une enzyme joue un rôle clé dans le mécanisme de virulence des souches pathogènes *C.albicans*. De ce fait, le test est réalisé sur microplaque donnant après traitement de résultats les valeurs des IC<sub>50</sub> qui ont montré le pouvoir inhibiteur le plus puissant avec l'extrait AK3 de *P.granatum* (0,7mg), suivi de celui de l'extrait AC d'*I.hispidus* (1,1mg) et finalement l'extrait HX de *L.sativum* (1,4mg).

Pour tester plus de molécules et essayer de proposer un modèle d'inhibition en utilisant l'outil informatique, l'étude *in silico* était nécessaire sur deux molécules classées comme alcaloïdes des graines de la plante *L.sativum* : Lepidine B et Lepidine E à fin d'avoir une idée sur la complexité de ces deux ligands sur quatre enzymes clé dans la vie des cellules de *C.albicans* : Lipase, Serine/thréonine phosphatase, phosphomannose isomérase et sterol-14alpha diméthylase.

Une très grande affinité molécule inhibitrice/ enzyme était trouvé à l'aide du logiciel AutoDock Vina avec des variations dans le type de liaisons et l'énergie libre engendrée par ce couplage.

Dans cette étude il a été prouvé pour la première fois que les lépidines E et B sont actives contre quatre enzymes sécrétées par les cellules fongiques.

A la fin et comme perspectives, nous suggérons des études complémentaires afin

- D'exploiter les résultats de l'étude *in silico* car un résultat fort et positif obtenu pourrait être un outil puissant pour les concepteurs de médicaments et nous espérons que nos recherches pourraient être utiles pour comprendre les mécanismes d'inhibition des molécules naturelles sur les enzymes.
- L'isolement et l'identification des molécules bioactives des espèces étudiées ;
- Etudier *in vivo* les effets de ces molécules sur l'agent pathogène et procéder à une expérimentation pharmacologique approfondie.
- Tester les composés inhibiteurs sur d'autres souches pathogènes du genre *Candida*.



*Références  
bibliographiques*

## A, B

- **Ahmad, L.** ; Plancqueel, S. ; Dubosclard, V. ; Lazar, N. ; Ghattas, W. ; Li de la Sierra!Gallay, I., ... & Salmon, L. (2018). Crystal structure of phosphomannose isomerase from *Candida albicans* complexed with 5!phospho!d!arabinonhydrazide. *FEBS letters*, , 592(10), 1667- 1680. doi :10.1002/1873-3468.13059.
- **Ahmad, R.**; Mujeeb, M.; Anwar, F.; Husain, A.; Ahmad, A.; Sharma, S. (2015) Pharmacognostical and phytochemical analysis of *Lepidium sativum* L. seeds. *International Current Pharmaceutical Journal*, 4(10), 442-446.
- **Akpan .A et Morgan R.** (2002). Oral candidiasis. *Postgard Medical journal*, 78, 455-459.
- **Alqahtani, F. Y.**, Aleanizy, F. S., Mahmoud, A. Z., Farshori, N. N., Alfaraj, R., Alsheddi, E. S., & Alsarra, I. A. (2018). Chemical composition and antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Lepidium sativum* seed oil. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- **Amarti, F.**, El Ajjour, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah.A., Khia, A., Guedira, M et Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydant de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, 9(3), 149-157.
- **Ameen, M.**, Lear, J. T., Madan, V., Mohd Mustapa, M. F., & Richardson, M. (2014). British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. *British Journal of Dermatology*, 171(5), 937-958.
- **Amouri . I.**, Abbes .S., Sellami. H., Makni. F., Sellami .A., et Ayadi .A.( 2010). La candidose vulvovaginale .*Mycologie médicale*, 20, 108-115.
- **Anaissie. E.**( 1992). Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review .*clinical infections diseases*, 14, 43-53.
- **Anaissie.E.**, Bodey.G.P., Kantarjian.H., Vertivarian.R., Hopher.R., Hoy.J et Rolston. K.( 1989). New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Reviews of infectious diseases*, 11, 369-378.
- **Anane, S.**, Kaouech, E., Zouari, B., Belhadj, S., Kallel, K., & Chaker, E. (2010). Les candidoses vulvovaginales : facteurs de risque et particularités cliniques et mycologiques. *Journal de mycologie médicale*, 20(1), 36-41.
- **Angelini, P.**, Girometta, C., Tirillini, B., Moretti, S., Covino, S., Cipriani, M., ... & Cruciani, G. (2019). A comparative study of the antimicrobial and antioxidant activities of *Inonotus hispidus* fruit and their mycelia extracts. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 768-783.
- **Anibal, P. C.**, Peixoto, I. T. A., Foglio, M. A., & Höfling, J. F. (2013). Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 839-848.
- **Ansari, M. A.**, Anurag, A., Fatima, Z., & Hameed, S. (2013). Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. *Microb*, 189-95.

- **Arendrup, M. C.** (2014). Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical microbiology and infection*, 20, 42-48.
- **Arif, T.;** Bhosale, J.D. ; Kumar, N. ; Mandal, T.K. ; Bendre, R.S. ; Lavekar, G.S. ; Dabu, R. (2009). Natural products – antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, Taylor and Francis, 11(7), 621–638.
- **Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie.** (2014). Candidoses. UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone, 15P.
- **Awadh Ali, R.A.A.** Mothana, A. Lesnau, H. Pilgrim, U. Lindequist (2003). Antiviral activity of *Inonotus hispidus*, *Fitoterapia* 74 483–485.
- **Baba Aissa, F.** (1999). Encyclopédies des plantes utiles. Librairie moderne-Rouiba, Alger, p188-261.
- **Baillie.G.S., et Douglas.L.J.** (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 397-403.
- **Balouiri, M.,** Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- **Barelle. C.J.,** Richard. M.L., Gaillardin. C., Grow .N.A., et Brown. A.J.( 2006). *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eucaryotic cell*, 5(2), 359-367. Doi:10.1128/Ec:5.2.359-367.
- **Barnett, J. A.** (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21(14), 1141-1193.
- **Bassiri-Jahromi, S.,** Katiraei, F., Hajimahmoodi, M., Mostafavi, E., Talebi, M., & Pourshafie, M. R. (2015). In vitro antifungal activity of various Persian cultivars of *Punica granatum* L. extracts against *Candida* species. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 10(3), e19754.
- **Behrens. G.,** Bocherens. A., et Senn. N. (2014). Prise en charge de la candidose oesophagienne en médecine de premier recours. *Revue Médicale Suisse*. Synthèse, 10, 1072-1078.
- **Belfeki, H.;** Mejri, M.; Hassouna, M. (2016). Antioxidant and anti-lipases activities in vitro of *Mentha viridis* and *Eucalyptus globulus* extracts. *Industrial Crops and Products*, 89, 514-521.
- **Ben-Ami, R.** (2018). Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. *Journal of Fungi*, 4, 97.
- **Benarous, K. ;** Bombarda, I. ; Iriepa, I. ; Moraleta, G. ; Gaetan, H. ; Linani, A. ; Tahri, D. ; Sebaa, M. ; Yousfi, M. (2015). Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. *Bioorg Chem*, 62:1-7.
- **Benarous, K.** Djeridane, A. Kameli, M. Yousfi. (2013). Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxidant activities, *Curr. Enzym. Inhib.* 9 75–82.
- **Benarous, K.;** Salemi, R.; Zakhrouf, H. (2017). In silico and in vitro studies of *Candida rugosa* lipase inhibition using amentoflavone and plantagouanidinic acid from *origanum marjorana* and *Plantago ciliate*. *Pharmacology online*, 2, 205-212.

- **Bencurova, E.,** Gupta, S., Sarukhanyan, E., & Dandekar, T. (2018). Identification of Antifungal Targets Based on Computer Modeling. *J Fungi* (Basel), 4, 4(3).
- **Benhammou, N.,** Bekkara, F. A., & Panovska, T. K. (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie*, 12(12), 1259-1266.
- **Benoit, B.** (2013). Tela Botanica : Base données nomenclature de la flore en France. BDNFF. P4.
- **Berman, H. M.** (2000). "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res* 28(1), 235–242, Jan.
- **Bhandary, S. K.,** Kumari, S., Bhat, V. S., Sharmila, K. P., & Bekal, M. P. (2012). Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. *J Health Sci*, 2(4), 35-8.
- **Bhasin, P.;** Bansal, D.; Punia, A.; Sehrawat, A.R.(2012). Antimicrobial activities of *Lepidium sativum* : Medicinal plant used in folklore remedies in India.. *Journal of Pharmacy Research*, ,5(3),1643-1645.
- **Blackwell, M.** (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438.
- **Bourgou, S.,** Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 48-55.
- **Bousseboua H.,** (2005). *Eléments de microbiologie*, Campus –Club, 303p.
- **Brandt.M., et Ndowa.F.** (2008). Candidose. Manuel- contrôle des maladies transmissibles.Global link for online biomedical expertise, 1-3.
- **Briones, A.T. and Chichioco-Hernandez, C.L.** (2018). Lipase inhibitory activity of *Carica papaya*, *Chrysophyllum cainito*, *Corcorus olitorius*, *Cymbopogon citrates* and *Syzygium cumini* extracts. *Food Research*, 2 (1), 51 – 55.

## T, D

- **Calderone, R. A., & Fonzi, W. A.** (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327-335.
- **Carlile, M. J.,** Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi*. Gulf Professional Publishing.
- **Carrillo-Munoz, A. J.,** Giusiano, G., Ezkurra, P. A., & Quindós, G. (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, 19(2), 130-9.
- **Cassano, A.,** Conidi, C., Drioli, E., 2011. Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *J. Food Eng.* 107, 366–373.
- **Chambers, M. S.,** Rosenthal, D. I., & Weber, R. S. (2006). Radiation-induced xerostomia. *Head & Neck*, 29(1), 58–63.
- **Chandra.J.,**Kuhn.D.M.,Mukherjee.P.K.,Hoyer.L.L.,McCormick.T,et Ghannoum.M.A.(2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida*

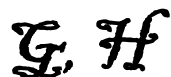
- albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183, 5385-5394.
- **Chatoui, K.**; Talbaoui, A.; Aneb, M.; Bakri, Y.; Harhar, H. and Tabyaoui, M. (2016). Phytochemical Screening, Antioxidant and Antibacterial activity of *Lepidium sativum* seeds from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*, 7 (8), 2938-2946.
  - **Chen, E.** ; Choy, M. S. ; Petrényi, K. ; Kónya, Z. ; Erdődi, F. ; Dombrádi, V. ; ... & Page, R. (2016). Molecular insights into the fungus specific serine/threonine protein phosphatase Z1 in *Candida albicans*. *MBio*, , 7(4).
  - **Chikhi, I., H.** Allali, M.E.A. Dib, H. Medjdoub and B. Tabti, (2014). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 4: 181-184.
  - **Cowan M. M.**, (1990). Plant Products as Antimicrobial Agents. *American Society for Microbiology, Clinical microbiology* , 12, 564-582.
  - **Croteau, R.**, Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
  - **Cygler, M., & Schrag, J. D.** (1999). Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2-3), 205-214.
  - **Da Silva, P. M.**, de Moura, M. C., Gomes, F. S., da Silva Trentin, D., de Oliveira, A. P. S., de Mello, G. S. V., ... & de Figueiredo, R. C. B. Q. (2018). PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *International journal of biological macromolecules*, 108, 391-400.
  - **Dahham, S. S.**, Ali, M. N., Tabassum, H., & Khan, M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 9(3), 273-281.
  - **Dai, Y. C.** (2010). Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity*, 45(1), 131-343.
  - **de Repentigny, L.**, Lewandowski, D., & Jolicoeur, P. (2004). Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 729-759.
  - **de Ruyck, J.**, Brysbaert, G., Blossey, R., & Lensink, M. F. (2016). Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 9, 1.
  - **De Silva, D. D.**, Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Alias, S. A., & Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1-40.
  - **Develoux, M., et Bretagne, S.** (2005). *Candidoses et levures*. EMC (Elsevier SAS, Paris) *Maladies infectieuses*, 8-602-A-10.
  - **Dhamgaye, S.**, Devaux, F., Vandeputte, P., Khandelwal, N. K., Sanglard, D., Mukhopadhyay, G., & Prasad, R. (2014). Molecular mechanisms of action of herbal antifungal alkaloid berberine, in *Candida albicans*. *PloS one*, 9(8).
  - **Doddanna, S. J.**; Patel, S.; Sundarrao, M.A.; Veerabhadrappe, R.S. (2013). Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 24, 401-405.

- **Doke, S. and Guha, M.** (2014). Garden cress (*Lepidium sativum* L.)Seed - An Important Medicinal Source: A Review. *J. Nat. Prod. Plant Resou,r*, 4 (1), 69-80 .
- **Drouhet, E., & Dupont, B.** (1979). Mycoses iatrogènes à localisation profonde dues à des champignons levuriformes opportunistes. *Dermatology*, 159(1), 94–112.
- **Dujon, B.** (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), 512.

## E, F

- **Eggimann, P., & Pittet, D.** (2002). Candidoses en réanimation. *Réanimation*, 11(3), 209-221.
- **El Hilal.F., et Ben akila, F.,** (2015). Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système resteapiratoire dans le plateau central Marocain. *Journal of animal and plant sciences*. 25,2 ; 3886-3897.
- **El Souda, S. S. E. D., Matloub, A. A., Nepveu, F., Valentin, A., & Roques, C.** (2015). Phenolic composition and prospective anti-infectious properties of *Atriplex lindleyi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(10), 786-791.
- **El-Ebiary, M.,** Torres,A., Fabregas, N., De la Bellacasa, J.P., Gonzalez, J., Ramirez,J., et Jiménez,M.T. (1997). Significance of the isolation of candida species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic pateints : an immediate postmortem histologic study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(2), 583-590.
- **Ellis. M.E.,** AL-Abdely. H., Sandridge.A., Greer.W., et ventura.W. (2001). Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clinical infectious diseases*, 32, 50-62.
- **Endo, E. H.,** Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, 161(7), 534-540.
- **Erdemoglu, N.,** Ozkan, S., & Tosun, F. (2007). Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochemistry Reviews*, 6(1), 197-201.
- **Euzéby.J.** (2008). Le Grand dictionnaire illustre de parasitologie médicale et vétérinaire. Editions médicales inter nationales. Paris.
- **Ferreira, L. G.,** Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421.
- **Fischer, J.F.,** Chew W.H., et Shadomy .S. (1982). Urinary tract infections due to *Candida albicans*. *Rev Infect Dis*; 4:1107–18.
- **Flattery.A.M.,**Abruzzo.G.K., Charles.J.G., Jeffrey.G.S., et Baryizal.k . (1996). New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD41t-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents. *Antimicrob-Agents chemother*. 40, 1604-1609.

- **Forche, A.**, Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A. D., Berman, J., & Bennett, R. J. (2008). The Parasexual Cycle in *Candida albicans* Provides an Alternative Pathway
- Gacser, A.; Stehr ; Kroger, C.; Kredics, L.; Schafer, W.; Nosanchuk, J. D. Lipase 8 Affects the Pathogenesis of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 2007,10, 4710–4718.



- **Geniaux.M.** (1996). Infections cutanéomuqueuses à *Candida albicans* : épidémiologie, diagnostic, traitement. La revue du praticien. 46, 350-354.
- **Gerald.M.C.**(2015). Le beau livre de la biologie. Dunod. Paris.528p.
- **Gilleece. A., et Fenelon.L.** (2000). Nosocomial infective endocarditis. Journal of Hospital infection, 46, 83-88.
- **Golecka, M.**, Oldakowska-Jedynak, U., Mierzwińska-Nastalska, E., & Adamczyk-Sosińska, E. (2006). Candida-Associated Denture Stomatitis in Patients After Immunosuppression Therapy. Transplantation Proceedings, 38(1), 155–156.
- **Gow, N. A. .** (2002). Candida albicans Switches Mates. Molecular Cell, 10(2), 217–218.
- **Gow, N. A.**, Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2012). Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nature Reviews Microbiology, 10(2), 112.
- **Grochulski, P.**; Bouthillier, F.; Kazlauskas, R. J.; Serreqi, A. N .; Schrag, J. D., Ziomek, E.; Cygler, M. (1994). Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. Biochemistry, , 33(12), 3494-3500.
- **Guar.J.**, Grene.J., et Stchigal.A.M.(1999). Developments in fungal taxonomie. Clin microbiol rev.12, 454-500.
- **Guillot, J., & Dannaoui, E.** (2016). La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*.
- **Guillot, J., et Dannaoui. E.**(2015). La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. Bull académie – veterinaire de France .168 (4), 314-319.
- **Gwee, P. S.**, Khoo, K. S., Ong, H. C., & Sit, N. W. (2014). Bioactivity-guided isolation and structural characterization of the antifungal compound, plumbagin, from *Nepenthes gracilis*. Pharmaceutical biology, 52(12), 1526-1531.
- **Hadjadj, S.**, Bayoussef, Z., El Hadj-Khelil, A. O., Beggat, H., Bouhafs, Z., Boukaka, Y., ... & Tey, M. (2015). Ethnobotanical study and phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine in the Northeastern Sahara of Algeria (area of Ouargla). J Med Plants Res, 9, 1049-59.
- **Handa ,S.S.**(2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. International centre for science and high technology. Trieste. Italy. P21.
- **Hargrove, T. Y.**; Friggeri, L.; Wawrzak, Z.; Qi, A.; Hoekstra, W.J.; Schotzinger, R.J. ; York, J.D.; Guengerich, F.P.; Lepesheva, G.I. (2017). Structural Analyses of *Candida albicans* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Complexed with Azole Drugs Address

the Molecular Basis of Azole-mediated Inhibition of Fungal Sterol Biosynthesis. *J Biol Chem*;292(16): 6728–6743

- **Harley, J.P. and Prescott, L.M.** (2002) Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Edition, The McGraw-Hill Companies.
- **Hart, T. et Shears P.,** (1999). Atlas de poche de microbiologie. *Ed. Flammarion Medecine-sciences. France. 310p.*
- **Haslam, E.** (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2), 205-215.
- **Herre.J.,Marshall.A.S.,Caron.E.,Edwards.A.D.,Williams.D.L.,Schweighoffer.E.,Tubulewicz.V.,Reis esousa.C., Goldan.S et Brown G.**( 2004). D.Dectin -1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* .104. 4038-4045.
- **Horde.P.** (2017). Mycose digestive : candidose intestinale. *Le journal des femmes avec santé médecine.*
- **Hube, B.** (2000). Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contributions to microbiology*, 5, 126-137.
- **Hull, C. M., & Heitman, J.** (2002). Fungal mating: *Candida albicans* flips a switch to get in the mood. *Current biology*, 12(22), R782-R784.
- **Hwang, B., Lee, J., Liu, Q. H., Woo, E. R., & Lee, D. G.** (2010). Antifungal effect of (+)-pinoresinol isolated from *Sambucus williamsii*. *Molecules*, 15(5), 3507-3516.

*J. I*

- **Ibrahim, H. S.,** Mohamed, S. S., Mohamed, E. I., El-din, K., & Al-zahraa, A. (2018). Assessment of the Antifungal Potential of Selected Desert Plant Extracts against Pathogenic Human Fungi. *Egyptian Journal of Microbiology*, 53(1), 95-110.
- **Ingle.S., Kodgire.S., Shiradhane. A., Patil.R et Zore.G.** (2017). Clamydospore specific proteins of *Candida albicans*. *Data*.1-5.
- **Iserin, P.** (2001).Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins, 2<sup>ème</sup>.Larousse-Bordas.335.
- **Ismail, T.;** Nighat Fatima, N.; Muhammad, S.A.; Zaidi, S.S.; Rehman, N.; Hussain, I.; Tariq, N.S.; Amirzada, I.; Mannan, A. (2018). Prioritizing and modelling of putative drug target proteins of *Candida albicans* by systems biology approach. *Biochimica Polonica*, 65(2), 209-218.
- **Jagarlamudi .R.,** Kumar. L., Kochupillai. V., Kapil .A., Banerjee .U., et Thulkar .S. (2000). Infection in acute leukemia: an analysis of 240 febrile episodes. *Med oncol* .17, 111-116.
- **Jahromi, B. S.** (2018). In vivo comparative evaluation of the pomegranate (*Punica granatum*) peel extract as an alternative agent to nystatin against oral candidiasis. *Iranian journal of medical sciences*, 43(3), 296.

- **Jain, C.**, Khatana, S., and Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 10(2): 494-504.
- **Jansen, P.** (2007). *Lepidium sativum*(PROTA). Ressource végétale de l'Afrique tropicale. PROTA Network office Europe, Wageningen university, P.O.Box 341, 6700 AH Wageningen, Netherlands.
- **Javed, S.**, Shahid, A. A., Haider, M. S., Umeera, A., Ahmad, R., & Mushtaq, S. (2012). Nutritional, phytochemical potential and pharmacological evaluation of *Nigella Sativa* (Kalonji) and *Trachyspermum Ammi* (Ajwain). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 768-775.
- **Jones W. P. et Kinghorn A. D.** (2012). Extraction of Plant Secondary Metabolites Natural Products Isolation, *Methods in Molecular Biology*, 864, 342-366.
- **Judd W.S.**, Campbell C.S., Kellogg E.A et Stevens P. (2002). Botanique systématique. De Boeck Université. Paris, Bruxelles.

## K, L

- **Kadeppagari, R.K.** et al. (2015). lipase inhibitors from plants and their medical applications. *Int J Pharm Pharm Sc,I*, 7(1), 1-5.
- **Kanoun, K.**, Abbouni, B., Bénine, M. L., Benmahdi, F. Z., & Marouf, B. (2014). Etude de l'efficacité de l'extrait éthanoïque d'écorces de *punica granatum* Linn sur deux souches phytopathogènes: *Ascochyta rabiei* (PASS.) et *fusarium oxysporum* F.SP. *Radici- Lycopersici*. *European Scientific Journal, ESJ*, 10(12).
- **Karak P.** (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *International journal of pharmaceutical science and research*. 10(4): 1567-1574.
- **Kim, S. ;** Thiessen, P. A.; Bolton, E. E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B A.; Wang, J.; Yu, B.; Zhang, J .; Bryan, S.H.(2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, , 44,1202–1213,.
- **Knoke, M., & Bernhardt, H.** (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses*, 49(4), 283-287.
- Kwapong, A. A.; Stapleton, P.; Gibbons, S. "A new dimeric imidazole alkaloid plasmid conjugation inhibitor from *Lepidium sativum*," *Tetrahedron Lett*, 2018, 59(20). 1952–1954
- **Lamb, D.C.;** Kelly, D.E.; Baldwin, B.C.; Gozzo, F.; Boscott, P.; Richards, W.G.; Kelly, S.L. (1997). Differential inhibition of *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal stereoisomers. *FEMS Microbiology Letters* , , 149 , 25-30.
- **Lawrence.J.R.**, Korber.D.R., Hoyle.B.D., Costerton.J.W., et Caldwell.D.E.(1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173, 6558-6567.

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
- Macheix J.J., Fleurit A. et Sarni-Manchado P. p 2 in Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Tech&Doc.380p.
- Madigan, M., & Martinko, J. (2007). Biologie des micro-organismes. 11<sup>e</sup> édition. Edition Pearson Education. France.
- Mahmoudvand, H., Sepahvand, A., Jahanbakhsh, S., Ezatpour, B., & Mousavi, S. A. (2014). Evaluation of antifungal activities of the essential oil and various extracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone against pathogenic dermatophyte strains. *Journal de mycologie medicale*, 24(4), e155-e161.
- Maier, U. H.; Gundlach, H.; Zenk, M. H. (1998). "Seven imidazole alkaloids from *Lepidium sativum*," *Phytochemistry*, 49(6), 1791–1795
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Seyed, D.N., Mukhtar, H. (2005). Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14813-14818.
- Márkus, B., Szabó, K., Pfliegler, W. P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., ... & Dombrádi, V. (2017). Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. *PloS one*, 12(8).
- Martins, C. ; Carreiras, M.C. ; León, R. ; de los Ríos, C. ; Bartolini, M. ; Andrisano, V. ; Iriepa, I. ; Moraleda, I. ; Gálvez, E. ; García, M. ; Egea, J. ; Samadi, A. ; Chioua, M. ; Marco-Contelles, J. (2011). "Synthesis and biological assessment of diversely substituted furo[2,3- b]quinolin-4-amine and pyrrolo[2,3-b]quinolin-4-amine derivatives, as novel tacrine analogues," *Eur. J. Med. Chem.*, 46(12), 6119–6130.
- Masomi, F.; Hassanshahian, M. (2016). Antimicrobial Activity of Five Medicinal Plants on *Candida albicans*. *Iranian Journal of Toxicology*, 10(6), 39-43.
- Mazza, D. (2011). Women health in general practice .2<sup>ème</sup> edition. Elsevier. Australia. p226.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- Miller, M. G., & Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3), 293-302.
- Mukherjee, P.K., Zhou, G.Y., Munyon, R., Ghannoum, M.A. (2005). *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical Mycology*, 43, 191-208
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(3), 400-428.
- Nasser Ali, R. Jansen, H. Pilgrim, K. Liberra, U. (1996). Lindequist, Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*, *Phytochemistry* 41) 927–929.

- **Nasution, A. I.** (2013). Virulence factor and pathogenicity of *Candida albicans* in oral candidiasis. *World J Dent*, 4(4), 267-271.
- **Nobile .C.J.**, Bruno .V.M., Richard. M.L., Davis .D. A., et Mitchelle. (2003). Genitic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology*. 149, 3629-3637.



- **Ounaissia, K.**, Bennadja, S., Aliane, L., & Djahoudi, A. (2020). Phytochemical screening and anti-bacterial activity of methanolic extracts of the aerial parts of *atriplex halimus* L., from biskra (Algeria). *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 13(1), 26-33.
- **Özdal, M.**, Gülmez, Ö., Özdal, Ö. G., & Algur, Ö. F. (2019). Antibacterial and antioxidant activity of mycelial extracts of different *pleurotus* species. *FOOD and HEALTH*, 5(1), 12-18.
- **Pagadala, N. S.**, Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9(2), 91-102.
- **Pala, S. A.**, Wani, A. H., & Ganai, B. A. (2019). Antimicrobial potential of some wild *Macromycetes* collected from Kashmir Himalayas. *Plant Science Today*, 6(2), 137-146.
- **Pappas, P.G.** (2006). "Invasive candidiasis". *Infect. Dis. Clin. North Am.* 20 (3): 485–506.
- **Patel, A.**, Shadab, K., & Bhise, K. S. (2017). Antifungal and antimicrobial activity of pomegranate peel powder. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 1424-1430.
- **Pereira, C. A.**, Costa, A. C. B. P., Silva, M. P., Back-Brito, G. N., & Jorge, A. O. C. (2015). *Candida albicans* and virulence factors that increases its pathogenicity. *The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs; Microbiology Series*, 631-636.
- **Pereira, T. dos S. F.**, Correia Silva Alves, J. de F., Gomes, C. C., Nascimento, A. R. do, Stoianoff, M. A. de R., & Gomez, R. S. (2014). Kinetics of oral colonization by *Candida spp.* during topical corticotherapy for oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 43(8), 570–575. doi:10.1111/jop.12174
- **Pignatta. V.** (2010). Comment guérir les infections à *candida* : caractéristiques, diagnostics et traitements naturels. Macro éditions. France. P 305.
- **Pihet, M.**, & **Marot, A.** (2013). Diagnostic biologique des candidoses. *Revue francophone des laboratoires*, (450), 47-61.
- **Pilly .E.** (2012). *Maladies infectieuses et tropicales*. 23ème édition. Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales. France. p470
- **Prado, A. C. P.**; da Silva, H S .; da Silveira, S .M .; Barreto, P. L.M.; Vieiraa, C .R. W.; Maraschinc, M.; Ferreirad, S. R.S.; Blocka, J. M. (2014). Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecannut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. *Elsevier, Industrial crops and products*, 52, 552-561.

- **Prajapati, V. D.,** Maheriya, P. M., Jani, G. K., Patil, P. D., & Patel, B. N. (2014). *Lepidium sativum* Linn.: A current addition to the family of mucilage and its applications. *International journal of biological macromolecules*, 65, 72-80.



- **Rahman, S. A.,** Abd-Ellatif, S. A., Deraz, S. F., & Khalil, A. A. (2011). Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *African Journal of Biotechnology*, 10(52), 10733-10743.
- **Rathod, T.,** Padalia, H., & Chanda, S. (2015). The Potential of Plant Extracts against Multidrug Resistant Candida Species: A Review. *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*, 246-256.
- **Rauf, M. A.,** Zubair, S., & Azhar, A. (2015). Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina. *International Journal of Basic and A*
- **Ravindran P.N.** (2017). The Encyclopedia of herbs and spices. CABI. India. P753, P379.
- **Redding, S.W.,** Zellars, R.C., Kirkpatrick, W.R.K., Caceres, M.A., Fothergill, Q.W., Lopez-Ribot, J.L., Bailey, C.W., Rinaldi, M.G., et Patterson, T.F. (1999). Epidemiology of oropharyngeal Candida colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. *Journal of clinical microbiology*, 37, 3896-3900.
- **Richter, S.S.,** Galask, R.P., Messer, S., Hollis, R.J., Diekema, D.J., et Pfaller, M.A. (2005). Antifungal susceptibilities of candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Journal of clinical microbiology*, 43, 2155-2162. Doi : 10.1128/JCM43.5.2155-2162. 2005.
- Rio, J.L.; Recio, M. C.. Medicinal plants and antimicrobial activity. Elsevier, *Journal of ethnopharmacology*, 2005, 100, 80-84.
- Ripert, C. (2013). *Mycologie médicale*. Tec & doc-Lavoisier. 722p.
- Rodin, P., et Kalator, B. (1976). Carriage of yeasts on the penis. *British medical journal*, 1, 1450-1455.
- **Routray, W.** Orsat, V. (2013). Preparative Extraction and Separation of Phenolic Compounds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Natural products, 2014-2037.
- **Roux, C.,** Bhatt, F.; Foret, J.; Courcy, B.; Gresh, N.; Piquemal, J.; Jeffery, C.J.; Salmon, L. (2011). The reaction mechanism of type I phosphomannose isomerases: New information from inhibition and polarizable molecular mechanics studies. *Proteins, Wiley-Liss. Inc.*, 79, 203-220.
- **Rubinstein, E., et Lang, R.** (1995). Fungal endocarditis. *European heart journal*, 16, 84-89.
- **Ruhnke, M.,** eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., engelmann, E., et Trautmann, M. (1994). Emergence of fluconazole-resistance strains of *Candida albicans* in patients

- with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *Journal of clinical microbiology*. 32, 2092-2098.
- **Runge S.M., et Greganti M.A.**(2011). Médecine interne de natter. 2ème édition. Elsevier masson SAS. France. p72.
  - **Sadik, O.;** Gheorghe, I.; Chifiriuc, M.C. (2018). Virulence and pathogenicity aspects in *Candida albicans* infections. *Rev. Biol. Biomed. Sci*, ,1 (1), 11-16.
  - **Salhi, S.,** Fadli, M., Zidane, L., et Douira, A. (2010). Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa*, 31,133.
  - **Sanago, R.** (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle, université Bamako (Mali) : 53.
  - **Sandip, B.G.;** Palak, S.; Mahesh, S. V.; Hitesh, A.S.; Hitesh, P.; Dhanji, R. (2018).Antimicrobial and antimalarial activities of some selected ethno-medicinal plants used by tribal communities of tapi district, GUJARAT, INDIA. *International research journal of pharmacy*, , 9(10), 151-156.
  - **Sardi, J. C. O.,** Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24.
  - **Schaller, M.;** Borelli, C.; Korting, H. C.; Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans* . *Mycoses*, , 48, 365–377.
  - **Schmitt, J.;** Brocca, S.; Schmid, R.D.; Pleiss, J. (2002). Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity, *Protein Eng.*, 15: 595–601.
  - **Seidel, V.** (2012). Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* , ,864,27-41.
  - **Seyedan, A.;** Alshawsh, M.A.; Alshagga, M.A.; Koosha, S.; Mohamed, Z. (2015). Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, , 13p.
  - **Ship, J.A.,** Vissik,A., et Challacombe, S.J. (2007). Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology*, 103(3).
  - **Shukla, A.;** Singh, C. S. ; Bigoniya, P. (2011). “Phytochemical and CNS activity of *Lepidium sativum* Linn. seeds total alkaloid,” *Der Pharm. Lett.*, , 3(2). 226–237.
  - **Silva, S.,** Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2017). *Candida* species biofilms’ antifungal resistance. *Journal of Fungi*, 3(1), 8.
  - **Sotomayor, M., & Schulten, K.** (2007). Single-molecule experiments *in vitro* and *in silico*. *Science*, 316(5828), 1144-1148.
  - **Sudbery .P.E.** (2001) .The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Molecular microbiology*. 41(1), 19-31.
  - **Sugiyama.Y.,** Nakashima.S., Mirbd.F., Kanola.H., Kitajima.Y., et Ghannoum.,M.A. ( 1999).Molecular cloning of a second phospholipase B gene CapLB2 from *Candida albicans* .*Med Mycol*. 37(1) , 61-7.

- **Sum C. W.,** Indieka S. A. et Matasyoh J. C. (2019). Antimicrobial activity of Basidiomycetes fungi isolated from a Kenyan tropical forest. *African journal of biotechnology*, 18(5), 112-123.
- **Taihi .I.,** Millez .S., Ejeil .A., Gaulter .F., et Dridi. S.M. (2012). Candidose buccale : diagnostic et prise en charge. *Clinic Focus*. 73, 30-32.
- **Tammy, L. and Jack S.** (2001). Nosocomial Candiduria: A Review. Division of Infectious Disease, Detroit Medical Center, Wayne State University School of Medicine, Detroit. 32,1602–7.
- Tardivon, J., et Chadouli, M. (2012). Les plante aromatiques et médicinales.20.
- **Teodoro, G. R.,** Ellepola, K., Seneviratne, C. J., & Koga-Ito, C. Y. (2015). Potential use of phenolic acids as anti-Candida agents: a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 1420.
- **Tiwari P.,** Kumar B., Kaur M., Kaur G. et Kaur H.(2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1, 98-106.
- **Torres-Rodríguez, J. M., & López-Jodra, O.** (2000). Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. *Rev Iberoam Micol*, 17, 122-35.
- **Tortora .G.J.,** Funcke.B.R ., et Case.C.L. (2012). Introduction à la microbiologie. 2ème édition. *Pearson. Canada*.
- **Trofa.D.,Gracser.A ., et Nosanchuk.J.D.** (2008).*Candida parapsilosis* ,an emerging fungal pathogen . *clinal Microbiol Rev*.45, 1843-1850.
- **Trott, O.;** Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J Comput Chem.*, (3)1, 455-461.
- **Tsui. C.,** Kong .E.F ., et Jabra-Rizk. M.A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS pathogens and disease*. 74(4), 1-13.
- **Turfan, O ,** Turkylma , M , Yemis, O , Ozkan, M. (2011). Anthocyanin and color changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice from sacs and whole fruit. *Food Chem*. 129, 1644–1651.

*T.W*

- **Vasconcelos, L. C. D. S.,** Sampaio, F. C., Sampaio, M. C. C., Pereira, M. D. S. V., Higino, J. S., & Peixoto, M. H. P. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal*, 17(3), 223-227.
- **Verduyn Lunel, F. M.,** Meis, J. F. G. M., & Voss, A. (1999). Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34(3), 213–220.
- **Viscoli .C.,** Girmenia .C., Marinus .A., Collette. L., Martino. P., Lebau .B., Speance .D., Krcmery .V., Depauw. B.E ., et Meunier. F.(1999). The invasisine fungal infection group of the EORTC: candidemia in cancer pateints a prospective, multicenter surveillance study in Europe by the invasive fungal infection group (IFIG) of the Europeau organization for research and treatment of cancer (EORTC).*Clinical infection disease*. 28, 1071-1079.

- **Voss .A.**, Kluytmans. J.A., Koeleman .J.G., Spanjaard .L., Vandenbroucke –Grauls .C.M., Verbrugh .H.A., Weersink .A.Y., Hoogkamp .K.J ., et Meis J.F.(1996). Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in fine dutch university hospitals. *Eur journal clinical microbial Infection disease*. 15, 909-912.
- **Vukojević, J.**, Hadžić, I., Knežević, A., Stajić, M., Milovanović, I., & Čilerdžić, J. (2016). Diversity of macromycetes in the Botanical Garden “Jevremovac” in Belgrade. *Botanica Serbica*, 40(2).
- **Wadhwa, S.**, Panwar, M.S., Agrawal, A., Saini, N., et Patidar, L.N. (2012). A review on pharmacognostical study of *lepidium sativum*. *Adv Res Pharm biol*, 2(4), 316-323.
- **Walker, D. J.**, Lutts, S., Sánchez-García, M., & Correal, E. (2014). *Atriplex halimus* L.: Its biology and uses. *Journal of arid environments*, 100, 111-121.
- **Wang, Z.**, Sun, H., Yao, X., Li, D., Xu, L., Li, Y., ... & Hou, T. (2016). Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(18), 12964-12975.
- **Web 1.** <https://earth.google.com/>
- **Weerasekera, M. M.**; Wijesinghe, G.K.; Jayarathna, T. A.; Gunasekara, C.P.; Fernando, N.; Kottegoda, N.; Samaranayake, L.P. (2016). Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, , 111, 697-702.
- **Whaley, S. G.**, Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in microbiology*, 7, 2173.
- **Willey, J. M.**, Sherwood, L., & Woolverton, C. (2013). *Prescott's Microbiology* 9th Revised edition.
- **Wingard. J.R.**, Merz.W.G., et Rinaldi.M.G. (1991). Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *The new England journal of medicine*, 325(18), 1274-1277.

YZ

- **Yapo.T. A.**, Adehoss. E., Astier. H. K ., et Bafall. M .(2016). *Epilly trop maladies infectieuses tropicales*. Édition web. Aléa plus, Paris, p398.
- **Yousfi, A.** Djeridane, I. Bombarda, H. Chahrazed, B. Duhem, E.M. Gaydou, (2009). Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*, *Phytother. Res.* 23 1237–1242.
- **Zhang, M.**, Yogesha, S. D., Mayfield, J. E., Gill, G. N., & Zhang, Y. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *The FEBS journal*, 2013, 280(19), 4739-4760.
- **Zia-Ul-Haq, M.**, Ahmad, M., Mehjabeen, J. N., Ahmad, S., Qayum, M., & Marwat, I. K. (2011). Antimicrobial screening of selected flora of Pakistan. *Arch. Biol. Sci*, 63(3), 691-695.

- **Zuzarte, M.,** Vale-Silva, L., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Vaz, S., Canhoto, J., ... & Salgueiro, L. (2012). Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1359-1366



# *Annexe*

## Milieux de cultures.

### PDA :

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Pomme de terre ..... | 200g   |
| Agar .....           | 15g    |
| Saccharose .....     | 10g    |
| Eau distillée.....   | 1000ml |

### Mueller Hinton Agar (MH) :

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Milieu de base (MH) ..... | 38g    |
| Eau distillée .....       | 1000ml |
| pH.....                   | 7,4    |

### Gélose Sabouraud

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Peptone de gélatine ..... | 10g    |
| Glucose .....             | 20g    |
| Agar .....                | 17g    |
| Eau distillée.....        | 1000ml |
| pH .....                  | 5,6    |

### Milieu GYP

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Glucose .....           | 20g    |
| Agar .....              | 20g    |
| Extrait de levure ..... | 5g     |
| Peptone.....            | 10g    |
| Eau distillée.....      | 1000ml |

## Abstract

Candidiasis or infections caused by the pathogen *Candida albicans*, are considered to be a real threat to people with weakened immunity. Currently and in addition to their side effects, antifungal treatments have shown low effectiveness in front of this resistant yeast, therefore researchers have directed their studies to natural sources in order to find more specific, effective alternatives and with less negative action on host cells. To this end, we have identified our objective in two complementary areas. The first part of the work was practical where we started by extracting secondary metabolites from *Lepidium sativum*, *Punica granatum*, *Atriplex halimus* and *Inonotus hispidus*. The test of the antifungal activity of these extracts on four strains of *C. albicans* using the microdilution method by the INT developer revealed the sensitivity of the yeasts which depends on the nature of the extract and its concentration. in the medium (variation of MIC from more than 4 to 0.125mg / ml). To confirm the previous tests, the study of the inhibitory power of *C.rugosa* lipase from bioactive extracts is carried out on a microplate, the result showed the capacity of the majority of extracts to inhibit the activity of half of the enzymes present in the reaction medium with interesting concentrations (IC50 from 2.29 to 0.78 mg / ml). In the second part, we want to propose the mechanism of inhibition exerted by these molecules by using molecular docking of four key enzymes in the metabolism of fungal cells namely Lipase, serine / threonine phosphatase, phosphomannose isomerase and sterol-14alpha demethylase. We confirm that no previous study in this context has been found in the literature, this is the originality of this work. Docking shows the affinity of the molecules for the enzymes tested, which highlights the correlation between the *in vitro* results and those obtained by the *in silico* study.

**Key words:** *Candida albicans*, natural extracts, alkaloids, antifungal activity, enzymatic inhibition, lepidine B, lepidine E, molecular doking.

## ملخص

داء المبيضات أو الالتهابات التي تسببها الممرضات *Candida albicans*، تعتبر تهديدا حقيقيا للأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة. حاليا بالإضافة إلى آثارها الجانبية، أظهرت العلاجات المضادة للفطريات فعالية منخفضة أمام هذه الحجرة المقاومة، وبالتالي فقد قام الباحثون بتوجيه دراساتهم إلى المصادر الطبيعية من أجل إيجاد بدائل أكثر فعالية وبأقل تأثير سلبي على الخلايا المضيفة. تحقيقا لهذه الغاية، حددنا هدفنا في مجالين متكاملين. كان الجزء الأول من العمل عمليا حيث بدأنا باستخراج مواد الايض الثانوية من ثمرة الرمان، سرة البطم، القطف وحب الرشاد. كشف اختبار النشاط المضاد للفطريات لهذه المستخلصات على أربع سلالات *C.albicans* باستخدام طريقة التخفيف الجزئي وكشف INT عن حساسية الخمائر التي تعتمد على طبيعة المستخلص وتركيزه. في الوسط (تباين التركيز المنشط الأدنى من أكثر من 4 إلى 0.125 ملغ / مل). لتأكيد الاختبارات السابقة تم اجراء اختبار القدرة المثبطة لإنزيم الليباز للمستخلصات التي اثبتت نشاطيتها ضد ميكروبية حيث وجدنا ان غالبية المستخلصات المختبرة لها القدرة على تثبيط نشاط نصف كمية الانزيمات في وسط التفاعل بتركيز مهمة ( IC50 من 2.29 الى 0.78 ملغ/مل). في الجزء الثاني، نستخدم الاعلام الالى كأداة لإعطاء نموذج لرسو جزيئي بين أربعة إنزيمات رئيسية في عملية التمثيل الغذائي للخلايا الفطرية (ليباز، وسيرين / ثريونين فسفاتاز، وإيزوميراز فوفومانوز وإستيرول-14alpha ديميتلاز) واثنين من جزيئات قلويدات طبيعية (Lepidine B و Lepidine E معزولة من مستخلص حب الرشاد). يؤكد من خلال هذا العمل انه لم يتم التطرق سابقا الى نفس الدراسة مما يعطي اصلية لهذا البحث. يظهر الإصاق تقارب الجزيئات الخاصة بالأنزيمات التي تم اختبارها، والتي تسلط الضوء على العلاقة بين النتائج في المختبر وتلك التي تم الحصول عليها في دراسة البرمجة الالية.

**الكلمات المفتاحية :** مبيضات، مستخلصات طبيعية، قلويدات، نشاطية مضادة للفطريات، تثبيط انزيمي، Lepidine E، Lepidine B، رسو جزيئي.