

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Microbiologie

Intitulée

**Activité Biologique *in vivo* « Toxicologique et Microbiologique »
de *Marrubium vulgare* L. sur *Candida albicans* isolée des
infections nosocomiales**

Présentée par : M^r CHABANE Mahmoud Adel

Soutenu le 23/02/2021

Devant le jury :

Président	M ^r BELABID Lakhdar	Pr	Université de Mascara
Directrice de thèse	M ^{me} TIR TOUIL Aicha	Pr	Université de Mascara
Examineur	M ^r KHAROUBI Omar	Pr	Université d'Oran 1
Examineur	M ^r KIHAL Mebrouk	Pr	Université d'Oran 1
Examinatrice	M ^{me} BOUNGAB Karima	Pr	Université de Mascara
Examineur	M ^r BERROUKCHE Abdelkrim	Pr	Université de Saida
Invité	M ^r KHELLADI Belkacem	Dr	EPH-Mascara

Année Universitaire : 2020-2021

Hommage

C'est avec une infinie tristesse que nous avons reçu le décès brutal de **Mme GHAZI Kheira**, Professeur à l'Université de Tiaret, le 15 novembre 2020.

J'adresse toutes mes condoléances à la famille et aux proches de **Mme GHAZI Kheira** qui nous a quittés ainsi qu'à la communauté universitaire. Nous avons beaucoup apprécié sa personne et sa vision du monde universitaire. Son décès brutal nous a, comme tous, profondément bouleversés.

En espérant que l'ensemble de ce témoignage puisse leur apporter quelque réconfort.

"إنا لله وإنا إليه راجعون"

Remerciement

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche, Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mustapha Stambouli de Mascara-Algérie sous la direction de **Pr. Aicha Tir Touil**.

Je remercie et exprime toute ma reconnaissance à **Mme Aicha Tir Touil**, Professeur à l'université Mustapha Stambouli de Mascara, pour avoir accepté de diriger ces travaux. Je tiens à exprimer toute ma gratitude pour l'accompagnement et la qualité de l'encadrement assurés durant ces 6 années. Je la remercie de sa confiance spontanément accordée, des nombreux échanges scientifiques et orientations données à ce travail, de sa disponibilité et de son support inconditionnel tout au long de la réalisation de ce travail. Donc un grand merci à mon encadreur pour m'avoir guidé constamment vers la lumière pendant la période de la thèse.

Mes remerciements à **Mr. Belkacem Khelladi**, Médecin en anatomo-pathologie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire : Laboratoire d'anatomo-pathologie, EPH Meslem Taib, Mascara-Algérie. Je le remercie de sa confiance, de l'intérêt porté aux travaux réalisés, de sa disponibilité, de ses précieux conseils qui m'ont guidée dans ce travail et aussi pour sa qualité humaine inestimable.

J'adresse mes remerciements à **Mme Meriem Mokhtar**, Docteur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem-Algérie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils pertinents durant mon travail de thèse et afin de réaliser et d'interpréter les analyses chromatographiques HPLC-DAD-ESI-MS.

Je voudrais remercier **Mr. Boumedienne Meddah**, Professeur à l'Université Mustapha Stambouli, Mascara pour ses grandes qualités humaines et pour son appui à certains moments difficiles de la réalisation de ce travail.

Je remercie tous les membres du jury :

Qu'il me soit permis de remercier vivement **Pr Belabid Lakhdar**, Doyen de la FSNV-Université de Mascara. Vous avez eu la gentillesse de présider le jury de cette soutenance de thèse. Je tiens à vous faire part de ma respectueuse gratitude.

Remerciement

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Mme Boungab Karima**, Professeur à l'Université de Mascara, **Mr Kharoubi Omar**, Professeur à l'Université d'Oran, **Mr Berroukche Abdelkrim**, Professeur à l'Université de Saida et **Mr Kihal Mebrouk**, Professeur à l'Université d'Oran pour m'avoir honoré de leur présence en acceptant d'être les examinateurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Toute ma sympathie va à **Mme Latifa** ainsi qu'à l'ensemble du personnel de la station expérimentale, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Mustapha Stambouli, Mascara. J'ai été sensible à leur accueil, leur convivialité, leur disponibilité, leur esprit de responsabilité et ai beaucoup apprécié l'ambiance chaleureuse entretenue dans le laboratoire.

J'adresse l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance à **Mr Oussama Touhami** et **Mr Adda Berkane**, Docteurs Vétérinaires d'avoir m'aidé dans le sacrifice des rats y compris leurs conseils en manipulant avec les rats sur le plan : entretien, bien être de l'animal...

Je remercie également **Dr Abelrrahim Bekkadouri** et **Mr Djelloul** responsables des laboratoires de la faculté SNV, Université de Mascara ainsi que tous le personnel « laborantins et laborantines » pour avoir mis à disposition, un nombre conséquent de verreries, matériels, équipements et produits d'essais, trop souvent demandés sur des délais très courts.

J'adresse également mes vifs remerciements à **Mme Salima Benhouhou**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), Alger-Algérie pour l'identification botanique de notre plante. Merci pour vos qualités humaines qui m'ont impressionné.

Je remercie également **Mr Ahmed Megharbi**, Docteur au Centre Universitaire Ahmed Zabana, Rélizane-Algérie pour son aide pour l'interprétation des analyses statistiques.

Ma reconnaissance est adressée à **Mr Mohamed Bendaha**, Docteur à la Faculté SNV, Université MS de Mascara et **Mr Hadj Habib Houari**, Enseignant à l'Institut

Remerciement

des SE et SNV, Centre Universitaire de Rélizane de m'avoir aidé tout au long de ce parcours.

Un petit mot pour ma famille et mes amis également, qui m'ont trop souvent vu décliner les invitations depuis 6 ans déjà : Que du bonheur, joie, réussite et de santé.

Ce travail est le fruit de plusieurs collaborations. Un grand merci à :

- Mes collègues en Post-graduation « Magister et Doctorat » pour leur amitié et leur soutien : Lalia Hachemi - Amina Hamdi – Asmaa Belgharbi - Habib Khodja – Othmène Reguig yessad - Benhelima Meniarni.

J'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.



Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent
ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de
mes études.*

A ma sœur et mes frères.

A mes neveux : Abdelssamed et Abdellatif

A mes nièces : Nour el houda, Yossra,

Farah et Ghofrane

A tous mes collègues et amies



Liste des figures

Figure 1 : Les infections d'origine endogène	6
Figure 2 : Les infections d'origine exogène	7
Figure 3 : Transmission de l'infection hospitalière	9
Figure 4 : Chaîne épidémiologique des infections nosocomiales	11
Figure 5 : Structure et représentation schématique de l'architecture de la paroi cellulaire de <i>C. albicans</i>	11
Figure 6 : Formes morphologiques de <i>Candida albicans</i>	13
Figure 7 : Portes d'entrées des <i>Candida</i> chez l'homme	15
Figure 8 : Différents stades de croissance d'une structure de biofilm	16
Figure 9 : Microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm de <i>Candida albicans</i> après 24 h de développement sur un cathéter	17
Figure 10 : Représentation des différents stades de colonisation tissulaire par <i>C. albicans</i> et rendue possible par son dimorphisme	18
Figure 11 : <i>Marrubium vulgare</i> L.....	34
Figure 12 : Structures chimiques des mono terpènes et sesquiterpènes de <i>M. vulgare</i>	37
Figure 13 : Structure chimique de diterpènes de <i>M.vulgare</i>	38
Figure 14 : Structure chimique de flavonoïdes de <i>M.vulgare</i>	40
Figure 15 : Carte géographique de la région de Mascara montrant l'endroit de récolte de <i>Marrubium vulgare</i> L.	43
Figure 16 : Protocole d'obtention de l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	45
Figure 17 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la détermination des phénols totaux	47
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de Catéchine pour la détermination des flavonoïdes totaux	48
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de Vanilline pour la détermination des tanins condensés	49
Figure 20 : Schéma d'identification de <i>C.albicans</i>	50
Figure 21 : Test de Filamentation sur Sérum « Test de Blastèse »	51
Figure 22 : Préparation de l'inoculum	52
Figure 23 : Protocole de Sacrifice	56
Figure 24 : Protocole expérimental du modèle de la candidose chez les rats wistar traités avec 800 mg/kg d'EMMV	62
Figure 25 : Recherche et Dénombrement de <i>Candida albicans</i> dans les organes internes	63
Figure 27 : Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins condensés des extraits méthanoïques de <i>M. vulgare</i> (mg/g de la plante)	67
Figure 28 : Chromatogramme (HPLC-DAD-ESI-MS) de l'EMMV	69
Figure 29 : Evolution du poids des rats durant l'étude de la Toxicité Subaigüe	77
Figure 29 : Evolution du poids des rats durant les dix (10) jours post-inoculations	86

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Traitements antifongiques utilisés	22
Tableau 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance secondaire chez les mycètes pathogènes.....	31
Tableau 3: Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins condensés dans <i>M. vulgare</i>	67
Tableau 4 : Temps de Rétention des Standards	70
Tableau 5 : Structures chimiques des composés identifiés par HPLC-DAD-ESI-MS selon la littérature	71
Tableau 6: Poids des Organes Internes des rats chez les différents groupes	77
Tableau 7 : Nombre de colonies de <i>C. albicans</i> isolée dans les Organes	87



Liste des Photos

Photo 1: <i>Marrubium vulgare L</i>	42
Photo 2: L'élevage des rats	53
Photo 3: Administration journalière de 800 mg/kg d' <i>EMMV</i> (v.o.)	55
Photo 4: Prélèvement des Organes	56
Photo 5 : Fixation des pièces	57
Photo 6: Inclusion à la paraffine.....	58
Photo 7: (A) & (B) : Aspect macroscopique et microscopique de <i>C.albicans</i> (X400) ; (C) : Formation d'un tube germinatif chez <i>C. albicans</i> (X400).....	74
Photo 8: Résultat des tests biochimiques de <i>C.albicans</i> (7112)	75
Photo 9 : Observation histologique du poumon par la coloration HE avec X100	79
Photo 10: Observation histologique du cœur par la coloration HE avec X100 et X400	79
Photo 11: Observation histologique de la rate par la coloration HE avec X100 et X400	80
Photo 12: Observation histologique du rein par la coloration HE avec X100 et X400	81
Photo 13: Observation histologique du foie par la coloration HE avec X100.....	81
Photo 14: Observation histologique de l'intestin par la coloration HE avec X100 et X400	83
Photo 15 : Observation histologique du colon par la coloration HE avec X100 et X400	84

Liste des Abréviations

EMMV : Extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*

UFC : Unité formant colonie

µl : Microlitre

°C : Degré Celsius

DO: Densité Optique

gvg : Par gavage

SGH: Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

HE : Hématoxyline et Eosine

VO : Voie orale

YEPD : Yeast extract peptone dextrose

PBS : Phosphate buffer saline

AmB : Amphotéricine B

HPLC : Haute Performance Liquide Chromatographique

Log₁₀: Logarithme décimal

pH : Potentiel d'hydrogène

sp. : Espèce non précisée

spp. : Plusieurs espèces non précisées

% : Pourcentage

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Liste des photos	III
Liste des abréviations	IV
Introduction générale	1

Synthèse Bibliographique**Chapitre I : Les Infections Nosocomiales**

I.1. Définition générale.....	3
I.2. Les différentes infections nosocomiales	3
I.3. Expressions de l'infection nosocomiale.....	4
I.3.1. Expression épidémiologique	4
I.3.2. Expression clinique	4
I.3.3. Expression microbiologique.....	4
I.4.1. Origines des germes	5
I.4.2. Voies de transmission	5
I.4.3. Modes de contamination	7
I.4.3.1. Auto-infection	7
I.4.3.2. Hétéro infection.....	7
I.4.3.3. Xéno-infection.....	7
I.4.3.4. Exo-infection.....	8
I.4.3.5. Patient réceptif	8
I.5.1. La prévalence	8
I.5.2. L'incidence cumulative	8
I.6. Microorganismes en cause « <i>Candida albicans</i> ».....	9
I.6.1. Structure de <i>C. albicans</i>	9
I.6.2. Taxonomie, morphologie et génome.....	10
I.6.3. La paroi	10
I.6.4. La chitine.....	12
I.6.5. Les glucanes	12
I.6.6. Les protéines	12
I.6.7. Les lipides	13
I.6.8. L'espace périplasmique	13
I.6.9. La membrane plasmique	13
I.6.10. Les organites intracellulaires.....	14
I.7. Incidence	14
I.8. Physiopathologie	14
I.9. Les facteurs de prédisposition aux candidoses.....	15
I.10. Physiologie cellulaire du biofilm de <i>Candida albicans</i>	15
I.11. Pathogénicité et facteurs de virulence	17
1.11.1 Dimorphisme	17
1.11.2. Stades de colonisation	17
1.11.2.1. Adhésion épithéliale	17
1.11.2.2. Invasion tissulaire	18

Table des matières

1.11.2.3. Dissémination par voie hématogène.....	18
I.12. <i>Candida</i> et immunité innée.....	18

Chapitre II : Traitements Antifongiques & Mécanismes de Résistance

II.1. Traitements antifongiques.....	20
II.2. Les médicaments antifongiques et leurs modes d'action.....	20
II.2.1. Inhibition de la synthèse de l'ergostérol.....	20
II.2.2. Médicaments qui attaquent la membrane plasmique.....	24
II.2.3. Médicaments qui affectent la synthèse du glucane.....	25
II.2.4. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ADN et l'ARN.....	26
II.2.5. Autres médicaments antifongiques.....	26
II.3. Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques.....	26
II.3.1. Définitions de la résistance.....	26
II.3.2. Résistance clinique versus résistance microbienne.....	26
II.3.3. Résistance primaire versus résistance secondaire.....	27
II.4. Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques chez <i>C. albicans</i>	27
II.4.1. Résistance aux azoles et autres inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol.....	27
II.4.1.1. Une accumulation réduite des azoles à l'intérieur de la cellule.....	27
II.4.1.2. Une diminution de l'affinité entre l'enzyme Erg 11 p et les azoles.....	28
II.4.1.3. Une augmentation des niveaux cellulaires de « Erg 11 p ».....	28
II.4.2. Résistance aux polyènes.....	29
II.4.3. Résistance à la flucytosine.....	29
II.4.4. Résistance aux échinocandines.....	29

Chapitre III: Le Marrube blanc "*Marrubium vulgare L.*"

III.1. Définitions des substances naturelles.....	33
III.2. Composition chimique des plantes médicinales et aromatiques.....	33
III.3. Etude botanique, structurale et culturelle.....	33
III.4. <i>Marrubium vulgare L.</i>	33
III.4.1. Classification Biologique.....	34
III.4.2. Description botanique.....	35
III.4.3. Propriétés physicochimiques.....	35
III.4.4. Utilisations en médecine traditionnelle.....	35
III.4.5. Aspect phytochimique.....	36
III.4.5.1. Sesquiterpènes.....	36
III.4.5.2. Diterpènes.....	38
III.4.5.3. Triterpènes.....	39

Table des matières

III.4.5.4. Flavonoïdes.....	39
III.4.6.5. Tanins	41
III.4.7. Formes d'utilisations et posologies	41

Partie expérimentale**Chapitre I : Matériels et Méthodes**

I.1. Objectifs.....	42
I.2. Cadre d'étude	42
I.3. Matériel	42
I.3.1. Matériel végétal.....	42
I.3.2. Souche test	43
I.3.3. Les animaux	44
I.4. Méthodes.....	44
I.4.1. Préparation du Matériel Végétal	44
I.4.2. Préparation de l'extrait méthanoïque de <i>Marrubium vulgare</i>	44
I.4.3. Rendement de l'extrait méthanoïque.....	46
I.4.4. Etude phytochimique	46
I.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	46
I.4.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	47
I.4.4.3. Dosage des tanins condensés.....	48
I.4.4.4. Analyse par HPLC-DAD-ESI-MS.....	49
I.4.5. Purification, Préparation et Calibrage de la Souche.....	50
I.4.5.1. Isolement et Identification de <i>C. albicans</i>	50
I.4.5.2. Lecture	50
I.4.5.3. Examen microscopique	50
I.4.5.4. Test de blastèse ou filamentation sur sérum.....	50
I.4.5.5. Api ® Candida	51
➤ Préparation de la galerie	51
➤ Préparation de l'inoculum	51
I.4.6. Pré culture	51
I.4.6.1. Préparation des cellules lavées.....	52
I.4.7. Animaux.....	53
I.4.7.1. Accouplement	53
I.4.7.2. Conditions d'élevage.....	53
I.4.8. Etude de la Toxicité Subaigüe.....	54
I.4.8.1. Choix de la dose.....	54
I.4.8.2. Répartition des lots.....	54
I.4.8.3. Administration de l'EMMV par voie orale	54
I.4.8.4. Morbidité et mortalité	55
I.4.8.5. Détermination du poids corporel.....	55
I.4.8.6. Sacrifices des animaux	55
I.4.8.7. Prélèvement des Organes et Etude Histologique	56

Table des matières

I.4.8.7.1. Déshydratation	57
I.4.8.7.2. Inclusion.....	57
I.4.8.7.3. Coupe des pièces	58
I.4.8.7.4. Coloration.....	58
I.4.9. Effets des extraits méthanoïques de <i>M.vulgare</i> sur les rats infectés par <i>C.albicans</i> ..	60
I.4.9.1. Sacrifices des animaux	61
I.4.9.2. Prélèvement du Sang.....	61
I.4.9.3.1. Recherche et dénombrement de <i>Candida albicans</i> dans l'Intestin et le Colon	61
I.4.9.3.2. Translocation de <i>Candida albicans</i> dans les Organes Internes	61
I.4.10. Analyse Statistique.....	64

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Extraction, Dosage et Identification des composés phénoliques	65
II.1.1. Rendement	65
II.1.2. Etude phytochimique	65
II.1.2.1. Dosage des phénols totaux.....	65
II.1.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	66
II.1.2.3. Dosage des tannins condensés	66
II.1.2.4. HPLC-DAD-ESI-MS	69
II.2. Identification de <i>Candida albicans</i>	74
II.2.1. Examen macroscopique et microscopique.....	74
II.2.2. Test de blastèse	74
II.2.3. Api ® Candida	75
II.3. Etude de la toxicité Subaigüe.....	76
II.3.1. Morbidité et mortalité	76
II.3.2. Comportement des animaux	76
II.3.3. Evolution des Poids des Animaux	76
II.3.4. Evaluation des Poids des Organes chez les différents groupes.....	77
II.3.5. Etude histologique des organes.....	78
II.3.5.1. Poumons.....	78
II.3.5.2. Cœur	79
II.3.5.3. Rate	80
II.3.5.4. Reins	80
II.3.5.5. Foie	81
II.3.5.6. Intestin et Colon.....	82
II.3.6. Effet de l'EMMV sur le Poids des animaux infectés par <i>C.albicans</i>	86
II.3.6.1. Evolution des Poids des Animaux	86
II.3.6.2. Recherche et Dénombrement de <i>C. albicans</i> dans l'Intestin, le Côlon et sa translocation dans les Organes Internes.....	87



Table des matières

Conclusion générale et Perspective97

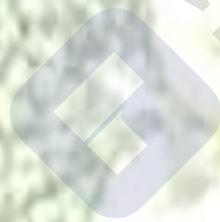
Références Bibliographiques

Annexe

Résumé



Introduction générale



Introduction générale

L'application des remèdes à base de plantes dans la culture traditionnelle a largement contribué au développement de l'usage des plantes médicinales, si l'on tient compte de leur utilisation, nous avons 80% de la population mondiale dépendante de ces médicaments pour leurs soins de santé (**Gurib-Fakim, 2006 ; Meyre-Silva & Cechinel-Filho, 2010**). Compte tenu de ces aspects, les produits naturels, en particulier les espèces végétales supérieures, continuent d'être des sources importantes de médicaments et de produits complémentaires de santé. Cela représente un défi pour la science en raison de divers aspects, y compris leur diversité chimique, leur synergie dans l'activité biologique et leur composition variable (**Fatima et al., 2008 ; Meyre-Silva & Cechinel-Filho, 2010**).

Les médicaments disponibles pour le traitement des infections en particulier fongiques ne sont pas pleinement efficaces et possèdent un certain degré de toxicité. En outre, les champignons développent une émergence de résistance rapide en raison de leur utilisation à grande échelle (**Gupta & Kohli, 2003 ; Espinel-Ingroff, 2009**). Bien que les médecins soient orientés vers des thérapies de combinaison, le médicament miracle pour empêcher les infections fongiques et éviter la résistance, n'a pas encore paru

Parmi les différentes sources possibles de composés antifongiques, les plantes conservent un grand intérêt, car elles offrent de nouveaux composés antifongiques en raison de leur disponibilité inégale de diversité chimique (**Cos et al., 2006 ; Maregesi et al., 2008 ; Kakorin et al., 2018**). *Marrubium vulgare L.* est une plante herbacée de la famille des *Lamiaceae* qui se localise en Amérique du Nord et du Sud et en Asie occidentale. Elle possède des propriétés toniques, aromatiques, stimulantes, expectorantes, diaphorétiques et diurétiques (**Nawwar et al., 1989 ; Weel et al., 1999 ; Herrera-Arellano et al., 2004 ; Berrougui et al., 2006, Meyre-Silva et al., 2005**). Dans ce contexte, des études pharmacologiques approfondies ont démontré que *Marrubium vulgare* présente une série d'activités comprenant des propriétés anti-nociceptives (De Jesus et al, 2007), antioxydantes (**Weel et al., 1999 ; Pukalskas et al., 2012**), cardioprotectrices (**Youcefi et al., 2013**), vasorelaxantes (**Elbardai et al., 2003**), gastroprotectrices (**Paula De Oliveira et al., 2011**), antispasmodiques (**Schlemper et al., 1996**), immunomodulatrices (**Daoudi et al., 2008**), anti-œdématogènes (**Stulzer et al., 2006**), analgésiques (**De Souza et al., 1998**), antidiabétiques (**Boudjelal et al., 2012**) et antigénotoxiques (**Popoola et al., 2013**).

Introduction générale

D'autres effets médicinaux sont également rapportés sur cette plante tels que l'action insecticide et antinociceptive dans plusieurs modèles de douleur chez la souris (Stulzer et al., 2006).

Des études phytochimiques antérieures sur *M. vulgare* ont conduit à la caractérisation de plusieurs glycosides et lactates flavonoïdes et de plusieurs diterpénoïdes labdane avec la marrubiine comme composant principal (Sahpaz et al., 2002). Récemment, un grand nombre de leurs constituants ont été étudiés, notamment leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (Ameziane et al., 2007 ; Zarai et al., 2011 ; Ghedadba et al., 2014 ; Benfreha et al., 2015 ; Asadi-Samani et al., 2015 ; Bouterfas et al., 2016).

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de la valorisation de cette plante et d'identifier certains constituants bioactifs. Elle est donc consacrée à l'étude *in vivo*, visant à déterminer les effets de l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* (EMMV) chez les rats Wistar infectés par *Candida albicans*, un germe pathogène isolé lors des infections nosocomiales.

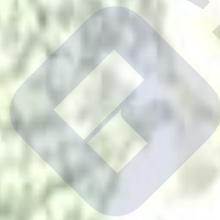
Le manuscrit est divisé en deux parties:

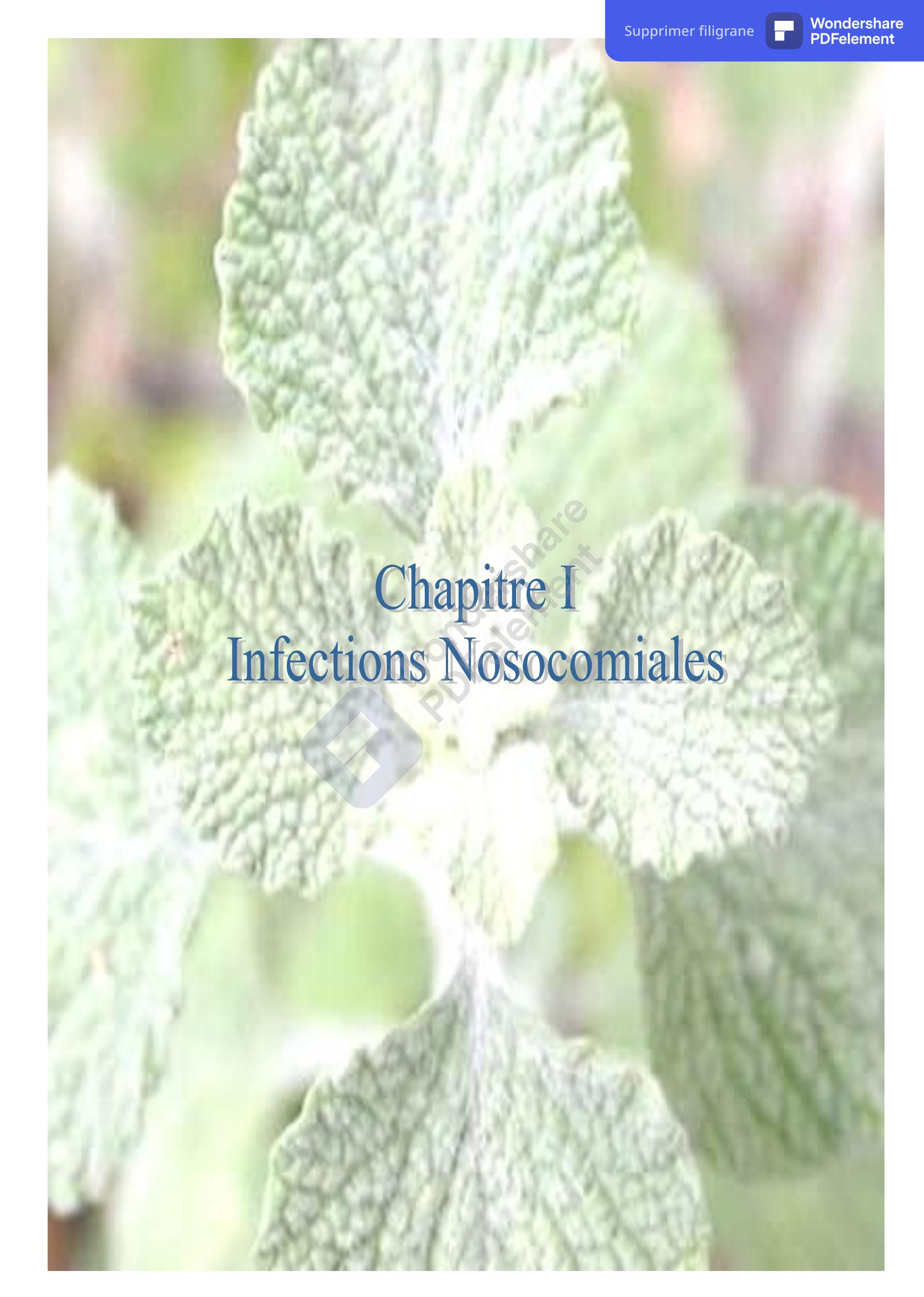
La première est consacrée à une étude bibliographique qui comporte trois chapitres :

- Chapitre I : Les Infections Nosocomiales ;
- Chapitre II : Les Traitements Antifongiques et Mécanismes de Résistance ;
- Chapitre III : Le Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.).

La deuxième aborde la partie expérimentale comportant la méthodologie appliquée. Les résultats obtenus sont interprétés et discutés à la lumière de la littérature existante. Enfin, une conclusion achèvera le travail ouvrant des perspectives vers l'approfondissement de ce travail.

Synthèse Bibliographique





Chapitre I

Infections Nosocomiales

I.1. Définition générale

Une infection est dite nosocomiale si elle apparaît suite à une hospitalisation et si elle était absente à l'admission. Lorsque la situation à l'admission n'est pas connue, un délai de 48 heures après l'admission est accepté afin de différencier entre une infection nosocomiale et d'autre communautaire. Il est recommandé d'apprécier, dans chaque cas douteux, la plausibilité du lien causal entre hospitalisation et infection (**Berche et al., 1991; Bouvet & Crimont, 1989**).

Concernant les infections du bloc opératoire, on considère comme nosocomiales les infections qui apparaissent dans les 30 jours suivant l'intervention, ou dans les 90 jours en cas d'infection d'origine virale ou même dans les 365 jours au cas où il y avait une mise en place d'un implant ou d'une prothèse (**Berche et al., 1991; Bouvet & Crimont, 1989**).

I.2. Les différentes infections nosocomiales

L'étiologie et la fréquence des IN sont très variables, suivant la nature du service hospitalier concerné, les patients traités et la région étudiée. On distingue quatre (4) catégories d'infections:

- **Les infections urinaires**

Sont les infections contractées lors d'un sondage urinaire.

- **Les infections du site opératoire**

On distingue les infections de la plaie opératoire et les infections profondes qui touchent les organes internes. Etant donné que la chirurgie qui a pour but une transplantation ou même à la mise en place d'une prothèse peuvent causer des IN très tardives (**Ducel et al., 2002**).

- **Les pneumopathies**

Ces infections constituent un véritable problème au niveau des unités de soins intensifs (USI) à cause de l'utilisation d'une ventilation mécanique.

- **Les septicémies**

Les septicémies nosocomiales sont associées dans la plupart des cas par l'utilisation de dispositif médical (DM) tels que l'utilisation des dispositifs comme les pièces de perfusion veineuse et les cathéters.

A noter qu'il y a d'autres IN moins graves et moins fréquentes, on distingue les infections de la peau, les sinusites ou les conjonctivites, les gastro-entérites infantiles y compris les infections de la sphère génitale (**Ducel et al., 2002**).

I.3. Expressions de l'infection nosocomiale**I.3.1. Expression épidémiologique**

On distingue deux modes :

- Le mode épidémique : c'est l'exemple des gastro-entérites à *Salmonelle*, dans lesquels les micro-organismes impliqués sont les virus de l'hépatite B, *Salmonella*, *Serratia*...etc ;
- Le mode endémique : c'est l'exemple des infections urinaires et les surinfections des plaies opératoires, dans lesquels les micro-organismes impliqués sont : *Proteus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *klebsiella*, *Pseudomonas*,) (Tasseau & Baron, 1989).

I.3.2. Expression clinique

L'IN peut être localisée et/ou généralisée :

a) L'infection localisée

- Après une intervention chirurgicale ;
- Une défaillance organique comme par exemple un trouble de la déglutition qui peut nous ramène à une pneumopathie ;
- Un matériel étranger (infection urinaire sur sonde ou sinusite après intubation naso-trachéale).

b) L'infection généralisée

Elle est suite à un foyer infectieux local : suppuration chirurgicale, infection urinaire, ...etc (Tasseau & Baron, 1989).

I.3.3. Expression microbiologique

Les bactéries bacilles à Gram (-) sont en cause dans 60-70% des cas, les bactéries sphériques à Gram (+) dans 25% et les bactéries anaérobies dans 3 à 4% seulement. Les résultats du « Center for Disease Control » montre que l'agent causal le plus dominant est *Escherichia coli* suivi par *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella*.

- *Staphylococcus epidermidis* est impliqué dans 8% des septicémies nosocomiales en particulier chez les porteurs d'un cathéter central ;
- *Escherichia coli* est le germe le plus souvent retrouvé dans les infections urinaires (Carlet, 2002).

I.4. Physiopathologie**I.4.1. Origines des germes**

On peut distinguer 4 origines :

a) La flore saprophyte du malade lui-même

Au cours des cinq premiers jours de l'hospitalisation, la flore subit des variations qualitatives. Les bactéries bacilles à Gram (-) telles que les Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*) et les levures (le genre *Candida*) remplaçant ainsi les coques à Gram (+) ou les anaérobies.

Ces micro-organismes saprophytes modifiés colonisent des sites préférentiels du patient qui seront le siège de l'infection nosocomiale : Urine, plaie chirurgicale, parenchyme pulmonaire (**Bulletin épidémiologique, 1992; Fagon, 1998 ; Bouvet & Crimont, 1989 ; Tasseau & Baron, 1989**).

b) Le personnel médical

Le personnel soignant peut favoriser la propagation de l'IN. Il peut être colonisé soit par son micro environnement « matériel », soit par un malade infecté. Dans des cas rares où le personnel peut être lui-même porteur d'une infection cutanée staphylococcique ou des voies aériennes supérieures d'étiologie virale telle que la grippe influenza...etc.

c) Le patient infecté ou simplement colonisé

Il est à l'origine de la colonisation du personnel soignant et de l'environnement.

d) L'environnement

Dans le cadre d'un programme de prophylaxie, il doit être considéré comme moins déterminant que les trois autres origines. Il peut être contaminé par le personnel ou par le patient.

Ce micro et macro-environnement peut comprendre les divers appareillages d'assistance respiratoire (respirateur, l'humidificateur...), les lavabos, les instruments tels que (tensiomètre, stéthoscopes...), les tubulures et l'air ambiant (**Bulletin épidémiologique, 1992; Fagon, 1998 ; Bouvet & Crimont, 1989 ; Tasseau & Baron, 1989**).

I.4.2. Voies de transmission

La flore saprophyte du patient peut être responsable d'une auto-infection ; la voie de transmission est endogène. Tandis que les trois autres sources de l'infection hospitalière transmettent les germes par voie exogène, c'est la notion de l'infection

croisée. La transmission se fait principalement par contact. Ce dernier est réalisé par les mains du personnel soignant.

Les particules en suspension dans l'air peuvent être responsables de l'infection des plaies opératoires alors que la voie orale est incriminée dans les épidémies de gastro-entérites (Tasseau & Baron, 1989).

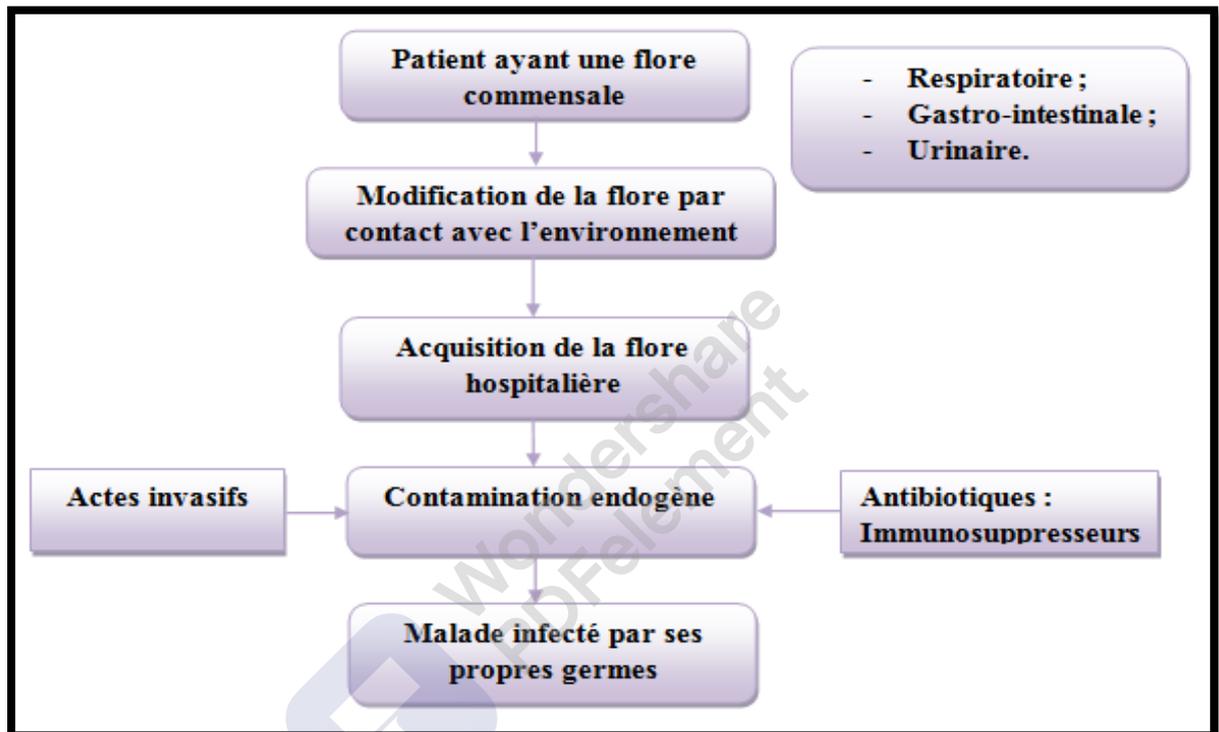


Figure 1 : Les infections d'origine endogène (Berche et al., 1991).

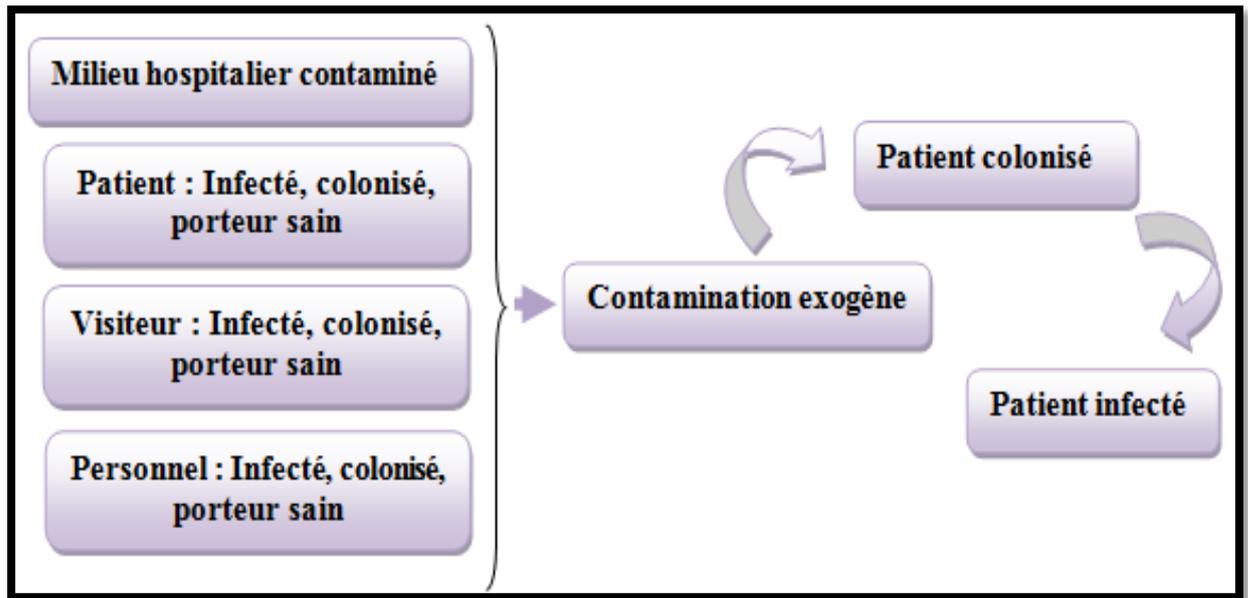


Figure 2 : Les infections d'origine exogène (Berche et al., 1991).

I.4.3. Modes de contamination

I.4.3.1. Auto-infection

C'est lorsque le malade s'infecte soit par ses propres germes, soit à partir de son environnement immédiat. Ces infections sont causées par la flore saprophyte qui devient pathogène à la suite d'un traitement immunosuppresseur.

Ou d'une antibiothérapie.

Certains patients immunodéprimés (aplasie médullaire, SIDA) peuvent avoir des bactériémies dues à une flore intestinale qu'ils hébergent. Ces infections endogènes sont aussi des auto-infections (Berche et al., 1991).

I.4.3.2. Hétéro infection

C'est lorsqu'un agent infectieux est transporté d'un malade à un autre provoquant une infection dite croisée. Dans ce type d'infection, l'agent infectieux est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne (Berche et al., 1991).

Le principal vecteur est le personnel soignant par ses mains, et ou ses instruments de travail. C'est le mode de contamination majeure lors de nombreuses épidémies et le plus difficile à maîtriser en réalisant des mesures prophylactiques.

I.4.3.3. Xéno-infection

Elle se présente soit sous forme endémique ou épidémique. Les particules infectieuses sont importées à l'hôpital par le vecteur (les malades, le personnel

soignant, ou les visiteurs). Elles se transmettent par l'air, par contact direct ou indirect et trouvent dans le milieu hospitalier des conditions de transmission favorables.

I.4.3.4. Exo-infection

Ce type de transmission est lié à des anomalies techniques (stérilisation inefficace, filtre non stérile). Les matériaux à usage paramédical ou domestique sont utilisés auprès des malades ; donc ils pourraient être contaminés et provoqués des IN généralement épidémiques. **(Berche et al., 1991).**

I.4.3.5. Patient réceptif

Certaines pathologies entraînent une légère immunodépression : les malades à risque sont : les brûlés, les polytraumatisés et les porteurs de dispositifs invasifs tels que des cathéters divers, les vieillards, les insuffisants respiratoires, et surtout les nouveaux nés prématurés **(Berche et al., 1991).**

I.5. Critères épidémiologiques

I.5.1. La prévalence

C'est le nombre de patients infectés pour 100 patients présents dans un établissement ou une unité de soins, à un instant donné **(Monnet, 2011 ; Chastre & Fagon, 2002).**

I.5.2. L'incidence cumulative

C'est le nombre de nouveaux patients infectés, ou de nouveaux cas d'épisodes infectieux, pour 100 patients suivis sur une période définie. Cette période varie selon la population de patients concernés : elle est de 30 jours en général pour les infections du site opératoire, alors que pour les autres types d'IN elle réfère à la durée d'hospitalisation **(Allegranzi et al., 2011; ECDC, 2008).**

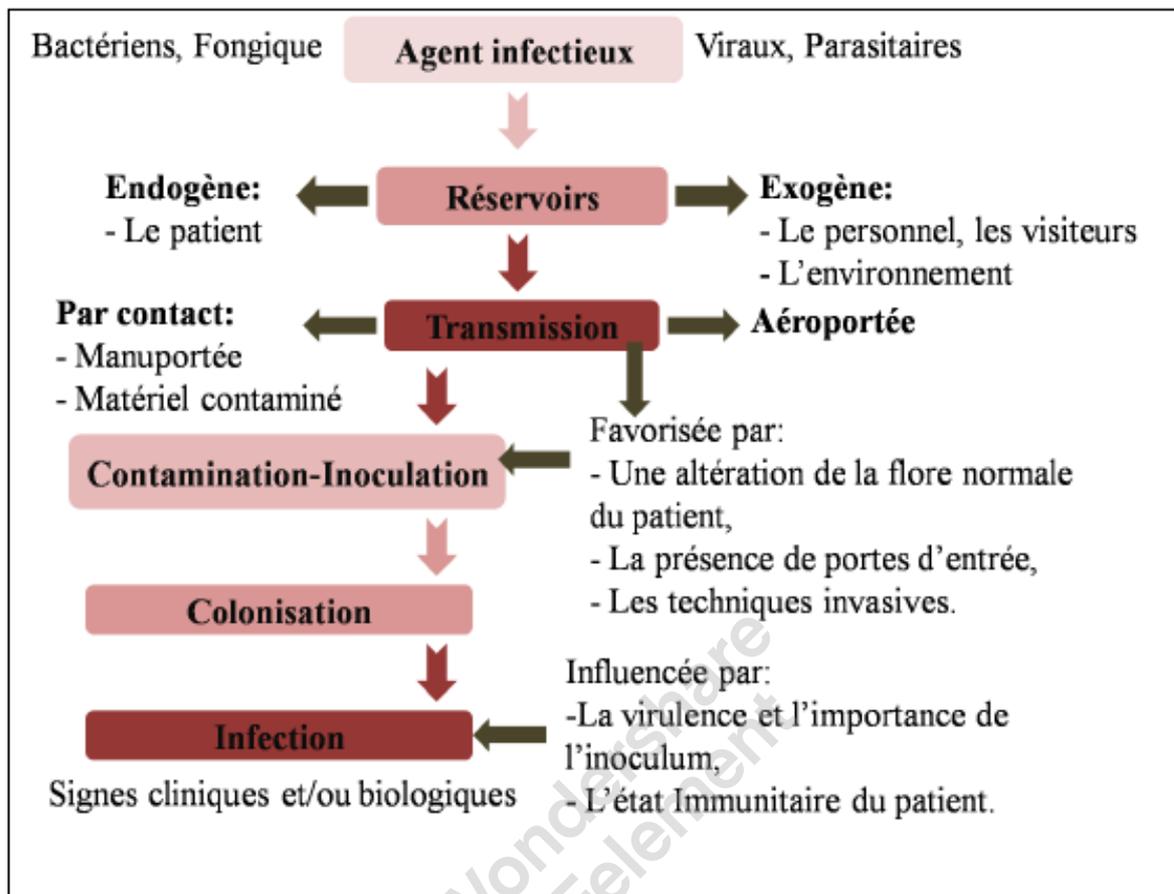


Figure 3: Chaîne épidémiologique des infections nosocomiales (Berche et al., 1991).

I.6. Microorganismes en cause «*Candida albicans* »

Les *Candida* sont des champignons levuriformes ; dans laquelle, les appareils végétatifs peuvent se présenter sous formes (filaments, pseudofilaments ou blastospores) dont leur multiplication se fait par bourgeonnement. Ces champignons contiennent une paroi contenant de la chitine.

Les *Candida* sont commensaux des muqueuses et de la peau, on peut les rencontrer même dans l'environnement. L'infection causée par ces espèces est connue sous l'appellation de candidose. D'autres noms communs sont à utiliser en décrivant des infections spécifiques comme par exemple le Muguet (ou candidose buccale). Ce champignon présente des capacités d'adhésion au tissu, sécrétion des phospholipases et des protéases, changement de morphologie et à affaiblir la défense de l'hôte. (Abi-Said et al., 1997).

I.6.1. Structure de *C. albicans*

C. albicans est une cellule eucaryote avec une membrane nucléaire, des chromosomes, des inclusions lipidiques et des mitochondries avec des activités enzymatiques de type phosphatase, oxydase et peroxydase. La membrane plasmique donne la forme générale de la cellule fongique et assure ainsi sa stabilité mécanique.

I.6.2. Taxonomie, morphologie et génome

La classification ci-dessous date de 2000 (**Barnett et al., 2000**):

Règne : Champignon

Phylum : *Ascomycota*

Classe : Hemiascomycètes

Ordre : Saccharomycétales

Famille : *Candidaceae*

Genre : *Candida*

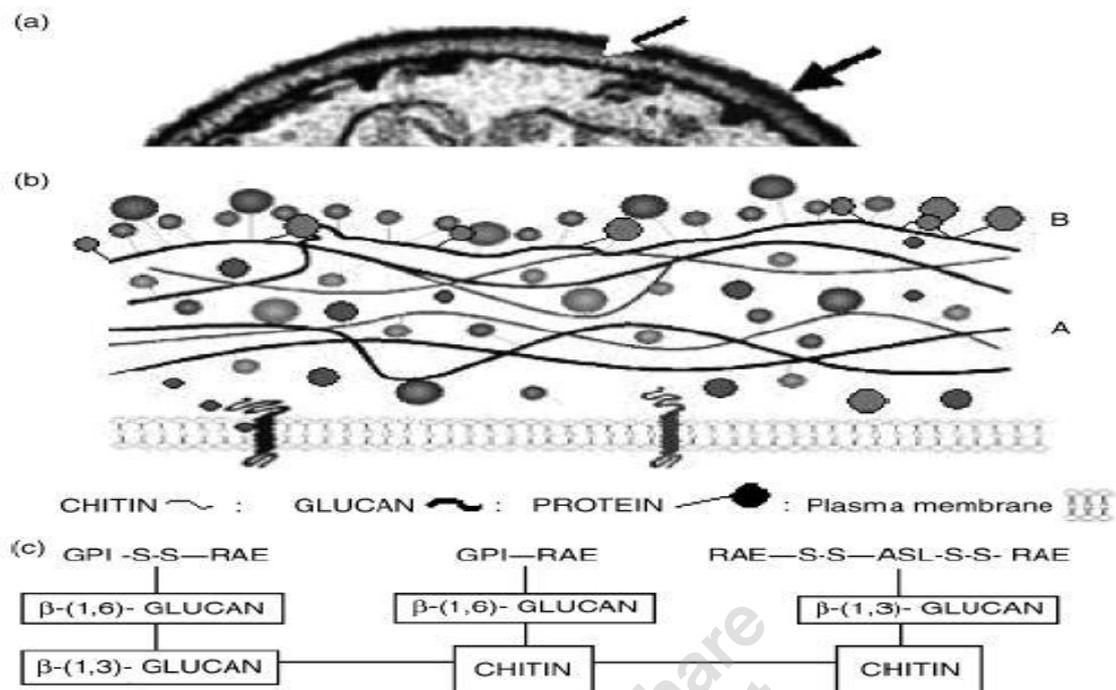
Espèce : *C. albicans*

La plupart des *Candida spp.* possèdent une faculté de changer de morphologie. Ainsi, par le processus du bourgeonnement, les levures forment du pseudomycélium. *C. albicans* et *C. dubliniensis* ont en plus la capacité de différencier un véritable mycélium, formé par des filaments.

La paroi des *Candida* joue un rôle protecteur contre la pression osmotique et les variations physico-chimiques, elle est considérée comme le premier cible des cellules phagocytaires. En outre, elle permet d'assurer l'équilibre entre la plasticité et la résistance de la cellule fongique. Le composant majeur est le β -1,3 glucane liés à des β -1,6 glucanes et à la chitine en formant des micro-fibrilles, ces dernières sont liées par des liaisons hydrogènes (**Maruyama et al., 2005**).

I.6.3. La paroi

La paroi des *Candida* présente une structure stratifiée cohérente. Elle confère une protection à la cellule contre les agressions physico-chimiques et biologiques, elle porte aussi d'importants déterminants antigéniques responsables à l'adhérence. La Figure 3 illustre la paroi de *C. albicans* (**Klis et al., 2001; Klis et al., 2002 ; Firon et al., 2004**).



(a) Microphotographie électronique d'une section médiane de cellule de *C. albicans*. Tête de flèche blanche : Polysaccharides (β -glucanes et chitine) et protéines. Tête de flèche noire : Mannoprotéines. (b) Schéma de la paroi cellulaire. (c) Représentation schématique de l'organisation moléculaire de la paroi cellulaire.

Figure 4 : Structure et représentation schématique de l'architecture de la paroi cellulaire de *C. albicans*. (Ruiz-Herrera et al., 2006).

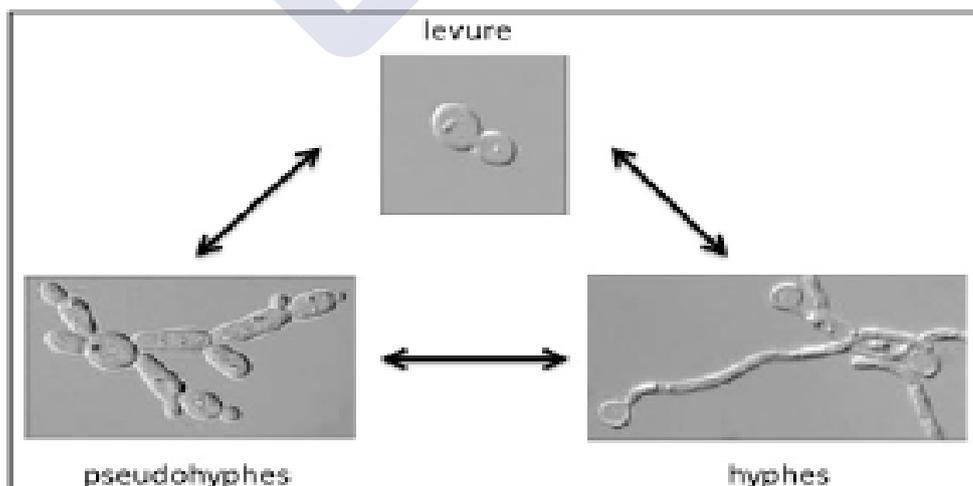


Figure 5 : Formes morphologiques de *Candida albicans* (Ruiz-Herrera et al., 2006).

La paroi de *C. albicans* représente environ 15 à 25 % du poids sec de la cellule fongique. Certains constituants sont liés par des liaisons covalentes tandis que d'autres par des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophiles ou hydrophobes ou encore par des interactions ioniques. Une structure assez rigide de composés complexes de glucose (-1,3 et -1,6 glucanes) et de chitine enveloppe la cellule fongique comme une barrière en protégeant ainsi la levure des stress externes tels que la pression osmotique (Poulain et al., 1978).

I.6.4. La chitine

La chitine représente une proportion mineure (0,6 à 2 %) de la paroi et se situe dans la couche interne de la paroi de la levure (Figure 3, a). C'est un polysaccharide linéaire fait de plus de 2 000 unités de N-acétylglucosamine (GlcNAc) reliées par des liaisons β -1,4. Les chaînes sont associées par des liaisons hydrogènes en formant des microfibrilles de 20 à 400 chaînes (Garcia, 2006).

I.6.5. Les glucanes

Ces polymères représentent la proportion la plus abondante dans la paroi fongique avec (50-60 %) de sa masse totale. Ils sont liés par des liaisons glycosidiques (β -1,3 et/ou β -1,6) (Reiss et al., 1992).

I.6.6. Les protéines

Les protéines telles que les mannoprotéines et les mannanes, représentent environ 6 à 25 % de la paroi. Elles sont considérées comme des composants antigéniques majeurs de la cellule fongique. Les déterminants antigéniques de ces protéines sont déterminés par la position des liaisons (β -1,3), la longueur des chaînes latérales et les liaisons phosphodiester (Chaffin & Stocco, 1983; Reiss et al., 1992).

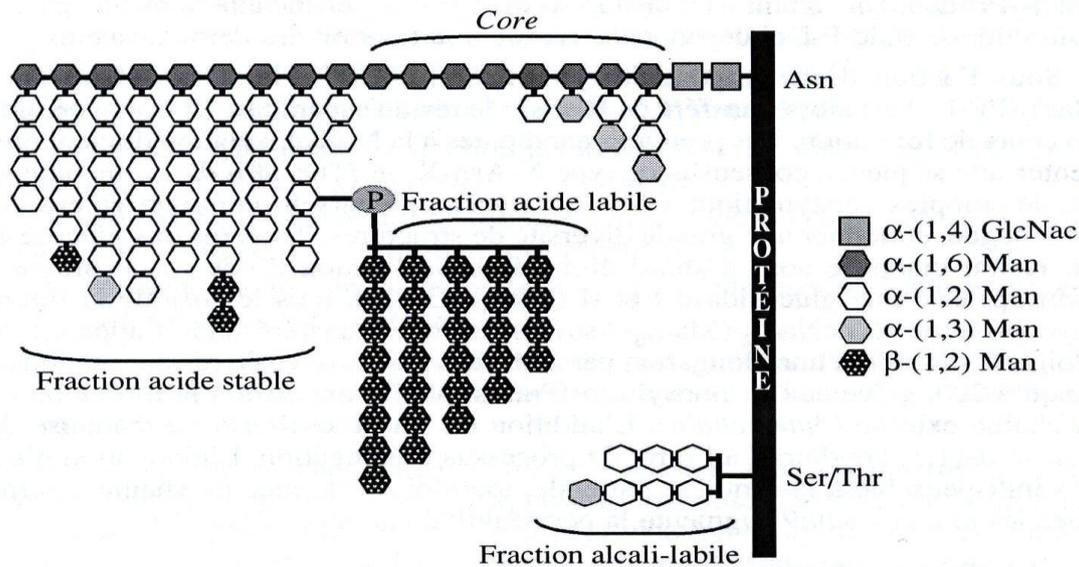


Figure 6 : Structure schématique du mannane de *C. albicans*
(Poulain et al., 1990).

I.6.7. Les lipides

Les lipides représentent la proportion la plus minime de la paroi de *C. albicans* avec 5 à 17 % de la paroi, en signalant la présence de phospholipides, de stérols libres ou estérifiés et de triglycérides. Il a été démontré que les lipides pouvaient participer dans l'adhérence et dans l'activation des voies de signalisation chez la levure (Ghannoum et al., 1987).

I.6.8. L'espace périplasmique

L'espace périplasmique est situé entre la paroi et la membrane cytoplasmique, il est le siège d'ensemble d'activités enzymatiques (enzymes digestives et enzymes rentrant dans la synthèse de la paroi). (Manning & Mitchell, 1980).

I.6.9. La membrane plasmique

La membrane plasmique est constituée de deux feuillets membranaires. Elle assure l'entrée des nutriments à l'intérieur de la cellule fongique tel que le transport actif des glucides, des acides aminés et de différents ions, ainsi qu'un rôle protecteur afin de maintenir la pression osmotique.

I.6.10. Les organites intracellulaires

On signale la présence de tous les organites cellulaires essentiels: noyau, réticulum endoplasmique, vacuoles digestives, appareil de Golgi. Etant donné que le contenu protéique et l'activité enzymatique varient durant le stade de la germination. (**Manning & Mitchell, 1980**).

I.7. Incidence

Ces dernières années, l'incidence des candidoses systémiques et disséminées a subi une amélioration grâce à des nouvelles pratiques médicales et chirurgicales en améliorant la survie des patients à haut risque (**Netea et al., 2008**).

Dans ce contexte, on retrouve les infections fongiques sévères chez ces patients et dont le traitement est assez difficile. Les espèces du genre *Candida* sont les levures les plus responsables d'infections invasives.

Les candidoses invasives représentent jusqu'à 17 % des infections nosocomiales chez les malades des unités de soins intensifs (USI) alors que les candidémies représentent 5-10% des septicémies. Si *C. albicans* reste la plus virulente, on signale une augmentation remarquable des candidémies causées par d'autres espèces du genre *Candida* avec une proportion de 35 à 65% des isolats (**Abi said et al., 1997 ; Tortorano et al., 2004 ; Warnok, 2007**).

I.8. Physiopathologie

En raison de facteurs favorisant ces infections, les candidoses disséminées sont en augmentation croissante. Elles dépendent de l'agent causal mais beaucoup plus de l'hôte. Suite à un problème d'immunité de ce dernier et/ou à une rupture de barrières cutanéomuqueuses, les levures du genre *Candida* vont pouvoir pénétrer dans l'hôte, disséminer par voie hématogène en provoquant des septicémies graves (**Figure 9**). L'installation de la levure responsable de la candidémie commence par la colonisation des voies digestives suivies par son adhérence grâce aux adhésines.

Le processus d'invasion de *Candida Spp* dans les tissus débute par la transition morphologique de la levure en pseudo-filament, la sécrétion de protéases et de phospholipases. Des phénomènes de translocation peuvent être aboutir à travers la paroi digestive grâce à une dissémination hématogène. L'autre voie possible est la violation des barrières cutanées, tractus urinaire par cathétérisme vasculaire, plaies chirurgicales, traumatismes vasculaires, implantation de matériel médical. Ainsi que la chirurgie de transplantations et la chirurgie cardiaque sont considérées parmi les chirurgies en cause (**Castaldo et al., 1991 ; Ortega et al., 2005**).

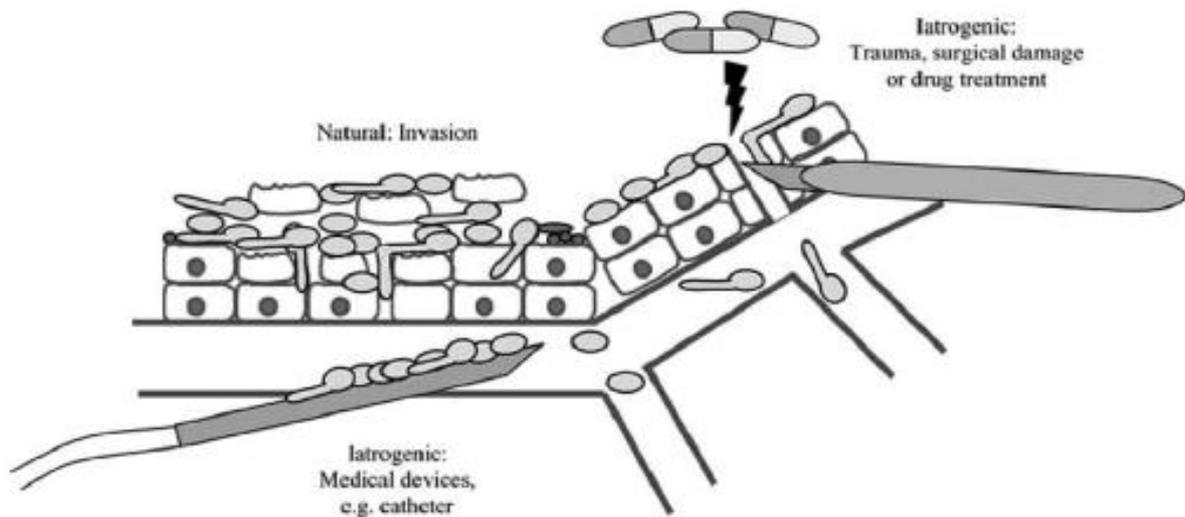


Figure 7: Portes d'entrées des *Candida* chez l'homme (Mavor et al., 2005).

I.9. Les facteurs de prédisposition aux candidoses

Les facteurs généraux favorisant les candidoses sont multiples : âge, thérapeutiques (antibiotiques, immunosuppresseurs), états physiologiques particuliers (grossesse), états pathologiques (diabète, leucémie, SIDA...). D'autres facteurs tels que l'humidité et la radiothérapie sont également des facteurs de prédisposition. Les autres facteurs endogènes sont essentiellement les neutropénies, les transplantations de moelle et les dysfonctionnements métaboliques ou encore la malnutrition.

I.10. Physiologie cellulaire du biofilm de *Candida albicans*

Les biofilms sont des formes très organisées de micro-organismes attachés les uns aux autres avec une épaisseur entre 50 et 350 μm . Les biofilms sont présents un peu partout dans l'environnement ainsi qu'à l'intérieur de l'hôte sur des prothèses, des cathéters ou encore sur la partie externe des vaisseaux sanguins. Ces dernières années, vu leurs résistances à la plupart des traitements antifongiques, Les biofilms ont présenté un majeur problème clinique (Baillie & Douglas, 2000; Mukherjee et al., 2005).

Le biofilm ne s'installe pas de façon instantanée. La formation du biofilm est un phénomène complexe puisque des études microscopiques ont montré que le développement du biofilm se faisait selon trois étapes (**Figure 8**):

- L'étape initiale (0 à 11 heures) : les blastospores adhéreront à une surface pour bourgeonner et créer des microcolonies détectées entre la 3-4 h. Ensuite, entre la 4-8 h, les pseudohyphes et les hyphes apparaîtront.
- L'étape intermédiaire (12 à 30 heures) : Les microcolonies seront rattachées aux pseudohyphes et hyphes afin de créer une couche assez complexe appelée : « une monocouche confluyente » ;

La maturation (31 à 72 heures) : la quantité de matrice extracellulaire augmentera en fonction du temps jusqu'à ce que le biofilm devienne mature (**Chandra et al., 2001; Lawrence et al., 1991**).

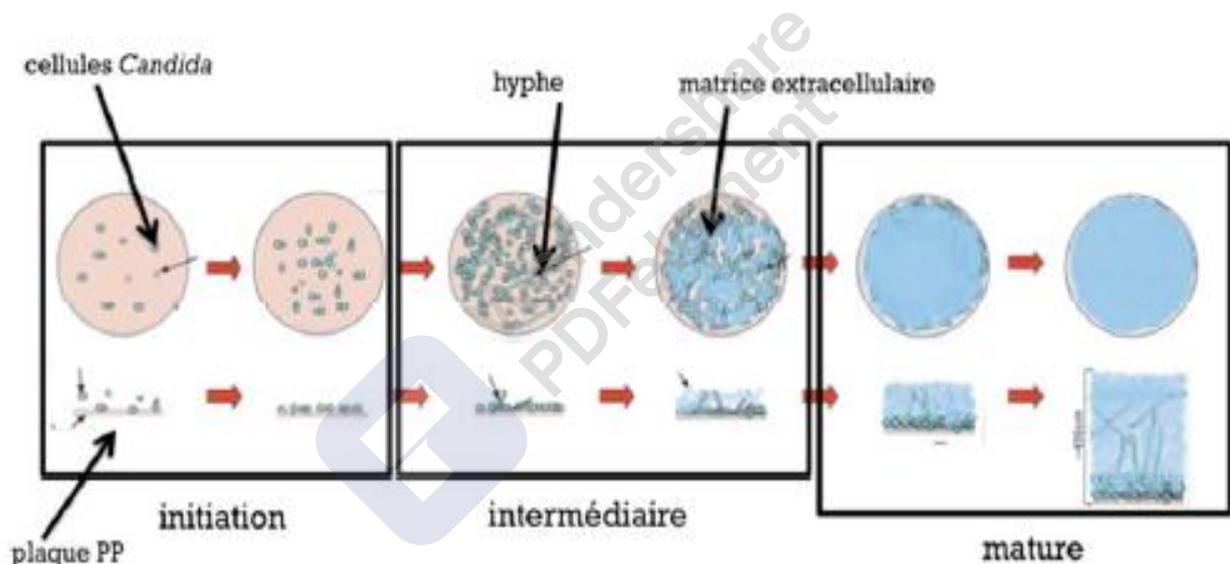
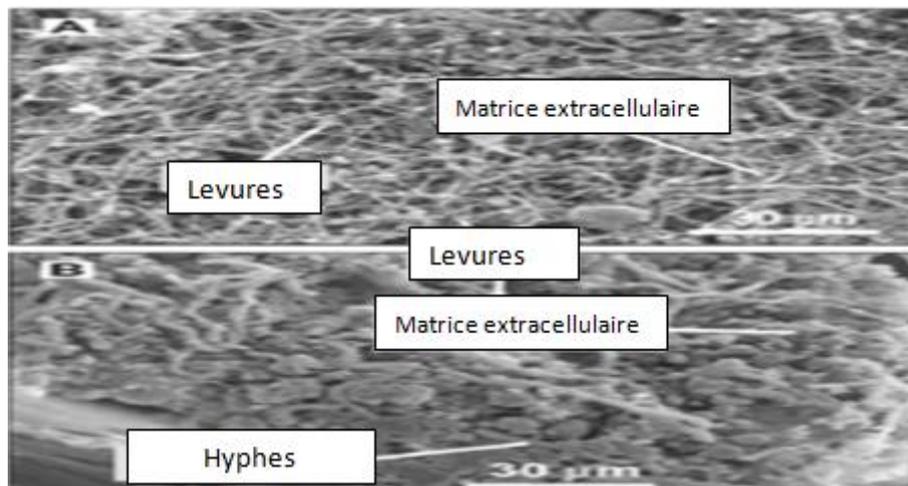


Figure 8: Différents stades de croissance d'une structure de biofilm (**Chandra et al., 2001**).



(A) Vue intraluminale de la surface du biofilm;

(B) Vue en coupe transversale du biofilm.

Figure 9: Microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm de *Candida albicans* après 24 h de développement sur un cathéter (Andes et al., 2004).

1.11. Pathogénicité et facteurs de virulence

1.11.1 Dimorphisme

La souche *C. albicans* est responsable de plus de la moitié des infections systémiques à *Candida*. Grâce au phénomène de dimorphisme, elle est capable de coloniser son hôte sous trois formes possibles : levure, pseudo-mycélium et mycélium (ou hyphes). Selon les conditions environnementales (pH, température...) la forme mycélienne peut être considérée comme la forme la plus virulente de *C. albicans*.

En effet, des souches de *C. albicans* mutées incapables de former ce mycélium se sont révélées non-invasives et non virulentes *in vitro* malgré que ce soit la même forme qu'elle va favoriser la formation d'un biofilm (Rahman et al., 2007).

1.11.2. Stades de colonisation

1.11.2.1. Adhésion épithéliale

Elle est considérée comme la première étape de l'infection à *Candida* en amorçant la colonisation tissulaire (Figure 12). Dans ce contexte, ce pathogène opportuniste nécessite de protéines de surface telles que les adhésines :

- la famille des Als (Agglutinin-like sequence) au nombre de neuf (09) et ;
- la famille Hwp1 (Hyphal wall protein 1).

L'adhésion aux cellules de l'hôte est permise par l'expression d'une ou plusieurs adhésines particulières. Prenons l'exemple de « Als1 et Als3 » qui vont ainsi être impliquées dans l'adhérence à l'épithélium buccal tandis que les autres types telles que les Als2 et Als4 vont participer à l'adhérence dans l'endothélium vasculaire (Gow et al., 2011).

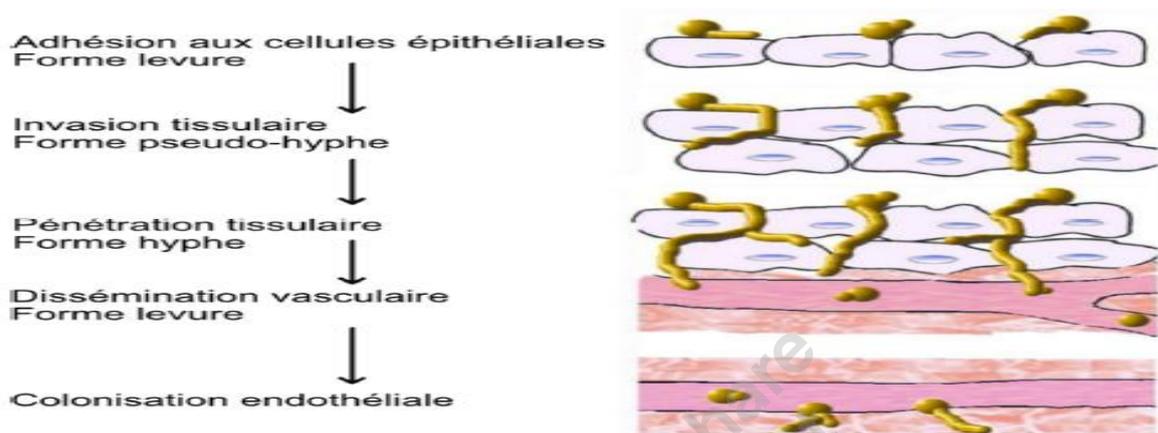


Figure 10 : Représentation des différents stades de colonisation tissulaire par *C. albicans* et rendue possible par son dimorphisme (Gow et al., 2011).

1.11.2.2. Invasion tissulaire

La colonisation fongique se continue par la rupture de la surface épithéliale. Cette invasion tissulaire « hyphes-dépendante » fait intervenir deux mécanismes :

- ✓ Une endocytose induite et la production d'enzymes hydrolytiques « des protéases, lipases, phospholipases ou encore hémolysines ». Ces dernières vont faciliter la progression du micro-organisme au sein de la muqueuse, jusqu'à le sang.
- ✓ Une autre proposition a été discutée sur le passage de la cellule fongique par les jonctions serrées (Silva et al., 2012 ; Goyer et al., 2016).

1.11.2.3. Dissémination par voie hématogène

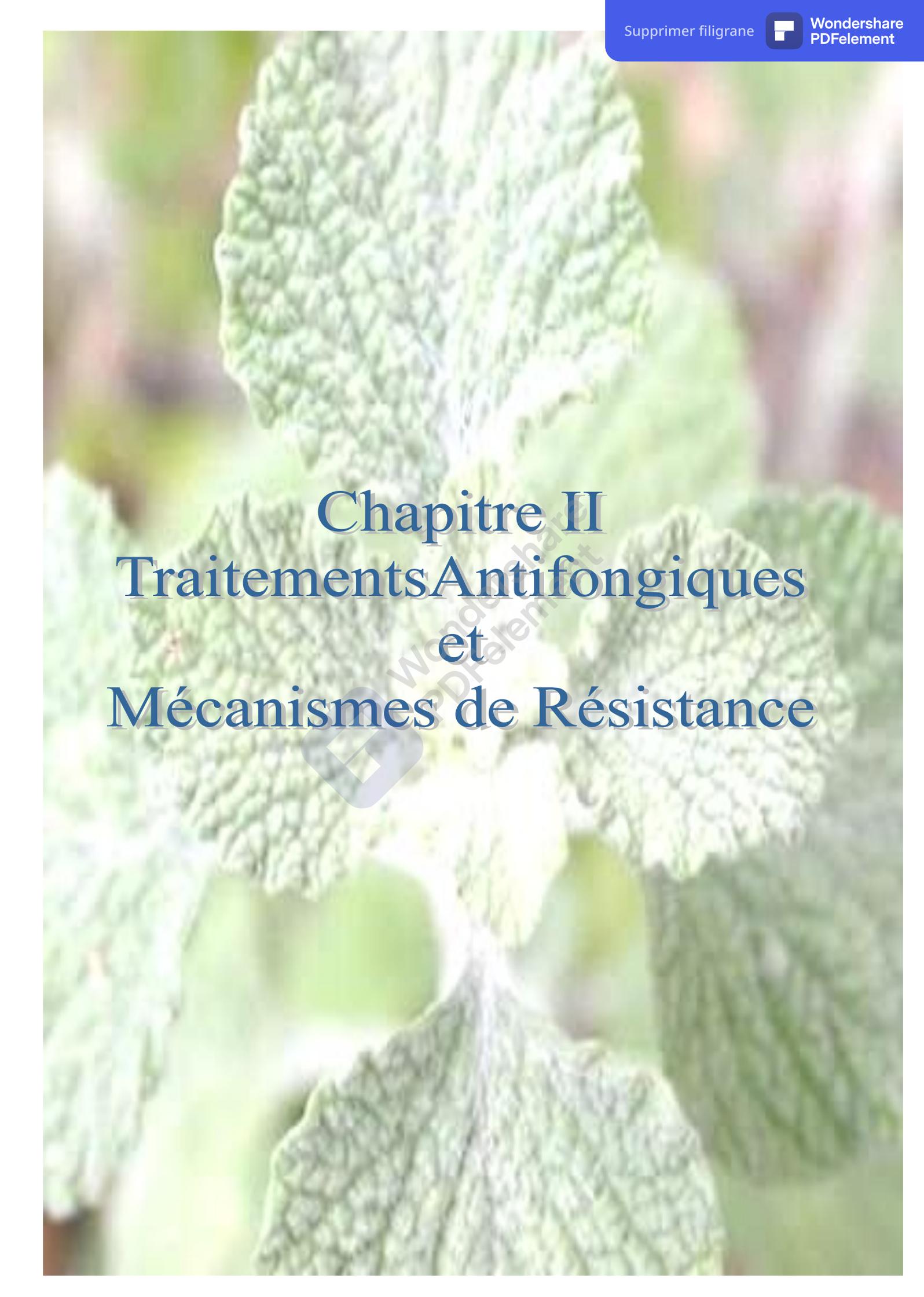
La translocation de *C. albicans* se fait par sa dissémination à d'autres organes tels que le rein, le foie et les poumons par exemple. Elle se fait par voies hématogène et lymphatique. Cette étape correspond à la candidose invasive. En effet, une fois cette étape atteinte, le taux de mortalité peut atteindre 40-50% (Silva et al., 2012 ; Goyer et al., 2016).

I.12. *Candida* et immunité innée

Une communication entre la cellule fongique et les cellules immunitaires de l'hôte s'instaure dès les premiers signaux de l'interaction. Les neutrophiles, les monocytes et les macrophages tissulaires expriment une série de récepteurs appelés Pattern Recognition Receptor « PRR », capables de reconnaître les enveloppes microbiennes. Ces ligands appelés Pathogen-Associated-Molecular-Pattern « PAMP », sont reconnus par trois classes de PRR :

- ✓ Les TLR (Toll-like Receptor);
- ✓ Les CLR (C-type Lectin Receptor) ;
- ✓ Les NLR (NODlike Receptor) (**Jouault et al., 2003 ; Netea et al., 2008**).

Concernant *C. albicans*, on peut citer les N- et O-glycanes présents sur les glycoconjugués pariétaux (le phosphopeptidomannane-PPM- et le phospholipomannane-PLM en particulier) ou les β -1,3 glucanes pariétaux (**Erwing & Gow, 2016**).

A close-up photograph of several green leaves with prominent veins, serving as a background for the title. A large, semi-transparent watermark is overlaid diagonally across the center of the page.

Chapitre II Traitements Antifongiques et Mécanismes de Résistance

II.1. Traitements antifongiques

L'infection à *C. albicans* ne nécessite pas un tel traitement dans le cas d'une colonisation asymptomatique, mais une attention assez régulière doit y être établie dans le cas des patients immunodéprimés. Par contre, une fois l'infection deviendra symptomatique, celle-ci doit être traitée. Un traitement antifongique a pour but d'éliminer ou d'empêcher la croissance des champignons causant l'infection (Martino et al., 1994).

II.2. Les médicaments antifongiques et leurs modes d'action

Avant les années 1990, seulement trois médicaments antifongiques étaient approuvés à administrer par voie orale ou intraveineuse : la flucytosine, l'amphotéricine B et le kétoconazole (Dismukes, 2000).

II.2.1. Inhibition de la synthèse de l'ergostérol

Cette catégorie comporte quatre (04) classes de médicaments: les allylamines, les azolés, les thiocarbamates et les morpholines. Ces substances inhibent la synthèse de l'ergostérol à différents stades lors de sa biosynthèse.

L'ergostérol est très similaire sur le plan chimique du cholestérol des animaux. Dans lequel, il représente la composante lipidique la plus essentielle des levures en assurant le bon fonctionnement de certaines enzymes (Georgopapadakou & Walsh, 1996; Sturley, 2000).

Par rapport les allylamines, ils contiennent que deux agents antifongiques : le nafiifine et le terbinafine. Le butcnafine est plutôt un benzylamine. Le tolnaftate est le seul représentant de la classe des thiocarbamates. Ces quatre agents sont des inhibiteurs de l'enzyme « squalène époxydase » (produit du gène ERG1) qui agit avant la voie de synthèse de l'ergostérol (Lees et al., 1995).

Cette enzyme est essentielle chez les levures et moisissures puisque son inhibition conduit à l'arrêt de multiplication, de reproduction aboutissant à la mort du champignon. L'effet de terbinafine est fongistatique pour *Candida Spp* ; mais il est fongicide (la mort de la cellule fongique) pour les champignons filamenteux (Jessup et al., 2000).

Lorsqu'il est combiné avec l'amphotéricine B ou d'autres inhibiteurs de la calcineurine, il devient fongicide pour certaines d'*Aspergillus spp* et de *Candida spp*. Le tolnaftate et Le naftifine sont des médicaments qui sont utilisés dans les cas des infections aux Dermatophytes. Bien que le butenafine ait présenté un bon effet contre le *Candida albicans* (Iwatani et al., 1993; Syed & Maibach, 2000).

Chapitre II Traitements antifongiques et Mécanismes de Résistance

Les azolés représentent la classe la plus importante de médicaments antifongiques, comportant une douzaine de substances différentes. Selon leur structure chimique, on distingue :

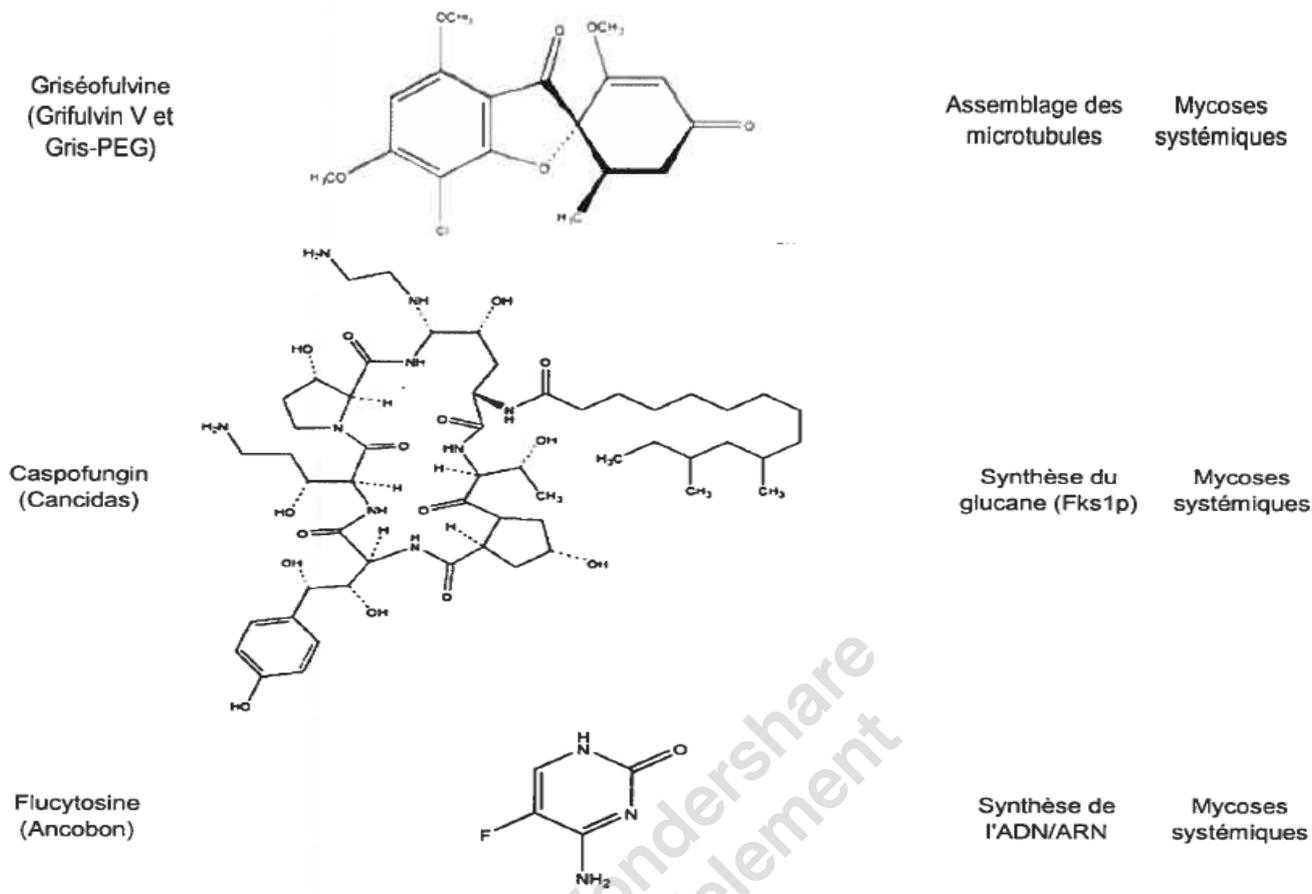
- Les imidazoles : comprenant le clotrimazole, le kétoconazole (KTC), l'oxiconazole, l'econazole, le miconazole et le tioconazole.
- Les triazoles : Ceux-ci comprennent le fluconazole (FLC), le terconazole l'itraconazole (ITC) et le voriconazole. Ces médicaments sont caractérisés par la présence d'un groupement pentacyclique contenant deux imidazoles ou trois triazoles atomes d'azote, dans lequel, un groupement benzène est lié par deux atomes de chlore ou de fluor (**Tableau 1**). Toutes ces substances inhibent lanostérol 14 α -déméthylase, encodée par le gène ERG 11 (aussi désignée CYP51) (**Georgopapadakou & Walsh, 1994**).

Chapitre II

Traitements antifongiques et Mécanismes de Résistance

Tableau 1 : Les traitements antifongiques, structure, cible et utilisation clinique.

Nom générique (de commerce)	Structure chimique	Cible cellulaire	Utilisation clinique
Terbinafine (Lamisil)		Synthèse de l'ergostérol (Erg1p)	Mycoses superficielles
Fluconazole (Diflucan)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Itraconazole (Sporanox)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Voriconazole (Vfend)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques
Kétoconazole (Nizoral)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Miconazole (Monistat)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses superficielles
Amorolfine (Loceryl)		Synthèse de l'ergostérol (Erg24p et Erg2p)	Mycoses superficielles
Amphotéricine B (Fungizone)		Membrane plasmique (lie l'ergostérol)	Mycoses systémiques
Nystatin (Nyotran)		Membrane plasmique (lie l'ergostérol)	Mycoses systémiques et superficielles



On trouve dans le corps humain une enzyme équivalente à Erg 11p et elle est très importante dans la voie de biosynthèse du cholestérol. Lorsqu'un médicament azolé est administré, il va y avoir une grande affinité pour l'enzyme fongique que pour l'enzyme humaine.

Un traitement antifongique à base d'un agent va conduire à une déplétion d'ergostérol accompagnée d'une accumulation de métabolites toxiques, soit les stérols méthylés. Une déplétion assez importante en ergostérol va influencer non seulement sur l'intégrité et la fluidité de la membrane plasmique, mais aussi sur la prolifération cellulaire (Georgopadakou & Walsh, 1996 ; Sheehan et al., 1999).

Dans les candidoses systémiques et mucocutanées, le fluconazole (FLC) est l'agent privilégié grâce à son excellent profil pharmacologique (sa nature hydrophile) en favorisant son administration orale qu'intraveineuse. Etant donné que le fluconazole est considéré comme un agent fongistatique puisqu'il est efficace contre *Candida spp.*, *Coccidioides spp* et *Cryptococcus spp.*, mais il n'a aucune utilité face aux moisissures pathogènes comme *l'Aspergillus spp.* Tandis que son efficacité est

très faible face à *C. glabrata* et le *C. krusei* ainsi que *l'Histoplasma capsulatum* et le *Blastomyces dermatitidis* (Wheat et al., 1997; Rex et al., 2000).

Le développement des imidazoles avait pour but d'accroître la spécificité de ces médicaments pour cette lanostérol 14 α -déméthylase fongique. Il est important de signaler que l'utilisation des imidazoles est limitée aux mycoses superficielles. Le KTC est prescrit que pour les cas de mycoses cutanées, grâce à sa toxicité d'une part et le caractère erratique de sa biodisponibilité qui est affectée par l'acidité gastrique d'autre part.

La toxicité des azolés est assez faible comparativement aux autres agents antifongiques. Il est important de signaler que l'ITC est fortement lipophile, donc il s'accumule dans les tissus lipidiques diminuant ainsi sa distribution vers les organes infectés.

Finalement, deux problèmes importants limitent l'utilisation des azoles, soient :

- L'apparition du phénomène de résistance et ;
- Leurs interactions avec d'autres médicaments co-administrés aboutissant à des situations cliniques néfastes (Dismukes, 2000).

Enfin, l'amorolfine qui bloque deux enzymes se situant en aval dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, soit Erg24p, une Δ^{14} stérol réductase, et Erg2p, une $\Delta^8 - \Delta^7$ isomérase. L'amorolfine peut servir contre la *C. albicans* et faire partie d'une combinaison avec d'autres médicaments antifongiques, tels les azolés, le griseofulvin et le terbinafine (Del Palacio et al., 1991; Polak, 1993).

II.2.2. Médicaments qui attaquent la membrane plasmique

On retrouve dans le groupe des polyènes l'amphotéricine B (AmB) et le nystatin. Ces molécules sont composées d'une chaîne d'hydrocarbure hydrophobe et d'une chaîne polyhydroxyle hydrophile. Grâce à leur liaison directe avec l'ergostérol favorisant ainsi la formation de pores au niveau de la membrane plasmique, ce qui augmente la perméabilité de la levure, entraînant la perte des constituants cytoplasmiques et par la suite la mort cellulaire. Par conséquent, les polyènes sont des médicaments fongicides à large spectre d'action (Ghannoum & Rice, 1999).

L'AmB et le FLC constituent à ce jour les deux médicaments les plus utilisés dans la plupart des types de candidoses. (Lortholary & Dupont, 1997; Rex et al., 2000). Malheureusement, les polyènes ne possèdent pas une affinité très élevée pour l'ergostérol, ce qui provoque chez les mammifères une toxicité assez élevée au niveau

des reins. Les effets secondaires à l'AmB déoxycholate se manifestent chez 70-90% des malades. Ces problèmes toxicologiques provoqués par l'AmB ont motivé les chercheurs afin de trouver des nouvelles molécules antifongiques comportant moins d'effets toxicologiques et meilleur profil pharmacologique, menant à la découverte des composés azolés.

Afin de réduire la toxicité de l'AmB, trois nouvelles formulations pharmacologiques ont été développées : soit la dispersion colloïdale, la formule liposomale et le complexe lipidique tout en signalant leur coût d'achat qui est assez important (Cagnoni et al., 2000; Lewis, 2005). De plus, des souches de *C. glabrata*, *C. krusei* et *C. lusitaniae* démontrent une résistance élevée à l'AmB.

Le nystatin est un composé dérivé de l'AmB. Dans lequel, ils présentent le même mécanisme d'action, mais la toxicité du nystatin est moins importante que celle de l'amB, particulièrement dans sa formule liposomale (voie intraveineuse). Le nystatin est efficace contre toutes les souches de *Candida spp.*, mais il est moins puissant par rapport à l'AmB. Etant donné que sa formule orale est très intéressante comme alternative à l'AmB chez les malades présentant des complications liés à la toxicité (Offner et al., 2004).

II.2.3. Médicaments qui affectent la synthèse du glucane

La classe des échinocandines comprend la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine. Ces agents antifongiques sont composés d'un noyau cyclique avec une chaîne latérale lipidique. Leur mode d'action agit au niveau de la synthèse du 1,3- β -glucane. Une diminution importante du glucane provoque un déséquilibre osmotique conduisant à la mort de la cellule fongique (Odds et al., 2003 ; Wiederhold & Lewis, 2003).

Les échinocandines ont une activité fongicide à large spectre d'action sur les champignons tels que : *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* et *Pneumocystis carinii*. La caspofungine est approuvée pour le traitement de candidoses et aspergilloses réfractaires aux azolés. Elle est aussi efficace que l'AmB, tout en étant beaucoup plus sécuritaire.

Par contre, la caspofungine ne possède pas une activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus spp.* ou *Fusarium spp.* Les deux autres échinocandines, soit la micafungine et l'anidulafungine, sont également très actives

contre des souches cliniques de *Candida spp.* résistantes aux azoles (Pfaller et al., 2005).

II.2.4. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ADN et l'ARN

Cette catégorie est représentée par la flucytosine (5- fluorocytosine). Cette molécule fluorée est considérée comme un inhibiteur métabolique chez plusieurs souches fongiques comme les *Candida spp.* et *C. neoformans*. La flucytosine pénètre dans la cellule grâce à une perméase de cytosine, elle est d'abord convertie en 5-fluorouracile par la cytosine déaminase puis modifiée par l'enzyme uracile phosphoribosyle transférase afin d'être introduite dans l'ARN provoquant ainsi un arrêt de la synthèse des protéines. Etant donné que la 5-fluorouracile est également converti en une substance inhibitrice de l'enzyme thymidylate synthase qui est impliquée dans la division cellulaire et dans la synthèse de l'ADN. On constate une utilisation limitée de la flucytosine grâce à l'apparition croissante de résistance à cet agent antifongique. Donc, il est recommandé de l'utiliser en combinaison avec d'autres agents. (Ghannoum & Rice, 1999 ; Pfaller et al., 2002 ; Odds et al., 2003).

II.2.5. Autres médicaments antifongiques

Cette substance insoluble dans l'eau peut être administrée par voie orale sous forme microcristalline. Son mécanisme d'action est probablement le blocage de l'assemblage des microtubules, provoquant ainsi une incapacité d'effectuer la mitose par la cellule fongique (Odds et al., 2003).

II.3. Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques

II.3.1. Définitions de la résistance

Le phénomène de la résistance aux antifongiques, qu'elle soit d'origine microbienne, pharmacologique ou clinique s'apparente à ceux décrits pour la résistance aux médicaments antiviraux, antibiotiques, et anticancéreux (Ghannoum & Rice, 1999).

II.3.2. Résistance clinique versus résistance microbienne

La notion d'une infection « résistante cliniquement » à un tel ou tel agent antifongique est désignée lorsque le médicament antifongique est administré mais l'infection persiste à cet agent (Sanglard & Odds, 2002). Il est possible que le champignon causant cette infection présente une sensibilité normale à ce médicament « in vitro ». Dans cette situation, d'autres facteurs interviennent afin d'expliquer cet échec clinique.

Parmi ces facteurs :

- Il y on a ceux qui proviennent du patient, l'état de son système immunitaire, un abcès mal-drainé, le site de l'infection, la mauvaise utilisation de la posologie.
- Il y on a d'autres liés aux paramètres pharmacologiques, tels la nature fongistatique du médicament, une dose inappropriée, une mauvaise absorption, les interactions indésirables entre les médicaments prescrits et leur distribution ou métabolisme (Canuto & Rodero, 2002). Il est important de signaler que la situation inverse est également connue, c'est-à-dire on observe une résistance « in vitro » du champignon à un médicament, mais dans l'autre côté, une réponse favorable au traitement chez le malade (Sanglard & Odds, 2002).

II.3.3. Résistance primaire versus résistance secondaire

Une fois les facteurs pharmacologiques et cliniques sont exclus, donc c'est les facteurs microbiologiques qui se mettent en cause afin d'expliquer l'échec thérapeutique. Ces facteurs comprennent :

- ✓ La résistance primaire « intrinsèque » ;
- ✓ La résistance secondaire « acquise » ;
- ✓ La charge fongique infectant le malade (Canuto & Rodero, 2002).

II.4. Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques chez *C. albicans*

II.4.1. Résistance aux azoles et autres inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol

Quatre (04) mécanismes moléculaires acquises peuvent expliquer la résistance secondaire aux azolés:

II.4.1.1. Une accumulation réduite des azolés à l'intérieur de la cellule

La difficulté des substances azolées à s'accumuler à l'intérieur de la levure est un phénomène qui a été montré chez plusieurs souches de *C. albicans*.

Il est important de signaler la différence entre la réduction de l'import de l'agent antifongique dans la levure et l'augmentation de son export (efflux) à l'extérieur de la levure. Des variations dans la cinétique de ces deux techniques « import-export » en expliquant l'accumulation réduite de l'agent et par la suite la résistance aux produits azolés (Sanglard et al., 1995).

Cependant, la majorité des chercheurs constatent que le transport actif des azolés expliquerait la résistance des levures aux azolés. L'import des azolés dans les *Candida* était considéré comme étant un processus passif, par contre, d'autres études suggèrent qu'il pourrait exister un processus actif pour les azolés. Des études

suggèrent que l'accumulation réduite des azolés chez plusieurs souches fongiques ayant présenté une résistance acquise serait probablement causé par la surexpression de transporteurs actifs (**Sanglard et al., 1995; Albertson et al., 1996**)

Chez des souches cliniques de *C. albicans*, il y a une forte corrélation entre :

- Les niveaux de résistance aux fluconazoles et ;
- Les niveaux d'expression du gène CDR1 (Candida drug resistance), faisant partie de la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette), et/ou du gène MDR1 (Multi drug resistance), qui appartient à la superfamille des facilitateurs majeurs (**Prasad et al., 1995; Sanglard et al., 1995**).

II.4.1.2. Une diminution de l'affinité entre l'enzyme Erg 11 p et les azolés

La modification de l'enzyme ciblée par les azolés est considérée comme le deuxième mécanisme de résistance, soit la lanostérol 14 α déméthylase (Erg11p). En effet, un changement au niveau des acides aminés causé par certaines mutations codantes ont pour effet de minimiser l'affinité entre Erg11p et les azolés, provoquant ainsi une diminution d'efficacité de ce groupe de médicaments.

Une comparaison a été faite entre des souches cliniques de *Candida albicans* résistantes aux agents azolés et leurs souches parentales sensibles afin d'étudier les séquences du gène ERG11 ; comme résultat, une grande quantité de mutations ont été découvertes. Certains chercheurs ont répertorié plus de 80 polymorphismes de ERG11 provenant de *C. albicans*, démontrant ainsi la grande variabilité allélique de ce gène (**Sanglard et al., 1998**).

II.4.1.3. Une augmentation des niveaux cellulaires de « Erg 11 p »

Le phénomène de surexpression du gène ERG11 est considéré comme le troisième mécanisme de résistance aux azolés. Cette technique a été observée chez *C. albicans* et *C. glabrata*, mais le niveau moyen n'excède jamais 3-5 fois de la totalité des souches sensibles parentales

Ce mécanisme peut s'expliquer soit par une augmentation du nombre de copies du gène (amplification génique) ou par une modification au niveau de la transcription de ce gène. La première possibilité n'a pas été observée chez *C. albicans* (**Sanglard et al., 1995; Lopez-Ribot et al., 1998**).

II.4.1.4. Une modification dans la voie de synthèse de l'ergostérol

L'impact de ce mécanisme est assez important si on considère qu'il entraîne la résistance à l'Amphotéricine B. La perte de fonction de l'enzyme stérol

$\Delta^{5,6}$ désaturase encodée par le gène ERG3 entraîne une accumulation d'ergosta-7,22-dienol qui est ensuite converti en stérol avec une structure différente de l'ergostérol en supportant la multiplication et la croissance fongique (Nolte et al., 1997).

II.4.2. Résistance aux polyènes

Dans le milieu hospitalier, il est difficile de rencontrer des résistances secondaires aux polyènes. Etant donné que certaines souches telles que *C. lusitaniae* et *Trichosporon spp.*, peuvent présenter une résistance microbienne primaire à l'Amphotéricine B. La résistance aux polyènes ce n'est qu'un résultat de mutations inactivant l'enzyme Erg3p. De plus, même une réduction dans la production d'ergostérol, favorise la résistance aux polyènes. D'autre technique pourrait également expliquer la résistance aux polyènes telle l'augmentation de l'activité d'une enzyme « catalase » contribuant à diminuer les effets des dommages causés par les polyènes (Nolte et al., 1997).

II.4.3. Résistance à la flucytosine

Une inactivation des enzymes nécessaires à l'action antifongique de cet agent, ou une anomalie dans la voie de synthèse des pyrimidines peuvent être la cause d'une résistance microbienne à ce médicament. La résistance microbienne primaire observée chez *C. krusei* et *C. glabrata* serait due à une défaillance au niveau des enzymes « cytosine perméase » ou « cytosine déaminase », alors que la résistance microbienne secondaire chez *C. albicans* et *Cryptococcus neoformans* serait le résultat d'une perte d'activité de l'enzyme « uracile phosphoribosyl transférase » (White et al., 1998 ; Hope et al., 2004).

II.4.4. Résistance aux échinocandines

La résistance clinique de *C. albicans* aux échinocandines reste un phénomène très rare.

In vitro, des souches mutantes de *C. albicans* ont été étudiées ; dans laquelle, cette résistance a été causée soit par mutagénèse, soit par choix de mutations spontanées à une fréquence basse. Par conséquent, la délétion du gène « FKS1 » responsable de la synthèse du β -1,3-glucane peut entraîner la résistance aux échinocandines.

Une autre technique de résistance à ces agents serait la surexpression du gène « CDR2 », encodant un transporteur ABC et causant ainsi la résistance aux agents azolés et autres inhibiteurs de synthèse de l'ergostérol.

Chapitre II Traitements antifongiques et Mécanismes de Résistance

D'autres techniques moléculaires pourraient être connues chez *C. albicans*. Certaines sont bien connues chez les procaryotes, par exemple la réduction de l'import et la modification de l'agent antifongique de façon intra- ou extracellulaire. Dans ce contexte là, « ALK8 » est un cytochrome P450 qui peut convertir les agents antifongiques en substances non-toxiques

Outre que les mécanismes cités précédemment, on peut signaler la présence d'autres techniques de résistance telles que : la régulation de l'homéostasie du calcium via la calcineurine, la défektivité mitochondriale chez certaines espèces, les changements sur le plan composition et la fluidité de la membrane plasmique (**White et al., 1998 ; Panwar et al., 2001 ; Sanglard et al., 2001**)

En fin, des mécanismes cellulaires peuvent expliquer la résistance microbienne aux traitements antifongiques par exemple le remplacement d'une souche sensible par une autre résistante dans l'endroit infecté ou bien le remplacement par une espèce beaucoup plus résistante que celle la première (**White et al., 1998**).

Chapitre II Traitements antifongiques et Mécanismes de Résistance

Tableau 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance secondaire chez les mycètes pathogènes (White et al., 1998 ; Panwar et al., 2001 ; Sanglard et al., 2001).

Mycètes pathogènes	Mécanismes de résistances ayant été observés chez des souches cliniques et/ou obtenues expérimentalement			
	Azolés	Amphotéricine	Flucytosine	Caspofungine
<i>Candida albicans</i>	Surexpression de pompes à efflux (CDR et MDR1) Mutation / Surexpression de l'enzyme cible des azoles (ERG11) Perte de fonction de l'enzyme stérol $\Delta^{5,6}$ désaturase (ERG3)	Modification ou diminution du contenu en ergosterol Augmentation de l'activité catalase	Diminution de l'activité de l'Uracile phosphoribosyl transférase Diminution de l'activité de la cytosine déaminase	Mutation de l'enzyme cible (FKS1)
<i>Candida glabrata</i>	Surexpression de pompe à efflux (CDR1 et PDH1)	Modification ou diminution du contenu en ergosterol	Résistance primaire - Mutation de la cytosine perméase	
<i>Candida krusei</i>	Résistance primaire -Sensibilité réduite de l'enzyme cible (ERG11)	Modification ou diminution du contenu en ergosterol	Résistance primaire	Mutation de l'enzyme cible (FKS1)
<i>Candida dubliniensis</i>	Surexpression de pompes à efflux (CDR et MDR1) Mutation / surexpression de l'enzyme cible des azoles (ERG11) Perte de fonction de l'enzyme stérol $\Delta^{5,6}$ désaturase (ERG3)			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Surexpression de pompes à efflux (AtrF et MDR1) - Sensibilité réduite de l'enzyme cible (ERG11)			
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Surexpression de pompes à efflux (AFR1 et MDR1) Mutation / surexpression de l'enzyme cible des azoles (ERG11)	Modification dans la synthèse de l'ergostérol	-Diminution de l'activité de l'Uracile phosphoribosyl transférase. -Diminution de l'activité de la cytosine déaminase.	Résistance primaire



A close-up photograph of a plant with green, textured, lobed leaves and small white flowers. The background is blurred, showing more of the plant and some green foliage. The text is overlaid on the center of the image.

Chapitre III

Le Marrube blanc

"*Marrubium vulgare* L."

III.1. Définitions des substances naturelles

Les plantes médicinales et aromatiques contiennent des molécules à haute valeur ajoutée sur le plan industriel, médical et pharmaceutique. Parmi lesquelles, on trouve les phénols, les flavonoïdes et les tannins (Rossi et al., 2007).

III.2. Composition chimique des plantes médicinales et aromatiques

La composition chimique des plantes aromatiques est assez complexe. Elle est constituée de deux fractions :

a)- La première fraction dite volatile (COV : Composés Organiques Volatiles) est présentée dans différents organes de la plante; elle est constituée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle. Ces métabolites sont présents dans les organes sécréteurs, des cellules génératrices afin de produire les terpènes, diterpènes, sesquiterpènes, aldéhydes les alcools, cétones et les esters terpéniques.

b)- La deuxième fraction dite non volatile (CONV : Composés Organiques Non Volatiles), est composée de flavonoïdes, coumarines ainsi de lactones sesquiterpéniques et polyphénols jouant un rôle principal dans les activités biologiques de la plante (Jabrane et al., 2009).

III.3. Etude botanique, structurale et culturelle

Les plantes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne, puisqu'ils s'en servent pour se nourrir et se soigner. L'utilisation de ces plantes à des fins thérapeutiques est rapportée dans la littérature antique arabe, égyptienne, chinoise et romaine (Saad et al., 1995). Ces dernières décennies, il y avait un grand intérêt sur l'étude des plantes médicinales et aromatiques et leurs utilisations traditionnelles à travers le monde.

L'Algérie parmi les pays méditerranéens qui utilisent des méthodes traditionnelles à base de plantes médicinales grâce à sa richesse en flore végétale et sa diversité (soit 600 espèces, sous espèces et variétés), ce qui lui donne une empreinte territoriale spécialement en plantes médicinales (Imamu et al., 2007).

III.4. *Marrubium vulgare L.*

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

III.4.1. Classification Biologique

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

Règne : *Végétal*

Embranchement : *Angiosperme.*

Classe : *Eudicotylédones.*

Sous-classe : *Gamopétale.*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiacées*

Genre : *Marrubium*

Espèce : *Marrubium vulgare L.*



Figure 11 : *Marrubium vulgare L.*

III.4.2. Description botanique

Le genre *Marrubium* comporte 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine. Le genre *Marrubium* est muni d'un calice à 10 dents, dont les 5 commissurales plus courtes, toutes terminées en pointe épineuse. C'est un Arbuste à tiges et face inférieure des feuilles blanches tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aigues. Les fleurs sont blanches. En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium deserti* de Noe : **(Quezel et Santa, 1963)**.

III.4.3. Propriétés physicochimiques

La partie aérienne du *M.vulgare* contient plusieurs métabolites tels que :

- Les diterpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques de *Marrubium vulgare* ;
- Les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) ;
- Plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que les verbascosides ;
- La présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, limonène) **(Wichtl & Anton, 2003)**.

III.4.4. Utilisations en médecine traditionnelle

Marrubium vulgare fut employé dans les industries afin de fabriquer des remèdes contre la toux. Plusieurs préparations indiquent l'utilisation curative de marrube. Il est utilisé aussi dans les inflammations des voies respiratoires, l'inappétence, quelques troubles tels que les ballonnements les flatulences.

La plante est très fréquemment utilisée en médecine traditionnelle comme antidiabétique, expectorant, diurétique, antispasmodique et en cas d'infections respiratoires. Elle est aussi employée pour combattre le problème d'obésité **(Glisic et al., 2007)**.

III.4.5. Aspect phytochimique

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les tanins.

III.4.5.1. Sesquiterpènes

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

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

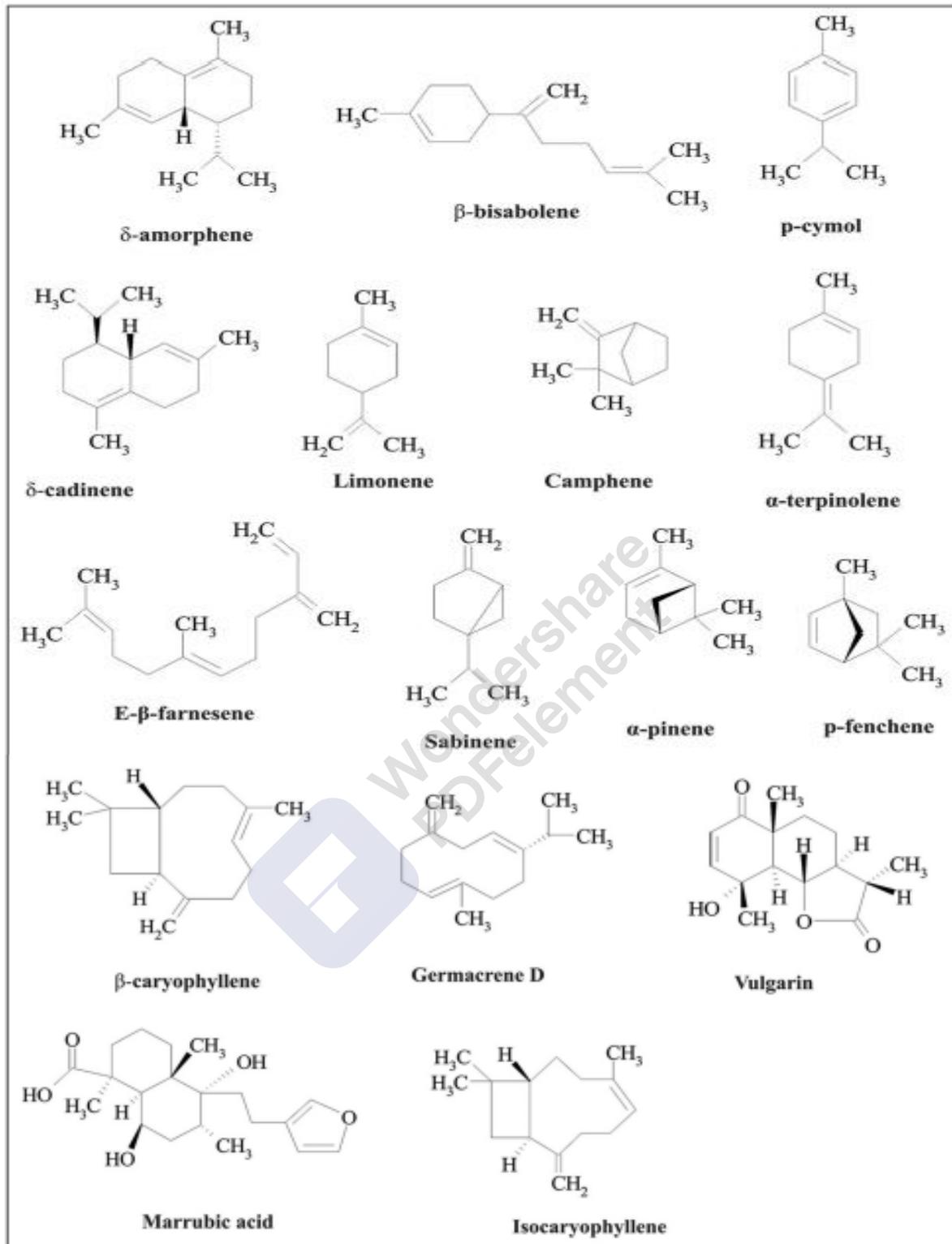


Figure 12 : Structures chimiques des mono terpènes et sesquiterpènes de *M. vulgare* (Lodhi et al., 2017).

III.4.5.2. Diterpènes

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

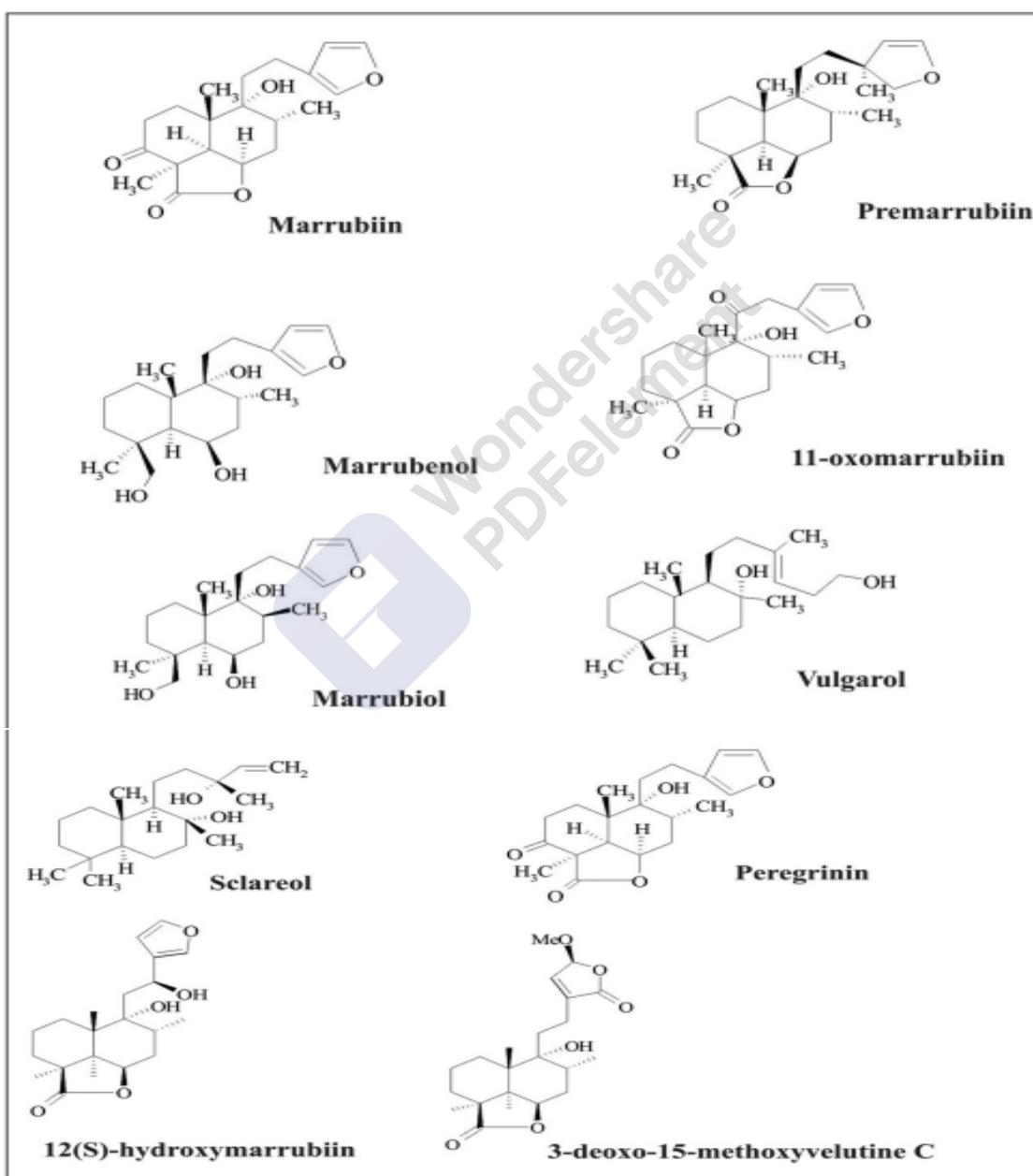


Figure 13 : Structure chimique de diterpènes de *M. vulgare* (Lodhi et al., 2017).

III.4.5.3. Triterpènes

Ces composés en C₃₀ sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être aliphatique, tétracycliques ou pentacycliques.

III.4.5.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (**Rice-Evans et al., 1996**). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes. Ces diverses structures se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

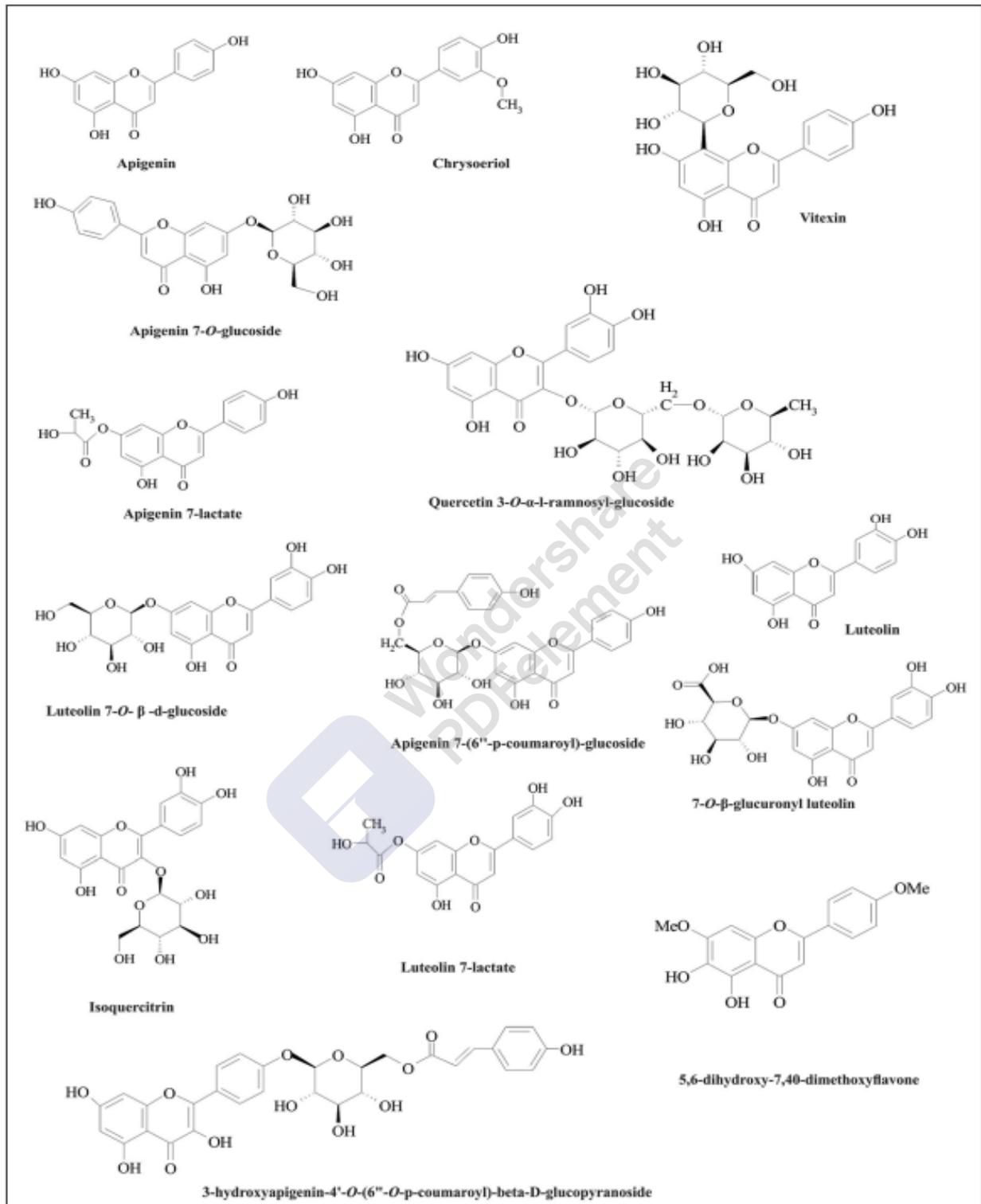


Figure 14 : Structure chimique de flavonoides de *M.vulgare* (Lodhi et al., 2017).

III.4.6.5. Tanins

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

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

III.4.7. Formes d'utilisations et posologies

La quantité par jour correspond à 4.5g de drogue. La durée du traitement est en moyenne de 2 semaines.

- Les tisanes (3 tasses par jour, matin, midi et soir avant les repas) sont préparées à partir d'une infusion de 1,5g de drogue dans 150 ml d'eau bouillante pendant 10 minutes. Les Teinture: 7.5 ml 3 fois par jour, matin, midi et soir avant les repas. Poudre totale cryobroyée : 1 gélule, matin, midi et soir avant les repas. Possible de prendre jusqu'à 5 gélules par jour. Extrait sec : Quantité d'extrait correspondant à 4.5g de drogue par jour. Soit 2 gélules par jour (**Raynaud, 2007**).

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

I.1. Objectifs

Ce travail a pour but de réaliser une étude phyto-chimique quantitative et qualitative de la plante *Marrubium vulgare L.*, d'apprécier l'effet toxicologique de son extrait alcoolique (méthanol) sur les rats mâles de race Wistar et enfin d'évaluer l'activité antifongique de cet extrait sur des rats rendus expérimentalement candidosiques.

I.2. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée dans quatre lieux :

- Laboratoire de Recherche, Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire « LBGMS » au sein de la FSNV- Université Mustapha Stambouli de Mascara ;
- Station expérimentale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara ;
- Laboratoire d'histopathologie de l'Etablissement Hospitalier Public (EPH) « Meslem Taib », Mascara ;
- Laboratoire des Micro-organismes Bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la Santé (LMBAFS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Pour répondre aux objectifs cités précédemment, un protocole expérimental a été suivi :

I.3. Matériel

I.3.1. Matériel végétal

Nous présentons ci-dessous les informations relatives à la récolte de l'espèce médicinale étudiée dans cette étude « *Marrubium vulgare L.* » (**Photo 1**). L'espèce sélectionnée a été collectée entre le mois de décembre 2014 et janvier 2015. La récolte est effectuée à Khalouia (35°27'34.76" Nord, 0°17'37.57" Est) à l'est de la wilaya de Mascara-Algérie (**Figure 15**).



Figure 15 : Carte géographique de la région de Khalouia-Mascara montrant l'endroit de récolte de *Marrubium vulgare L.*

Le Spécimen a été identifié par Pr. Benhouhou Salima- Professeur au laboratoire de Botanique, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie « ENSA », Alger- Algérie (**Photo 1**) et déposé à l'herbier du laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire sous le numéro « MV115/20 ».



Photo 1: *Marrubium vulgare L.*

I.3.2. Souche test

La souche de *C. albicans* utilisée dans ce travail a été isolée à partir des sécrétions vaginales d'une femme atteinte d'une infection vulvo-vaginite au niveau de l'établissement public hospitalier « EPH Yesaad Khaled- Mascara ».

I.3.3. Les animaux

Cette étude a été réalisée sur 40 rats males, de race *Wistar* dont le poids était compris entre 100 ± 20 g et présentant une génération descendante d'une race qui n'a subi aucun traitement médical. Les animaux ont été élevés au sein de l'animalerie de la station expérimentale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Mustapha Stambouli de Mascara. Les procédures utilisées durant cette étude sont en accords avec la Directive Européenne concernant les Tests sur les Animaux (2010/63/EU). Les rats sont logés avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité (La salle est éclairée 12/24h car l'éclairage à une influence sur le comportement, la reproduction et la physiologie des mammifères).

I.4. Méthodes

I.4.1. Préparation du Matériel Végétal

La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante récoltée a ensuite été séchée à l'abri de la lumière, puis broyée en poudre pour une utilisation ultérieure (Figure 16).

I.4.2. Préparation de l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare*

Pour l'extraction des polyphénols, des solutions méthanoliques ont été employées selon la méthode décrite par (Boutlelis & Bordjiba, 2014).

50g de plante sèche rendu en poudre placé dans un récipient en verre, couvert de 1000ml de MeOH aqueux 70% (7 : 3), le tout est chauffé à 70°C pendant 5 mm. L'échantillon est laissé macérer durant une nuit (24 heures). Après une première filtration sur papier filtre, le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un Rota vapeur, à la température de 50°C. Enfin, L'extrait est stérilisé par filtration et conservé à + 4°C.

Matériels et Méthodes**Matériel végétal sec****broyé**« *Marrubium vulgare L.* »

Chauffage au bain -marie à 70°C pdt 5 mn

Macération 24H

Filtration

Evaporation à sec (50°C)

Séchage dans l'étuve (45°C)

Récupération du solvant

Extrait Méthanolique de *Marrubium vulgare* « *EMMV* »

Figure 16 : Protocole d'obtention de l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* selon (Boutlelis & Bordjiba, 2014).

I.4.3. Rendement de l'extrait méthanoïque

Le rendement a été calculé comme étant le rapport entre la masse (g) de l'extrait obtenu et la masse de la matière végétale à étudier (Alwashli et al., 2012).:

$$R = (m/m_0) \times 100$$

$$\left\{ \begin{array}{l} R : \text{Rendement en extrait (g/100g)} ; \\ m : \text{Quantité d'extrait récupéré en (g)} ; \\ m_0 : \text{Quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en (g)}. \end{array} \right.$$

I.4.4. Etude phytochimique

I.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été effectué en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de (Singleton & Rossi, 1965). En milieu alcalin, les polyphénols réduisent ce réactif en oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleu.

200 µl de l'extrait a été mélangé à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois. L'incubation était faite à une température ambiante pendant 4 minutes. Après addition de 800 µl de bicarbonate de sodium à (7.5%) au mélange, les polyphénols totaux étaient déterminés après 2 heures d'incubation à 30°C. L'absorbance a été mesurée au $\lambda = 765$ nm avec un spectrophotomètre UV-VIS. La quantification a été faite en utilisant une courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par 1g de la matière sèche.

La teneur en composés phénoliques de l'EMMV a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligramme par gramme de la plante sèche équivalent en acide gallique (mg EAG/ g) par l'équation type : $y = 0.101x - 0.096$ (Figure 17).

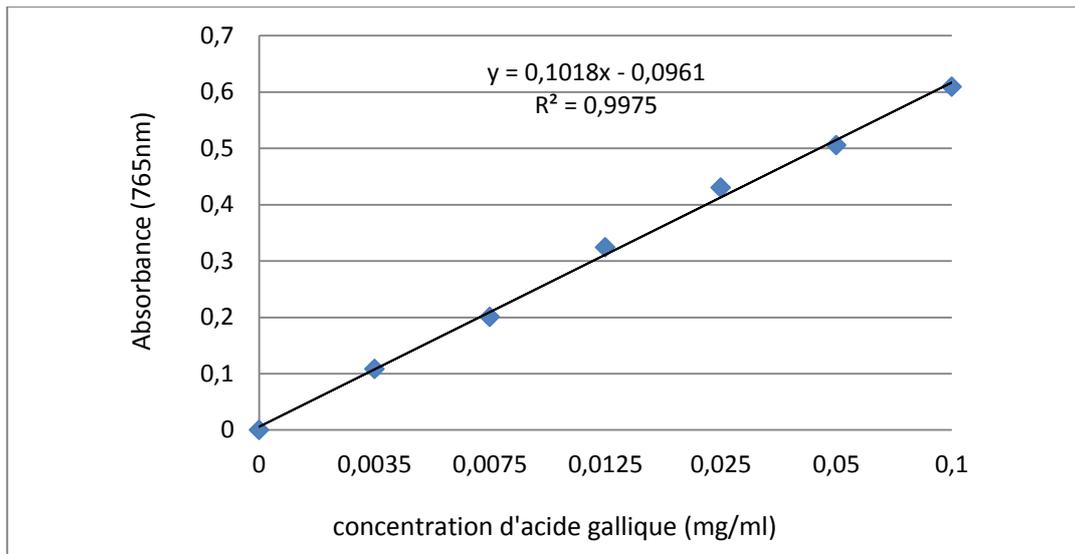


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux.

I.4.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Une quantité de 500 µl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait alcoolique (méthanol) est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée.

Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5% est ajouté au mélange. Après 5mn, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (dissous au méthanol) est rajouté. Après 10 minutes d'incubation à une température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) est additionné. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre a été mesurée à une $\lambda = 510$ nm contre le blanc. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la catéchine. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine par 1g de la matière sèche (**Zhishen et al., 1999**).

La teneur en flavonoïdes de l'EMMV a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine et exprimée en milligramme par gramme de la plante sèche équivalent en catéchine (mg EC/ g) par l'équation type : $y = 0.307x - 0.284$ (**Figure 18**).

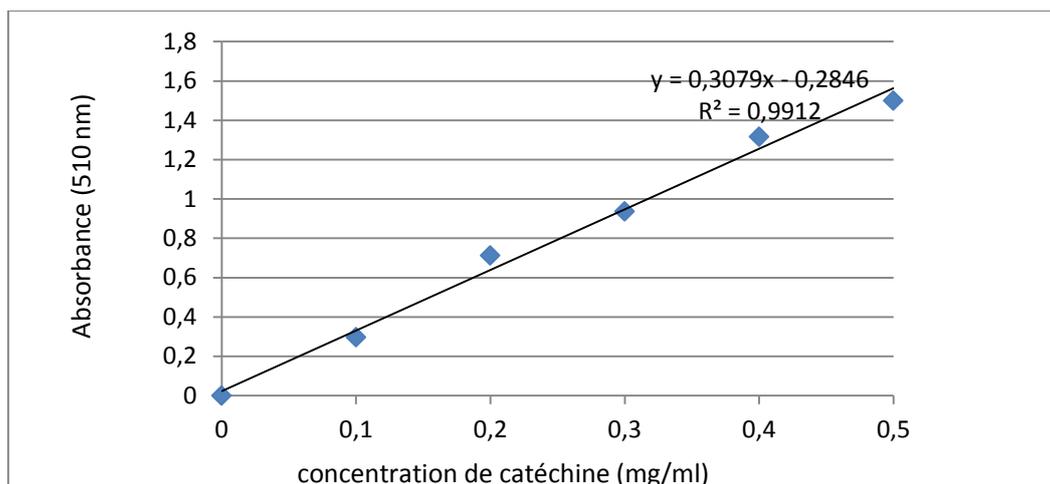


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour la détermination des flavonoïdes totaux

I.4.4.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline. En effet, la vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 550 nm de longueur d'onde.

Un volume de 50 μ l de l'extrait brut est ajouté à 1500 μ l de la solution vanilline/méthanol (4%) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 μ l de l'acide chlorhydrique concentré est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 mn. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine (mg EC) par 1g de la matière sèche (**Julkunen -Titto, 1985**).

La teneur en tanins condensés de l'EMMV a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine et exprimée en milligramme par gramme de la plante sèche équivalent en catéchine (mg EC/ g) par l'équation type : $y = 0.027x - 0.025$ (**Figure 19**).

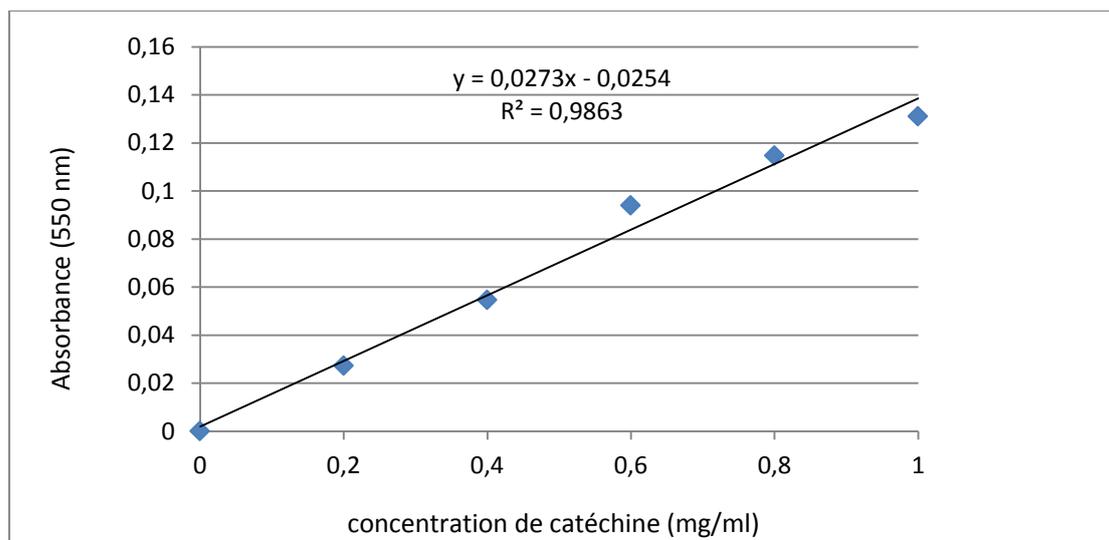


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour la détermination des tanins condensés.

I.4.4.4. Analyse par HPLC-DAD-ESI-MS

L'analyse chromatographique « **HPLC-DAD-ESI-MS** » de l'*EMMV* a été réalisé au niveau de laboratoire des Micro-Organismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, en collaboration avec Dr Mokhtar M., maître de conférence à la FSNV- Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem.

Les analyses HPLC-DAD sont effectuées à l'aide d'un appareil Shimadzu-system (Prominence i. LC-2030C 3D) équipé d'une pompe de chromatographie liquide de haute pression 1525 binaires munis d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD) et d'un spectromètre de masse Quadrupol équipé d'une interface d'ionisation ESI. Les analyses ont été réalisées en phase reverse avec une colonne C18 (2.7 μm , 150 x 4.6 mm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La température a été maintenue à 25°C et le volume d'injection choisi était 5 μl . Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 0.7 ml/min.

Les conditions chromatographiques étaient : phase mobile A: eau + acide acétique; B: méthanol+ acide acétique. Gradient: 0-5min: 2% B, 5-120 min: 2-100% B. Le détecteur UV à barrette diode (DAD) est réglé sur les signaux entre 200 nm et 800 nm en plaçant le détecteur à 280 nm. Des chromatogrammes d'ion total (CIT) ont été saisis en mode négatif et positif. (Mokhtar et al., 2015).

I.4.5. Purification, Préparation et Calibrage de la Souche

I.4.5.1. Isolement et Identification de *C. albicans*

Dans un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) et à l'aide d'un écouvillon, l'isolement a été réalisé sur une boîte pétri contenant Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (**Annexe**) + 0.05% de chloramphénicol comme un antibiotique est ensemencée. L'identification a été réalisée selon (**Kurtzman & Fell, 1998**).

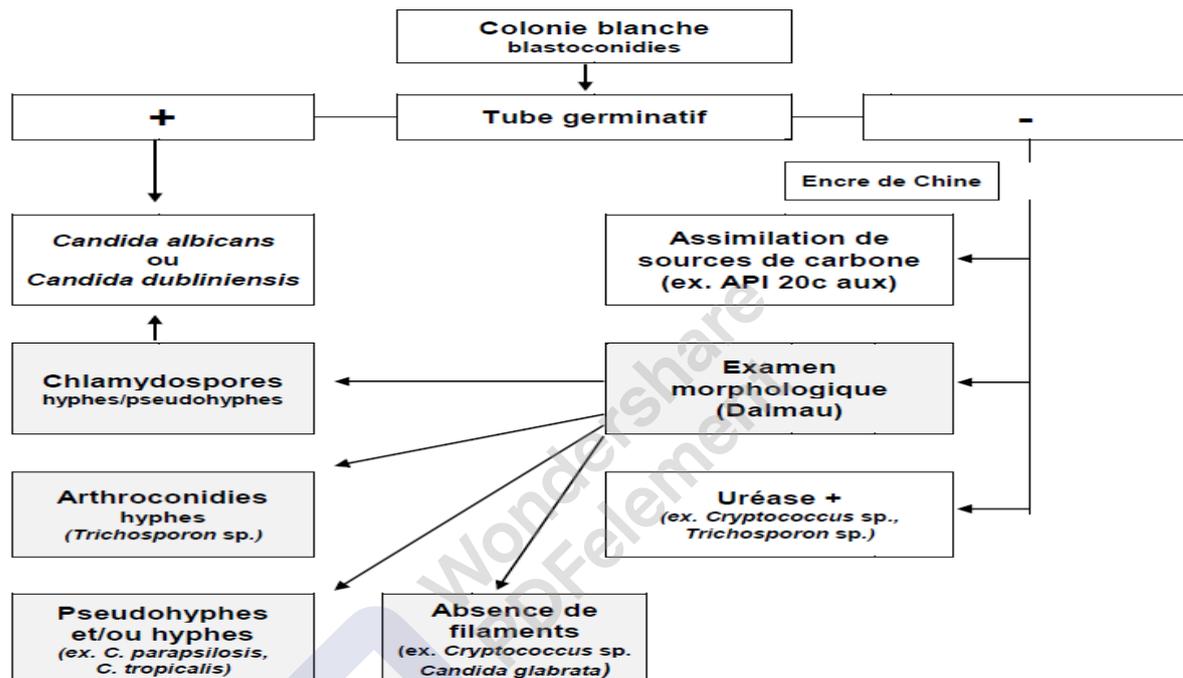


Figure 20 : Schéma d'identification de *C. albicans* (**Kurtzman & Fell, 1998**).

I.4.5.2. Lecture

Les colonies de *C. albicans* apparaîtront blanches et lisses après incubation à 37°C pendant 48h (**Kurtzman & Fell, 1998**).

I.4.5.3. Examen microscopique

A partir des colonies blanches, lisses, une colonie a été prélevée et disposée dans une lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène comme éclaircissant, en utilisant le grossissement X40 et X100.

I.4.5.4. Test de blastèse ou filamentation sur sérum

Une suspension fongique de 0.5 ml est rajoutée à 0.5 ml d'un sérum humain, le mélange est incubé 3-4 h à 37 °C. Ensuite, réalisation d'un état frais et recherche de tubes germinatifs spécifiques de *Candida albicans* (**Mackenzie, 1962 ; Auger & Joly, 1977**) (**Figure 21**).

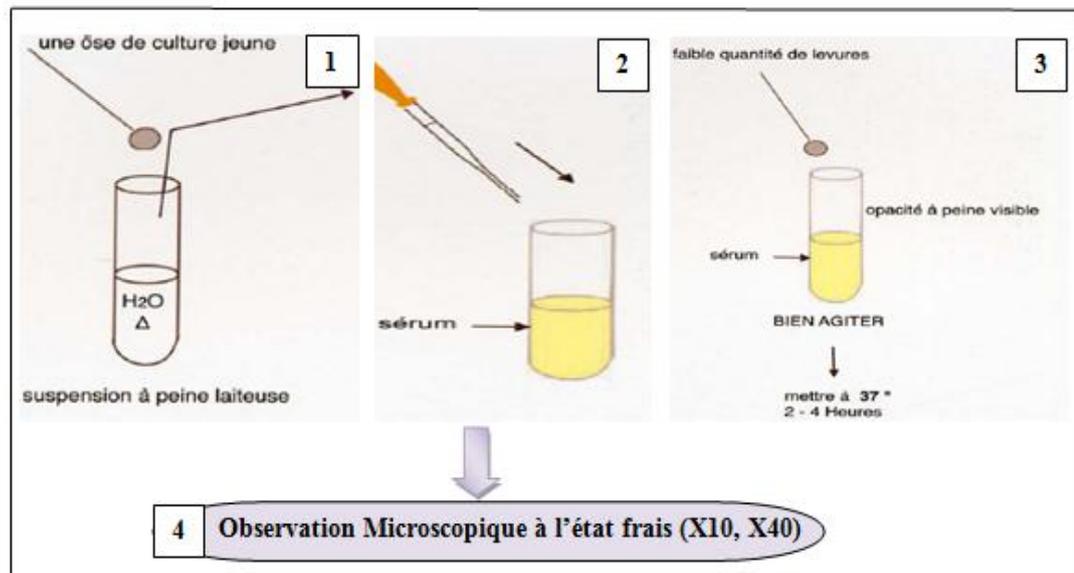


Figure 21 : Test de Filamentation sur Sérum « Test de Blastèse »

I.4.5.5. Api ® Candida

➤ **Préparation de la galerie**

On réunit le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 0.5ml d'eau distillée stérile pour créer une atmosphère humide.

➤ **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune de 18 à 24h, on prélève une ou plusieurs colonies identiques bien isolées à l'aide d'une pipette et on réalise une suspension fongique qui doit être bien homogénéisée en utilisant une ampoule d'API NaCl 0.85 % selon les recommandations de **(Biomérieux® SA, France)**.

I.4.6. Pré culture

A partir d'une culture de *C. albicans* sur un milieu solide SDA + chloromphénicol (Sabouraud Dextrose Agar), une colonie est prélevée à l'aide d'un enseigneur et placée dans un erlenmeyer contenant 50 ml de milieu YEPD liquide (**Annexe**). Celui-ci est placé dans un bain Marie agitateur à 30°C pendant 18 heures. Le chloramphénicol à 0.05% est rajouté au milieu YEPD liquide pour éviter une contamination par les bactéries (**Mellado et al., 2000 ; Noumi et al., 2011**).

I.4.6.1. Préparation des cellules lavées

Un volume de 3ml de préculture est sédimenté par centrifugation à 2000 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans un volume égal de tampon phosphate (PBS). Les cellules sont ainsi lavées 3 fois et resuspendues dans du PBS (**Annexe**)

Matériels et Méthodes

puis ajustées à une $DO_{520\text{ nm}} = 0.4$ correspond à une concentration de 10^8 cellules / ml ; une dilution a été faite (1/10) pour arriver à une concentration de 10^7 cellules / ml (Mellado et al., 2000 ; Noumi et al., 2011) (Figure 22).

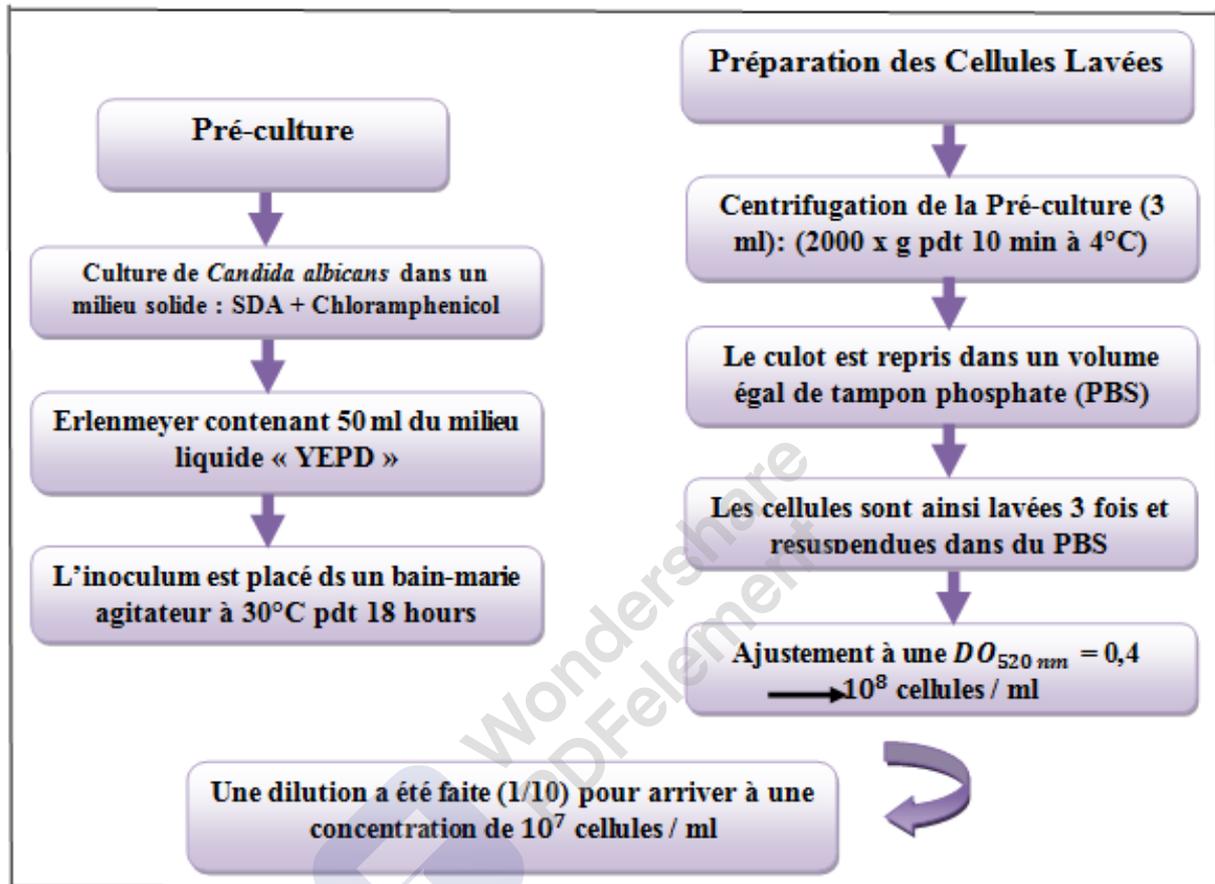


Figure 22 : Préparation de l'inoculum de *C.albicans*.

I.4.7. Animaux

I.4.7.1. Accouplement

Après accouplements, les rats sont mis d'une façon individuelle dans des cages en plastique avec un support par *ad libitum* en eau et nourriture (**Annexe**).

Les cages en plastique sont remplies par le scieur afin de garder une température optimale pour les rats et être facilement nettoyables pour assurer des meilleures conditions hygiéniques. Notons que les femelles gestantes sont ensuite séparées dans des cages individuels jusqu'à la mise bas.

I.4.7.2. Conditions d'élevage

Il est important de signaler que la station expérimentale de la FSNV-Université Mustapha Stambouli de Mascara possède un endroit très calme avec un environnement protégé à l'abri des bruits, menu d'un système d'aération et de ventilation afin de ramener l'air pur d'une part et de réduire les odeurs, la poussière, l'humidité excessive et la chaleur d'autre part. Le laboratoire ainsi que tout le matériel qui entoure les rats ont été préalablement désinfectés.

Ces paramètres constituent des points critiques à maîtriser car ces facteurs d'une part ou de l'autre, peuvent exercer un effet direct sur l'hygiène de vie et le bien être des rats :

- Le froid diminue la fertilité et retarde la puberté;
- Augmentation de la température peut provoquer la mort de certains rats, d'une augmentation de la mortalité embryonnaire, de stérilité et d'une diminution de la lactation.



Photo 2: L'élevage des rats au cours de l'expérimentation

I.4.8. Etude de la Toxicité Subaigüe

I.4.8.1. Choix de la dose

Afin de tester l'activité antifongique de l'*EMMV*, il était important d'évaluer son effet toxicologique sur les animaux. La dose d'extrait de 800 mg / kg utilisée dans le traitement curatif a été choisie en se référant à la littérature (**Elberry et al., 2015**) et à partir des études préliminaires (au cours de publication) à court terme dans le laboratoire « LBGMS » . Dans un premier temps, les rats mâles de race wistar ont reçu trois doses différentes de l'*EMMV*: 100 (n=6), 250 (n=6), 500 (n=6) mg / kg par jour, pendant une période de 4 semaines.

L'étude de la toxicité subaigüe a révélé le caractère non toxique de l'extrait. Les rats traités avec différentes doses de *M. vulgare* n'ont montré aucun signe physique de toxicité d'origine médicamenteuse pendant toute la période expérimentale. Selon ces études, nous avons décidé d'augmenter la dose à 800 mg / kg afin de tester l'effet toxicologique de notre extrait et d'évaluer par la suite son activité antifongique.

I.4.8.2. Répartition des lots

Les rats sont répartis en deux lots (lot A, lot B), chaque lot est constitué de dix (10) rats males :

- **Lot A « Témoin = Placebo » (n=10)** : recevant par voie orale (par gavage), 1 ml d'une solution d'eau distillée (**Alwashli et al., 2012**).
- **Lot B « Essai » (n=10)** : recevant par voie orale une solution de l'*EMMV* dilué dans 1ml d'eau distillée à raison de 800mg/kg/j pendant 28 jours (**Elberry A. et al., 2011**). Ce groupe représente le fantôme dans ce protocole, à partir du quel on jugera la toxicité subaigüe de l'extrait administré.

I.4.8.3. Administration de l'*EMMV* par voie orale

Les 2 Lots de rats ont été mis à jeun pendant 24 h et les différentes solutions sont administrées par voie orale, au volume de 1 ml. L'administration est réalisée par gavage à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire pendant 28 jours au cours desquels sont notées les variations de poids corporel, les signes de toxicité éventuels (modifications comportementales dans et hors cage, chute de poils, éruptions, larmolement, manifestations digestives et autres, ainsi que le taux de mortalité (**Directives de l'OCDE & CCPA ; Olfert et al., 1998**) (**Photo 3**).

Matériels et Méthodes



Photo 3: Administration journalière de 800 mg/kg d'EMMV (v.o.)

I.4.8.4. Morbidité et mortalité

Après l'administration journalière de l'EMMV par voie orale à une dose de 800 mg/kg, les rats sont observés pendant 28 jours. La mortalité et la morbidité sont notées. Les principaux signes recherchés sont : **(Directives de l'OCDE & CCPA).**

- Comportement locomoteur et exploration ;
- Contraction abdominale ;
- Comportement du soin corporel ;
- Comportement de consommation ;
- Respiration : changement de rythme ;
- Diarrhée.

I.4.8.5. Détermination du poids corporel

Au cours de la période d'expérimentation, tous les rats (Témoin + Essai) sont pesés quotidiennement à l'aide d'une balance électrique **(Huberd et al., 2008).**

I.4.8.6. Sacrifices des animaux

Après 8 heures de jeun et avant d'entamer le sacrifice, les rats ont été pesés. Ensuite, ils sont anesthésiés par inhalation de chloroforme dans un dessiccateur pendant quelques minutes dans des meilleures conditions hygiéniques **(Ronald et al., 1993 ; Huberd et al., 2008) (Figure 23).**

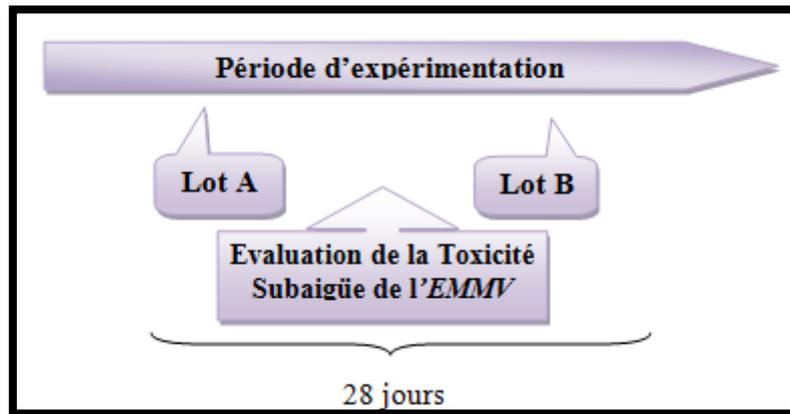


Figure 23 : Protocole d'évaluation de la toxicité subaiguë.

I.4.8.7. Prélèvement des Organes et Etude Histologique

Une simple laparotomie a été réalisée et les différents organes (Foie, Rate, Rein, Cœur, Poumon, Intestin et Colon) des rats (Témoin + Essai) ont été prélevés minutieusement dans des conditions aseptiques (**Photo 5**) puis pesés à l'aide d'une balance électrique et déposés dans des flacons contenant du formol (10%) pour l'étude histologique (**Huberd et al., 2008**) (**Photo 6**).

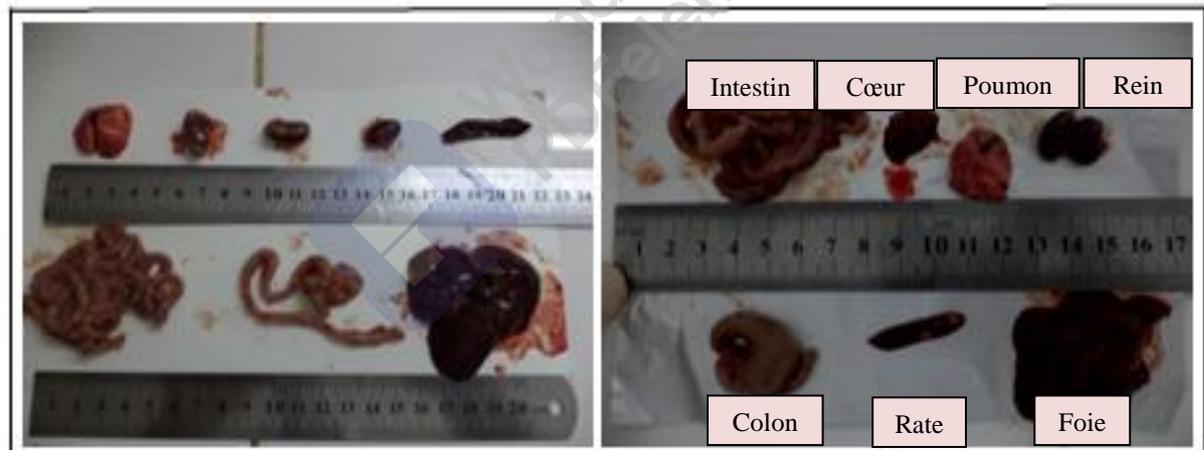


Photo 4: Prélèvement des Organes



Photo 5 : Fixation des pièces

Les étapes suivantes ont été réalisées au niveau de laboratoire d'anatomopathologie de l'Etablissement Public Hospitalier « EPH : Meslem Taib- Mascara » en collaboration avec Dr B. Khelladi :

I.4.8.7.1. Déshydratation

Au niveau du laboratoire, les pièces du pilulier ont été tirées, mises dans des cassettes à inclusion.

Avant de les inclure dans de la paraffine, les pièces doivent être soigneusement déshydratées. La déshydratation est réalisée automatiquement via un appareil spécial. Cet appareil comporte plusieurs flacons déposés en série et remplis d'alcool à concentration croissante (70%, 80%, 90%, 100%) et de xylène pur selon un ordre bien déterminé ou les cassettes contenant les pièces vont séjourner successivement pendant des durées variables.

Le temps total de passage des pièces dans le technicon est de 16h, après cette période les pièces sont récupérées pour passer à l'inclusion.

I.4.8.7.2. Inclusion

Le paraffinage à lieu grâce a un appareil muni d'un compartiment alimente en chaleur pour faire couler la paraffine (65°C), et d'une plaque refroidissant sur laquelle est mis un moule métallique contenant les cassettes ou les pièces sont mises a nu. Une fois les pièces couvertes de paraffine liquide sont laissées refroidir sur une plaque à froid, ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes.



Photo 6: Inclusion des prélèvements à la paraffine

I.4.8.7.3. Coupe des pièces

Cette étape permet d'obtenir des coupes destinées à l'examen au microscope. Ces coupes doivent être minces pour que la lumière les traverse aisément et avoir une solidité suffisante pour être manipulées.

Pour cela un microtome à avance mécanique et couteau d'acier est utilisé qui permet de faire passer les pièces à couper devant la lame, à chaque passage celui-ci enlève une tranche d'épaisseur variable (4 à 6 μm).

Mettre en place la cassette sur le microtome, convenablement orientée, pour présenter correctement la face à couper devant la lame. Celui-ci est à son tour placé et orienté de façon à attaquer la pièce après quelques passages. Pour enlever l'excès de paraffine, lorsque la pièce est affranchie et qu'elle paraît complète dans la coupe sur toute son étendue, on règle l'épaisseur avec un dispositif spécial. Le mouvement remis en marche, à chaque passage de la pièce, il se fait une coupe qui se colle automatiquement au bord de la coupe précédente. Ce qui nous permet d'obtenir un ruban de coupe (**Huberd et al., 2008**).

Le ruban fractionné est porté dans un bain-marie à + 35°C pour permettre un bon étalement et éviter la formation des plis, puis sur une lame de verre par des aiguilles, La lame est mise dans un plateau, prête pour la coloration.

Les lames ont été toutes marquées sur leur bord pour porter la nature du tissu considéré à l'aide d'un crayon à diamant.

I.4.8.7.4. Coloration

La coloration est obtenue en plongeant la coupe dans des bains colorants comme suite :

Matériels et Méthodes

- 1-** Déparaffiner la coupe : Plonger la lame dans le premier bain de xylène pendant 20mn, puis dans le second pendant 20mn, pour dissoudre la paraffine.
- 2-** Hydrater la coupe : Pour faire disparaître le xylène faire passer la lame dans deux bains d'alcool absolu pendant des durées de 3 mn. Faire passer la lame dans l'eau courante, puis dans l'eau distillée.
- 3-** Coloration a l'hématoxyline : Plonger la coupe bien hydratée dans un bain d'hématoxyline pendant 5 mn, faire un lavage à l'eau courante puis la faire passer dans l'eau distillée.
- 4-** Coloration a l'éosine : Plonger la lame dans le bain d'éosine pendant 3 mn, puis effectuer un lavage à l'eau courante.
- 5-** Déshydratation : Faire passer la lame dans l'alcool absolu, puis dans le xylène, ensuite la plonger dans un bain de xylène pendant 3 mn.
- 6-** Montage : Déposer une goutte d'une solution permettant l'adhésion sur la lame, et présente une lame couvre- objet propre et sèche en l'inclinant progressivement de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air. La solution ne doit pas déborder, la lamelle est adhérente et la préparation prête pour l'observation microscopique.
- 7-** Observation au microscope et prise de photos : les lames passent ensuite a l'observation au microscope optique à différents grossissements X100, X400. Un tri judicieux a été réalisé puis les lames sont prises en photo numérique.

I.4.9. Effets des extraits alcooliques (méthanol) de *M.vulgare* sur les rats infectés par *C.albicans*

Afin d'apprécier l'efficacité de l'EMMV, un protocole expérimental a été établi (Figure 23) :

Au total 30 rats mâles de poids entre 100 ± 20 g ont été sélectionnés pour cette étude. Les rats sont répartis en trois lots :

- **Lot A₁ « Témoin : Placebo » (n =10)**: recevant par voie orale (par gavage), 1 ml d'une solution d'eau distillée stérile (Alwashli et al., 2012).
- **Lot C « Infecté et Traité » (n =10)** : recevant 200 μ l d'un inoculum de 10^7 ufc / ml de *Candida albicans* par gavage puis traité avec une dose de 800 mg/kg/j par voie orale pendant sept (7) jours. Le traitement a commencé 72h après l'inoculation de la souche de *Candida albicans* (Chami, 2005) (Figure 24).
- **Lot D « Infecté et Non Traité » (n =10)** : recevant 200 μ l d'un inoculum de *Candida albicans* de 10^7 cellules / ml au jour 0, non traité par l'extrait méthanoïque de *M.vulgare* et suivi dans les dix (10) post inoculations.

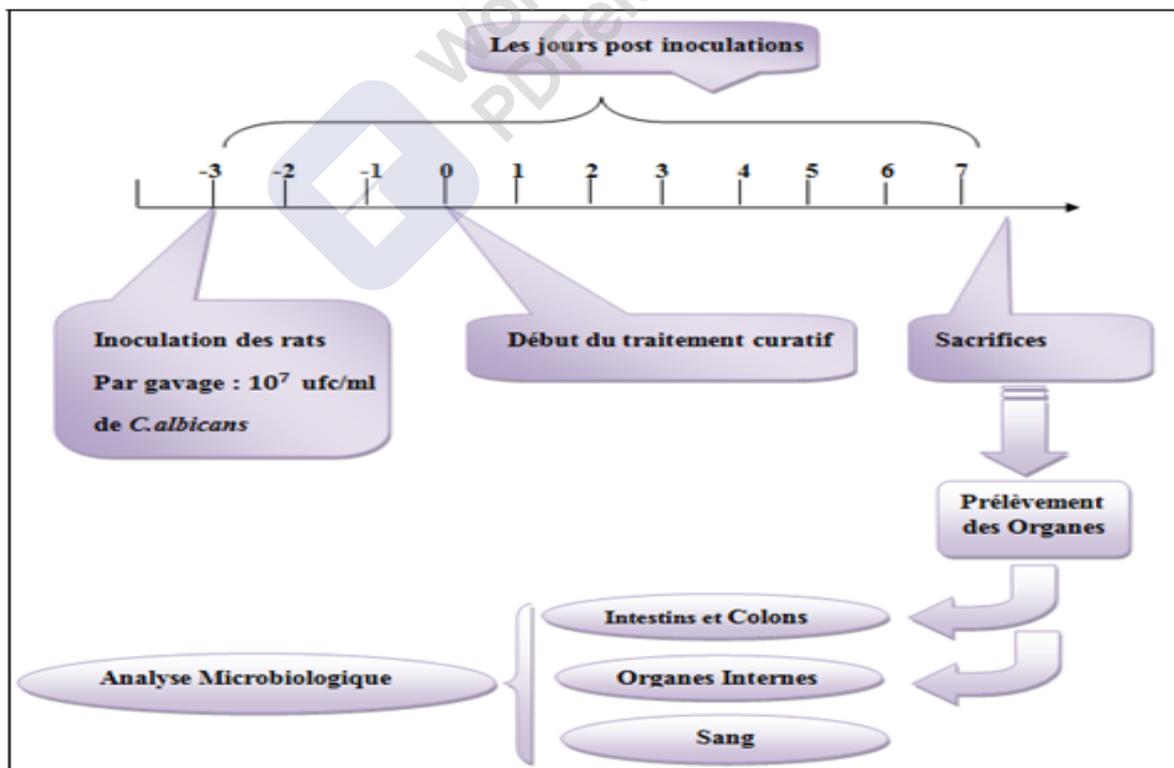


Figure 24 : Protocole expérimental du modèle de la candidose chez les rats wistar traités avec 800 mg/kg d'EMMV.

Les animaux sont pesés au cours de l'expérimentation, la morbidité et la mortalité ont été recherchées.

I.4.9.1. Sacrifices des animaux

Le sacrifice a été réalisé au bout de 7^{ème} jour après le traitement. Les animaux sont anesthésiés par inhalation de chloroforme dans un dessiccateur pendant quelques minutes dans des meilleures conditions hygiéniques (**Ronald et al., 1993 ; Huberd et al., 2008**) (**Figure 22**).

Après sacrifices, une simple laparotomie est effectuée et les prélèvements des organes (Foie, Rate, Rein, Cœur, Poumon, Intestin et Colon) sont réalisés.

I.4.9.2. Prélèvement du Sang

Le sang a été prélevé par ponction cardiaque (**Suzuki et al., 1988**), un aliquote est récupéré dans des tubes éppendorf stériles pour les analyses microbiologiques.

La quantification du degré d'infection et la détermination de l'efficacité du traitement curatif ont été effectuées par une analyse microbiologique.

I.4.9.3. Analyse microbiologique

I.4.9.3.1. Recherche et dénombrement de *Candida albicans* dans l'Intestin et le Colon

Les intestins et les colons ont été prélevés et coupés en morceaux, ensuite hachés avec un scalpel, dilués dans NaCl stérile à 0.9% et homogénéisés avec un arracheur (Ultra-Turrax) dans des conditions stériles. Les dilutions des broyats ont été étalées sur Sabouraud dextrose agar (SDA), et incubées pendant 48h à 37 °C, puis le nombre d'UFC / g est déterminé (**Mellado et al., 2000 ; Algin et al., 2005**) (**Figure 24**).

I.4.9.3.2. Translocation de *Candida albicans* dans les Organes Internes

L'évaluation de la charge fongique dans les organes internes est faite par les broyats des organes (Foie, Rate, Rein, Cœur et Poumon) ainsi que dans le sang après 10 jours post inoculations.

Les organes ont été prélevés, coupés en morceaux et hachés avec un scalpel, dilués dans NaCl à 0.9% et homogénéisés avec un arracheur (Ultra-Turrax). Les dilutions des broyats d'organes ont été étalées sur Sabouraud dextrose agar (SDA), et incubées pendant 48h à 37 °C, puis le nombre d'UFC / g de l'organe est déterminé (**Mellado et al., 2000 ; Algin et al., 2005**) (**Figure 24**).

Matériels et Méthodes

Le sang (100 µl) est transféré dans des tubes eppendorfs puis dans des boîtes pétri contenant SDA + chloramphénicol (0.05%). Après l'incubation à 37°C pendant 24 - 48h, le nombre d'UFC / 100 µl est déterminé (Noumi et al., 2011).

Le dénombrement de *C. albicans* par gramme de tissu a été calculé par des dilutions en série ont été préparées dans le but de trouver les concentrations appropriées pour compter le nombre de colonies en utilisant la formule suivante selon (Algin et al., 2005).

$$\text{Charge fongique} = \frac{\text{UFC dénombrées} \times \text{Facteur de dilution} \times 10 \times 2}{\text{Poids du tissu}}$$

Après l'incubation des boîtes à 37°C pendant 48 h, des colonies blanches et lisses (examen macroscopique) associées avec la formation d'un tube germinatif (examen microscopique) confirment la présence de *C.albicans* (Figure 25).

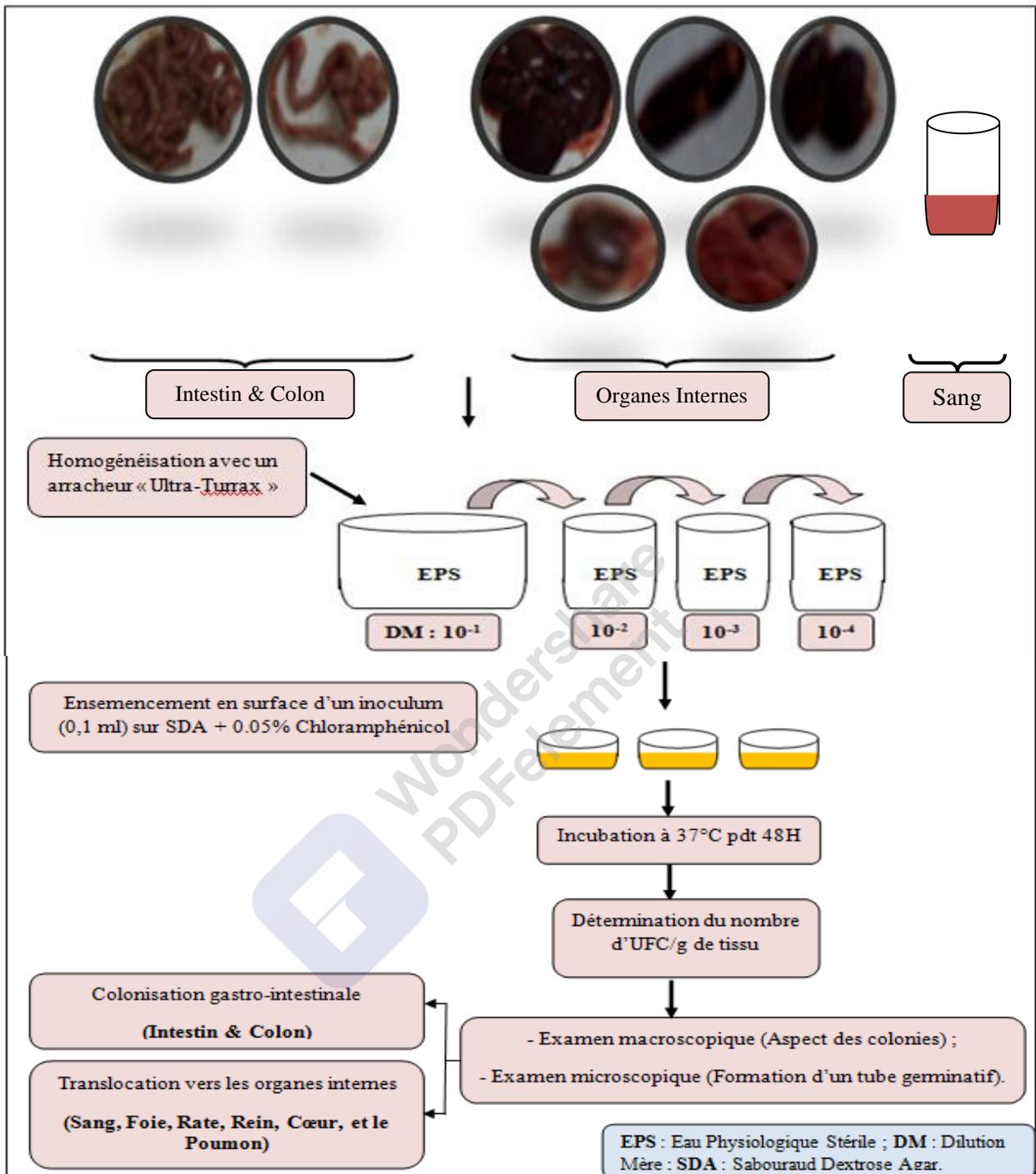
Matériels et Méthodes

Figure 25 : Recherche et Dénombrement de *Candida albicans* dans les organes internes.

I.4.10. Analyse Statistique

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Les résultats sont traités par le logiciel R (3.4.2), ce dernier est un logiciel de statistique créé par **(Ihaka & Gentleman, 1996)**. L'analyse ANOVA multivariée a été réalisée sur les résultats ; dans lequel : les 5 groupes (Groupe A, A₁, B, C et D), les organes, les rats et les jours ont été traités comme des facteurs fixes. Le test « t » de Student non apparié est utilisé afin de déterminer la différence entre les groupes A.

L'analyse des principaux composés (APC) a été réalisée, combinée avec la comparaison multiple (Tukey Post Hoc) afin de déterminer la différence entre groupes (A, C et D) sur le nombre d'UFC dans les organes.

Un ($p < 0.05$) est considéré comme significatif.



Résultats et Discussion

II.1. Extraction, Dosage et Identification des composés phénoliques

II.1.1. Rendement

L'extraction des polyphénols par la méthode d'affrontement par solvant organique à partir du broyat de la plante « *Marrubium vulgare* », montre que l'extrait méthanolique représente une moyenne de $21 \% \pm 1.98$ par rapport au poids du matériel végétal.

Kanyonga et al. (2011) ont obtenu un rendement de 39.2% de l'EMMV alors que le groupe d'**EL Berry et al. (2011)** ont noté un taux de 12%.

Cette disparité n'est que relative et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique d'une part et la partie utilisée de la plante d'autre part (**Amessis Ouchemoukh et al., 2014**).

II.1.2. Etude phytochimique

Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont des composés phytochimiques les plus importants des plantes. Vu leurs effets pharmacologiques, leur dosage a été effectué en utilisant le méthanol. Ce dernier est fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques. Nous pouvons dire que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible de métabolites. Tandis que les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, n'ont pas la capacité d'extraire le maximum de molécules bioactives à cause de la présence de l'eau contenue dans le tissu végétal.

II.1.2.1. Dosage des phénols totaux

D'après ces résultats, l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* est très riche en polyphénols (106.96 ± 14.35 mg EAG /g) ; l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* contient une teneur en polyphénols plus faible comparée aux résultats obtenus par d'autres études, ceci est peut être lié au climat de la région ou à la méthode utilisée qui ne donne pas une composition quantitative complète des extraits (**Tableau 3**). .

Ibrahim et al. (2016) ont constaté que le meilleur rendement en polyphénols était par l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction puisqu'ils ont trouvé un taux de 385 mg/g de la plante sèche ce qui est largement supérieur par rapport d'autres solvants comme l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'éther de pétrole avec un taux de 320, 140 et 30 mg/g respectivement. Quoique certains auteurs comme **Rezki et al. (2020)** parlent sur l'effet de la salinité sur le taux des composés phénoliques dans les plantes médicinales.

Kozyra et al. (2020) ont trouvé un taux de phénols totaux : 19.00 mg GAE/g d'extrait. Ils ont confirmé que la variation dans le taux de polyphénols chez plusieurs études est due aux conditions géographiques, origine de la plante ainsi qu'à la polarité des solvants d'extraction.

D'après Amessis Ouchemoukh et al. (2014) il y a plusieurs facteurs influençant la composition aussi bien qualitative que quantitative de l'extrait végétal ; dans ce volet, la solubilité des polyphénols-type du solvant, leur polymérisation y compris les paramètres intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (conditions environnementales et de stockage) affectent d'une part ou de l'autre sur le matériel végétal.

II.1.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

D'après ces résultats, l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* est riche en flavonoïdes (3.93 ± 0.43 mg EC /g) (**Tableau 3**) ; l'extrait alcoolique (méthanol) du *Marrubium vulgare* contient une teneur plus ou moins faible comparée aux résultats obtenus par d'autres études.

II.1.2.3. Dosage des tannins condensés

D'après ces résultats, l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* est riche en tanins condensés (5.38 ± 0.32 mg EC /g) (**Tableau 3**) ; l'extrait alcoolique (méthanol) du *Marrubium vulgare* contient une teneur plus ou moins faible comparée aux résultats obtenus par d'autres études.

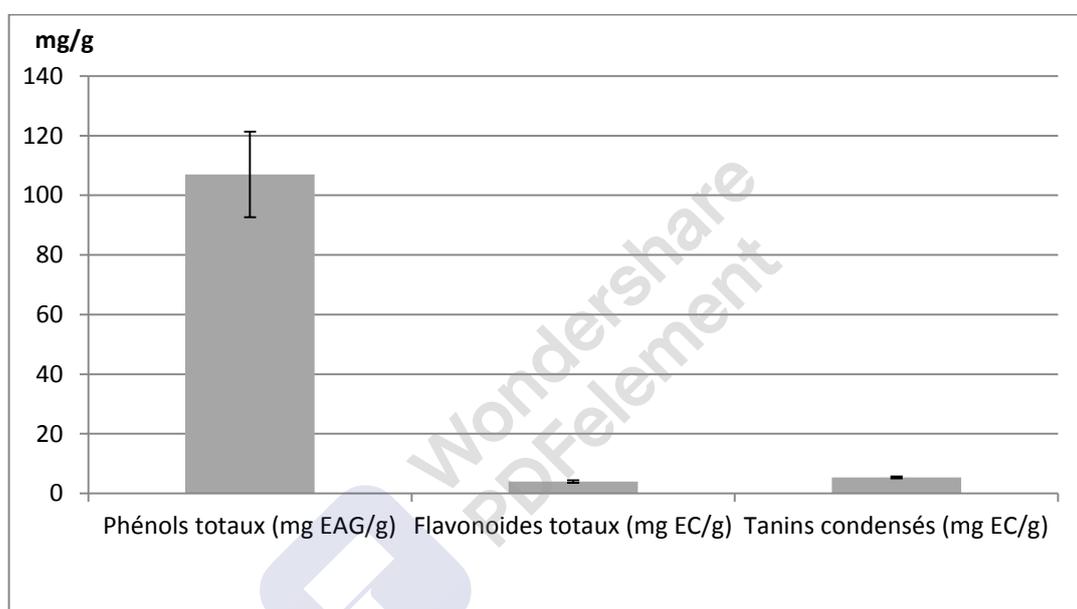
Tableau 3: Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins condensés dans *M. vulgare*.

	Phénols totaux ^a	Flavonoïdes totaux ^b	Tanins condensés ^c
<i>Marrubium vulgare L.</i>	106.96 ± 14.35	3.93 ± 0.43	5.38 ± 0.32

^a Valeurs exprimées en « mg » équivalent d'acide gallique par gramme de la plante sèche ;

^b Valeurs exprimées en « mg » équivalent de catéchine par gramme de la plante sèche ;

^c Valeurs exprimées en « mg » équivalent de catéchine par gramme de la plante sèche.

**Figure 27 :** Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins condensés des extraits alcooliques (méthanol) de *M. vulgare* (mg/g de la plante).

Youcefi et al. (2014) ont réalisé une étude phyto-chimique sur l'*EHMV* afin d'apprécier son pouvoir cardioprotecteur ; d'après leurs résultats, le taux de phénols et flavonoïdes totaux étaient 6.05 g équivalent d'acide gallique et 36.13 mg équivalent de quercétine par 100g de *M.vulgare*. Alors que le résultat de **Firuzi et al. (2010)** a présenté une valeur de 4.6 ± 0.2 mg équivalent de catéchine par 1g de *M.vulgare* avec un rendement de 11.9%. **Amessis Ouchemoukh et al. (2014)** ont rapporté des valeurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins avec respectivement : 40.57 mg EAG/g, 10.249 mg EQ/g et 32.407 mg EAT/g de la plante sèche.

Contrairement au travail réalisé par **Amri et al. (2017)** dans lequel, les valeurs ont été légèrement basses avec 6.02 mg EAG/g en polyphénols et 45.21mg EC/g en flavonoides respectivement. Alors que **Fathiazad et al. (2017)** ont obtenu un taux de 62.5 g EAG/100g et 1.62 g EC/100g de la plante sèche. Tandis que **Bouterfes et al. (2016)** ont trouvé un rendement de 3.8% pour les flavonoides.

L'étude de **Assimovich et al.**, dans laquelle, ils ont rapporté un taux de Phenols : 44.89 mg EAG/g de plante sèche de *M.vulgare* tandis que le taux en Flavonoides atteint 24.60 mg EQ/g de plante sèche tout en signalant sa richesse en polyphénols tels que : les acides phénoliques, phénylpropanoïdes, esters et flavonoides. Dans le même contexte, leur estimation en acides cinnamiques était 14.09 mg/100mg de la plante sèche, avec un rendement en tannins (7%) et un taux de 16.55 mg catéchine /100g de la plante sèche par rapport aux tanins condensés. Les mêmes chercheurs ont signalé l'absence d'acide rosmarinique d'une part et la présence des huiles essentielles en quantité minimales d'autre part. Parmi les flavones aglycones, la détection d'apigénine, luteoline, chrysoeriol et diosmétine et des flavone glycosides, l'identification de vicénine II et vitexine avec d'autres dérivés, tels que les lactoylflavones, luteoline-7-lactate et apigénine7-lactate.

Bouterfes et al. (2016) ont été intéressés par les conditions d'extraction idéales en terme de la concentration du solvant, la température et la durée d'extraction afin d'obtenir le taux le plus élevé en polyphénols, en flavonoides et en tanins condensés ; par conséquent, ils ont constaté qu'avec un rapport de « méthanol (60%)-25°C-180mn » il y aura un taux plus élevé en phénols (293.34 mg EAG/g) de la plante sèche ; alors que un rapport de « méthanol (80%)-20°C-450mn » : un taux plus élevé en flavonoides (79.52 mg EC/g) de la plante sèche et un rapport de « méthanol (60%)-50°C-180mn » : un taux plus élevé en tannins condensés (28.15 mg EC/g) de la plante sèche.

Ces substances bioactives jouent un rôle primordial dans diverses pathologies ; dans ce contexte, **Paunovic et al. (2016)** ont démontré que le constituant phénolique majeur identifié c'était bien l'acide férulique, ce dernier est reconnu dans le traitement de maladies cardiovasculaires, neurologiques « Alzheimers », métaboliques « Diabètes » et le cancer. Etant donné que ces principes actifs parfois présentent un

effet létal sur les cellules cancéreuses en diminuant la quantité d' H_2O_2 et en provoquant le stress oxydatif chez les cellules cancéreuses.

II.1.2.4. HPLC-DAD-ESI-MS

Dans le but d'identifier les substances bioactives d'origines végétales, l'utilisation combinée de la chromatographie en phase liquide (LC) couplée avec l'UV-Visible et le détecteur à barrettes diode (DAD) ainsi que l'ionisation à pulvérisation électronique (ESI) et la spectrométrie de masse (MS) est à ce jour une démarche essentielle qui permet l'acquisition d'importantes données analytiques sur le plan quantitatif mais aussi qualitatif. Les résultats de cette analyse sont représentés dans la **figure 28**.

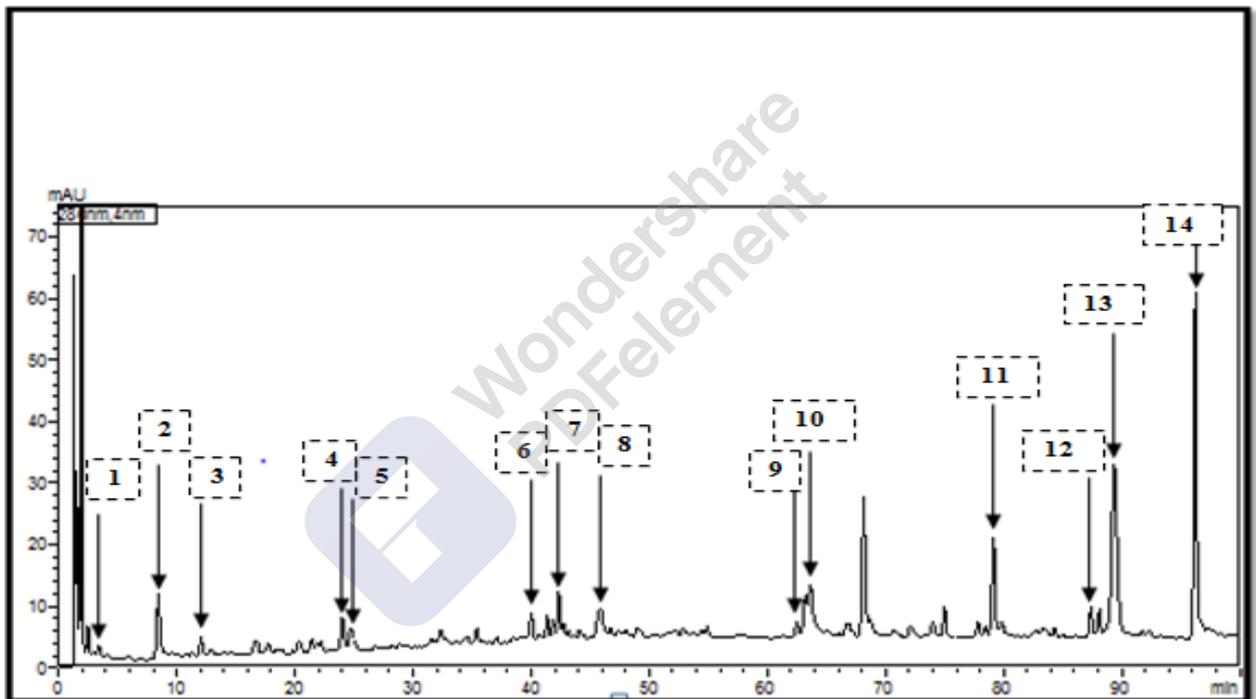


Figure 28: Chromatogramme (HPLC-DAD-ESI-MS) de l'EMMV.

Tableau 4 : Temps de Rétenion des Standards

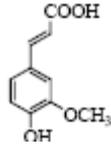
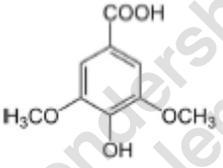
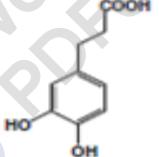
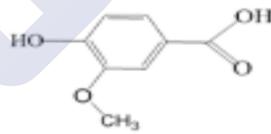
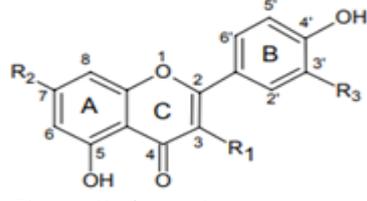
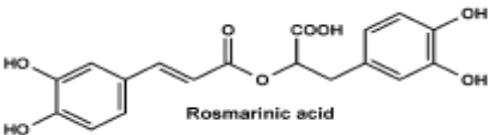
Pick	T _R	Lambda max	m/z	Composé
1	3.40	258	137	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
2	8.444	283	193	<i>trans</i> -Ferulic acid
3	12.07	279	197	Syringic acid
4	24.015	323	181	hydrocafféic acid
5	24.730	283	329	Vanillic acid glucoside
6	40.022	272. 335	577	Apigenin 7-O-rutinoside
7	42.326	276. 331	359	Rosmarinic acid
8	45.837	276. 356	609	Rutin
9	63.220	286. 338	267	Apigenin
10	63.629	286. 330	423	Verbascoside
11	79.144	288. 346	579. 285	Luteolin-7-O-glucoside
12	87.404	282. 342	285	Lutéoline
13	89.362	284. 362	741. 285	Kaempferol-3-glucoside
14	96.228	278	359. 197	Syringic acid hexoside

La comparaison des temps de rétention des standards (**Tableau 4**) avec ceux enregistrés dans le chromatogramme (**Figure 28**) permet l'identification de différents composés dans l'*EMMV*. Le chromatogramme est divisé en trois parties:

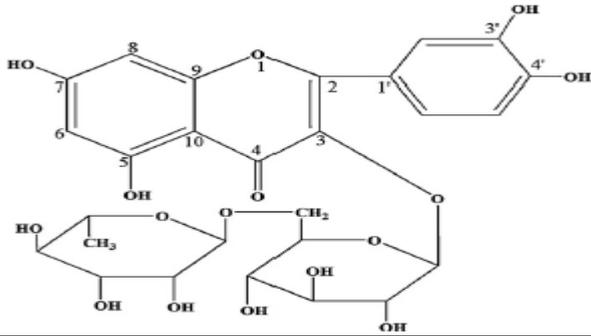
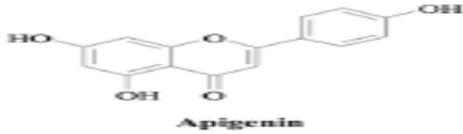
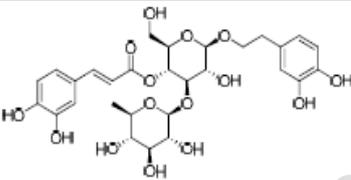
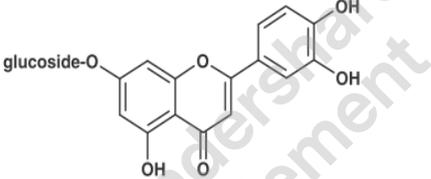
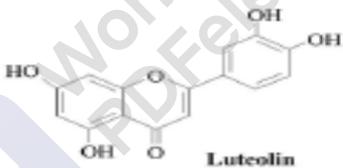
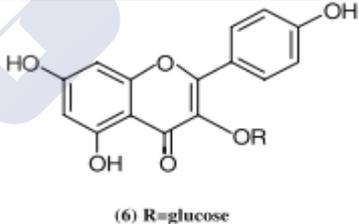
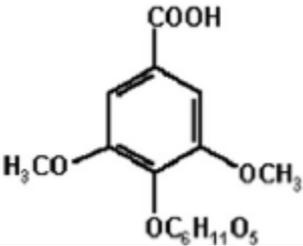
- La première de 3.40 à 24.730 mn ; dans laquelle: acide *p*-hydroxybenzoïque (3.40 mn), acide *trans*-férulique (8.444 mn), acide syringique (12.07 mn), acide hydrocafféique (24.015 mn) et acide vanillique glucoside (24.730 mn) éluent progressivement.
- La deuxième partie entre 40.022 et 63.629 mn; dans laquelle : apigénine 7-O-rutinoside (40.022 mn), l'acide rosmarinique (42.326 mn), la rutine (45.837 mn), apigénine (63.220 mn) et le verbascoside (63.629 mn).
- La troisième partie est celle de la lutéoline-7-O-glucoside (79.144 mn), la lutéoline (87.404 mn), kaempférol-3-glucoside (89.362 mn) et l'acide syringique hexoside (96.228 mn).

Après le résultat d'analyse chromatographique (HPLC-DAD-ESI-MS) et à la lumière de la littérature, nous avons pu réaliser une recherche bibliographique sur la structure chimique des composés identifiés. Le **Tableau 5**, illustre les différentes structures chimiques des composés identifiés précédemment (**Figure 28**).

Tableau 5 : Structures chimiques des composés identifiés par HPLC-DAD-ESI-MS selon la littérature.

Composés	Structures Chimiques	Références
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid		Rivas et al. (2001)
<i>trans</i> -Ferulic acid		Yepes et al. (2015)
Syringic acid		Cheemanapalli et al. (2018)
hydrocafféic acid		El agha et al. (2008)
Vanillic acid glucoside		Palafoux et al. (2012)
Apigenin 7-O-rutinoside	 $R_1 : H ; R_2 : 7-O-(\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl})- ; R_3 : H$	Plazonic et al. (2009)
Rosmarinic acid	 Rosmarinic acid	Petersen & Simmonds (2003)

Résultats et discussion

Rutine		Zeng et al. (2010)
Apigénine	 <p style="text-align: center;">Apigenin</p>	Lodhi et al. (2017)
Verbascoside		Amri et al. (2017)
Luteolin-7-O-glucoside		Boudjelal et al. (2012)
Lutéoline	 <p style="text-align: center;">Luteolin</p>	Lodhi et al. (2017)
Kaempferol-3-glucoside	 <p style="text-align: center;">(6) R=glucose</p>	Zhiyong H. et al. (2008)
Syringic acid hexoside		Ajila et al. (2010)

Dans une étude phytochimique sur l'extrait de *Marrubium vulgare* L. par la technique de HPLC-PDA-ESI-MS, **Tlili et al. (2019)** ont identifié 11 composés phénoliques. Par conséquent et d'après nos résultats, nous avons pu identifier d'autres composés tels que : acide vanillique glucoside, acide trans-férulique, acide p-hydroxybenzoïque, acide syringique, apigénine 7-O-rutinoside, acide rosmarinique, verbascoside, kaempférol-3-glucoside et également acide syringic hexoside.

Une étude similaire a été menée afin d'étudier le profil polyphénolique de *M.vulgare* en Tunisie. Selon **Rezgui et al. (2020)** l'analyse HPLC a montré que les principaux composés phénoliques trouvés sont l'acide sinapique, la quercétine, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'apigénine et la lutéoline.

Dans le même contexte, en comparant avec d'autres travaux, la variation entre les études pourrait être attribuée au chémotype, aux conditions climatiques et environnementales, aux méthodes d'extraction et de quantification des substances végétales. Dans une étude de **Kozyra et al. (2020)** ils ont constaté que l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Marrubium spp* était faible et que le taux en composés phénoliques était très bas ce qui est due à l'origine de la plante. Dans une étude de **Ghedadba et al. (2014)** la concentration la plus élevée en polyphénols a été trouvée dans l'extrait méthanolique. La teneur en extraits phénoliques de *Marrubium vulgare* dépend du type d'extrait et de sa polarité. La forte solubilité des phénols dans les solvants polaires donne une grande concentration de ces composés dans les extraits obtenus.

Connan et al. (2007) ont également démontré que la même plante poussant dans des conditions écologiques hétérogènes accumule un métabolite secondaire aux caractéristiques différentes. Les variations géographiques notamment l'altitude, les facteurs climatiques, la teneur en éléments nutritifs du sol ainsi que les différents stress environnementaux sont à l'origine des variations aussi bien quantitatives que qualitatives enregistrées dans les différents métabolites secondaires. Ces facteurs influent sur la biosynthèse des composés phénoliques de la plante et par conséquent sur la proportion de polyphénols.

II.2. Identification de *Candida albicans*

II.2.1. Examen macroscopique et microscopique

Sur le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) + 0.05% de Chloramphénicol, les colonies de *Candida albicans* apparaissent lisses, blanches (A), et la coloration des blastospores à l'état frais par le bleu de méthylène (B).

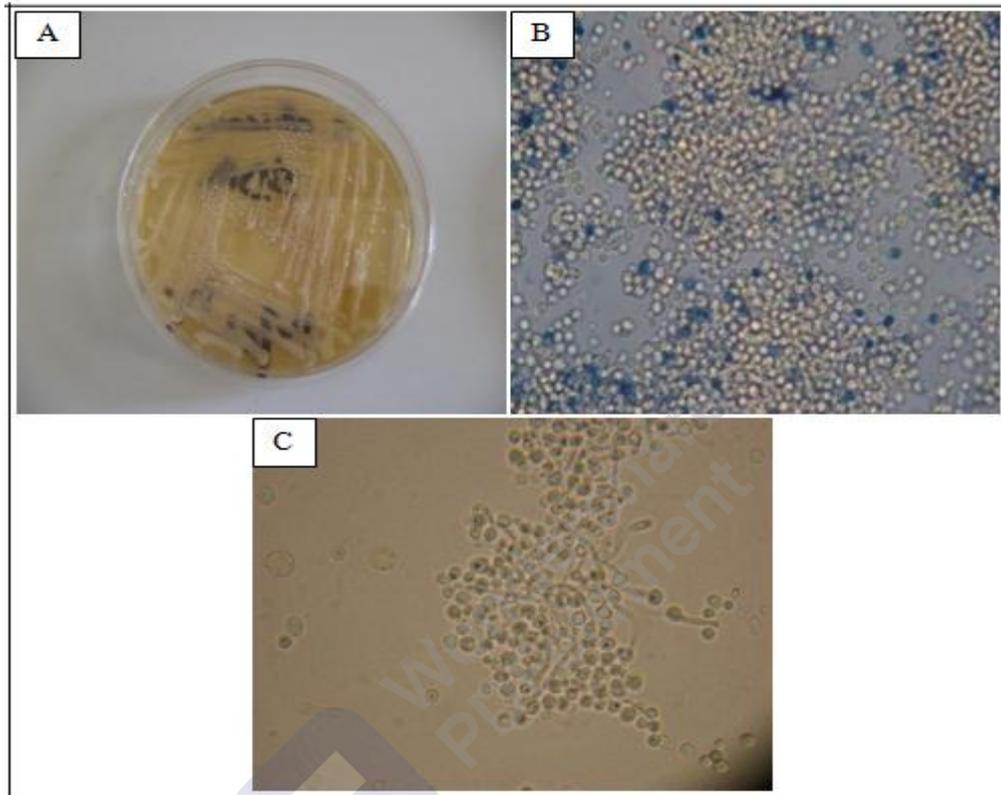


Photo 7: (A) : Aspect macroscopique de *C. albicans* ; (B) Aspect microscopique de *C. albicans* (X400). (C) : Formation d'un tube germinatif chez *C. albicans* (X400).

II.2.2. Test de blastèse

C. albicans et *C. dubliniensis* sont capables de former un tube germinatif (Photo 7). Identification systématique de *Candida albicans* en diagnostic clinique est généralement dépendante de la production sur certaines conditions de chlamydospores. Plusieurs autres techniques ont été décrites où les critères sont moins spécifiques, mais qui peuvent avoir une valeur pratique considérable en permettant un diagnostic présomptif rapide. Par laquelle l'identification rapide de *C. albicans* peut être faite en observant des changements dans la morphologie des cellules de levure dans un sérum humain certifié (Mackenzie, 1962 ; Kurtzman & Fell, 1998).

II.2.3. Api ® Candida



Photo 8: Résultat des tests biochimiques de *C.albicans* (7112).

En se référant au tableau d'identification (**Voir Annexe**), les résultats des différentes réactions biochimiques confirment que la souche est une *Candida albicans* (**Kurtzman & Fell, 1998**).

II.3. Etude de la toxicité Subaigüe

II.3.1. Morbidité et mortalité

Dans notre étude, l'appréciation de l'activité toxicologique a été déterminée par l'administration de l'*EMMV* à 800 mg / kg chez les rats pendant 28 jours. L'*EMMV* n'a montré aucun symptôme de toxicité caractérisé par les deux paramètres (mortalité et morbidité) et basée sur des signes tels que la diminution du poids corporel, le changement de comportement, la posture, l'aspect et la chute des poils, la présence de diarrhée et l'agressivité. Nos résultats montrent qu'aucun rat recevant l'*EMMV* à une dose de 800 mg/kg n'est mort, ce qui suggère que cette dose est sans effet toxique observable de point de vue de mortalité.

II.3.2. Comportement des animaux

Durant la période d'exposition à l'*EMMV*, Les rats (Groupe B) ont gardé presque le même comportement locomoteur et exploration par rapport à ceux des rats témoins (Groupe A). Les mêmes habitudes communes qui caractérisent les rongeurs (l'enfouissement sous litière, escalade de la grille, le saut et la préparation du nit) ont été enregistrées. Le comportement de consommation (Aliment et eau) n'a pas subi un changement aussi bien chez les rats du groupe B que groupe A. Le comportement du soin corporel était également pris en considération, dans lequel, le toilettage a été effectué d'une façon normale, en commençant par les pattes, l'abdomen et en terminant par la queue ; cela signifie que les rats étaient en bonne santé avec une absence de diarrhée et d'agressivité.

II.3.3. Evolution des Poids des Animaux

Au cours de la période expérimentale (28 jours), le poids des rats (Placebo et Essai) est noté quotidiennement. Nous avons constaté que le traitement affecte significativement le poids corporel des rats ($p < 0.05$). Pour les deux groupes, le poids des animaux est passé de 107.01 à 223.06 g (Groupe A) et de 104.87 à 256.31 g (Groupe B).

Il est intéressant de noter que le poids chez les rats du groupe B (qui reçoit que l'*EMMV*) est significativement élevé à celui de témoin (Groupe A) ce qui est probablement dû à l'exposition journalière des rats à l'*EMMV* traduisée ainsi par une augmentation du gain du poids corporel (**Figure 29**).

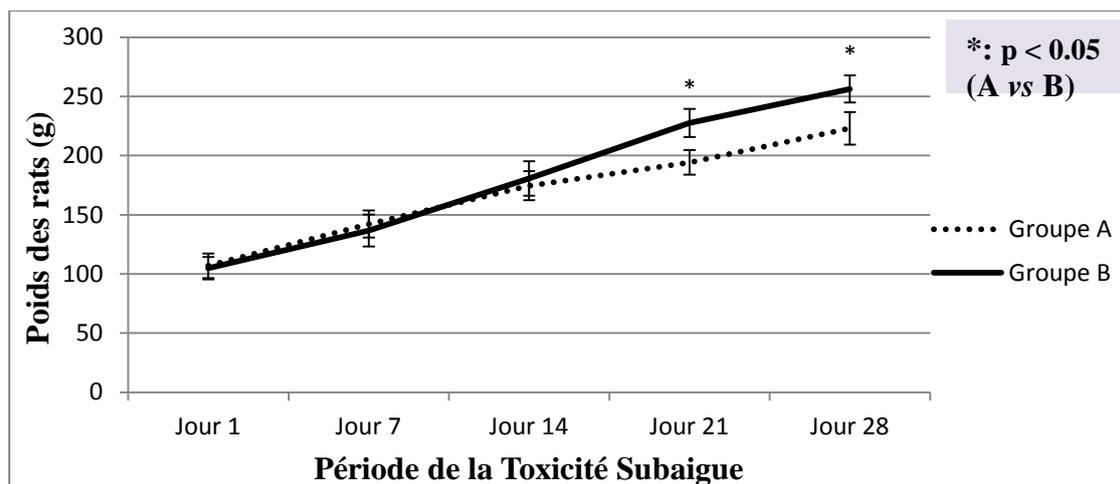


Figure 29 : Evolution du poids des rats durant l'étude de la Toxicité Subaiguë.

II.3.4. Evaluation des Poids des Organes chez les différents groupes

Les organes internes des groupes A et B sont pesés après le sacrifice. Suite à l'administration de l'EMMV à 800 mg / kg, le poids des différents organes (Foie, Rate, Rein, Cœur, Poumon, Intestin et Colon) a augmenté par rapport au groupe A. La différence est significativement ($p < 0.05$) plus élevée, notamment au niveau du foie du groupe B (**Tableau 6**).

Tableau 6: Poids des Organes Internes des rats chez les différents groupes

		Poids des Organes Internes exprimé en (g) \pm SD						
	N° de rats	Intestin ^a	Colon ^b	Foie ^c	Rate ^d	Rein ^e	Coeur ^f	Poumon ^g
Groupe A	10	8.70 \pm 1.18	3.79 \pm 0.88	6.99 \pm 0.7	0.5 \pm 0.11	0.83 \pm 0.11	0.73 \pm 0.06	1.16 \pm 0.2
Groupe B	10	10.38 \pm 1.63	3.64 \pm 0.49	10.5 \pm 0.46	0.65 \pm 0.17	1.18 \pm 0.13	0.79 \pm 0.05	1.52 \pm 0.16
Groupe C	10	8.24 \pm 0.53	5.14 \pm 0.47	7.2 \pm 1.13	0.59 \pm 0.06	0.63 \pm 0.07	0.55 \pm 0.06	1.4 \pm 0.15
Groupe D	10	8.54 \pm 0.83	4.36 \pm 0.34	5.9 \pm 0.42	0.43 \pm 0.14	0.67 \pm 0.05	0.51 \pm 0.04	1.2 \pm 0.21

^a $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-B; $P < 0.01$ groups; B-D; $P < 0.001$ groups; B-C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^b $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; B-D, C-D; $P < 0.01$ groups; A-C; $P < 0.001$ groups; B-C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^c $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-D; $P < 0.01$ groups; C-D; $P < 0.001$ groups; A-B, B-C, B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^d $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-B, C-D; $P < 0.01$ groups; B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^e $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.01$ groups; B-C; $P < 0.001$ groups; A-B, A-C, A-D, B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^f $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.001$ groups; A-C, A-D, B-C, B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^g $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-C; $P < 0.01$ groups; B-D; $P < 0.001$ groups; A-B (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

Il y a eu une augmentation notable au niveau du foie des rats du groupe B par rapport au groupe A ainsi qu'une légère augmentation a été détectée au niveau les reins du groupe B qui est probablement due à l'*EMMV*. Alors que les fragments de l'intestin et du côlon ont un profil de réponse similaire à la dose après l'administration du l'*EMMV*.

II.3.5. Etude histologique des organes

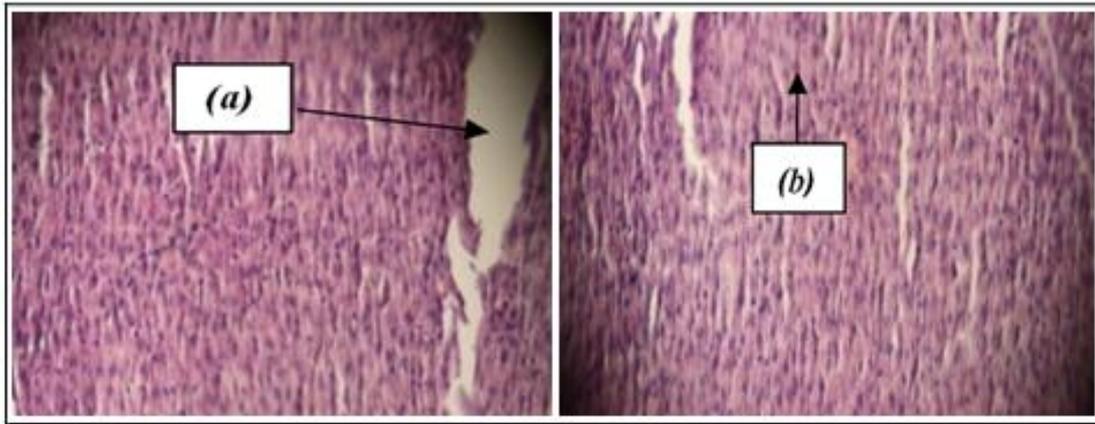
Etude histologique des organes internes est un axe fondamental afin d'étudier les manifestations pathologiques des maladies.

Dans notre étude, l'examen pathologique (**Photos 9-15**) des organes des rats mâles traités par l'*EMMV* n'a montré aucune différence par rapport aux groupes non traités. L'étude histopathologique n'a révélé aucune anomalie détectable et a conclu que l'*EMMV* n'avait aucun effet indésirable sur les organes internes.

L'examen histopathologique « macroscopique et microscopique » montre que la forme, la taille, les cellules des organes des groupes (Témoin et Essai) ne sont pas déformées. L'*EMMV* n'a pas provoqué une dégénérescence au niveau des cellules (**Photos 9-15**). L'analyse de chaque organe a montré qu'au niveau de :

II.3.5.1. Poumons

Après la période d'exposition des rats à l'*EMMV*, les poumons ont été excisés et préparés pour l'examen histologique. Les poumons des rats du groupe A ont présenté des follicules lymphoïdes avec un nombre moins important de lymphocytes (**Photo 9**). Même observation a été enregistrée dans le groupe B où il n'y avait pas une accumulation des lymphocytes à l'intérieur des alvéoles pulmonaires et aucun changement dans la structure histologique pulmonaire.



(a) : Alvéoles

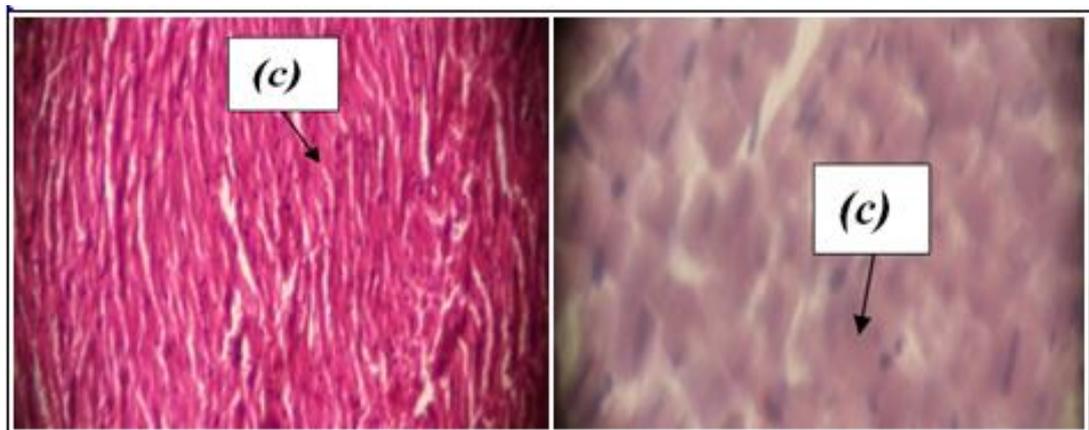
(b) : Epithélium alvéolaire

Photo 9 : Observation histologique du poumon par la coloration HE avec X100.

II.3.5.2. Cœur

L'étude histologique des tissus cardiaques des deux groupes (A-B) n'a révélé aucune diminution de cellules musculaires striées, pas de dégradation du collagène. Absence d'hypertrophie ou remodelage pathologique. Dans la littérature, toujours la physiologie cardiaque est corrélée avec l'aspect des cellules musculaires striées afin d'évaluer le fonctionnement cardiaque. Ces dernières subissent des phénomènes de dépolarisation et de contraction à travers des communications intercellulaires avec les fibroblastes cardiaques (Chacar, 2018).

Les cellules musculaires striées sont régulatrices du débit sanguin et de la pression artérielle en fonction de leur contraction et leur relaxation qui permettent de moduler le diamètre des vaisseaux.

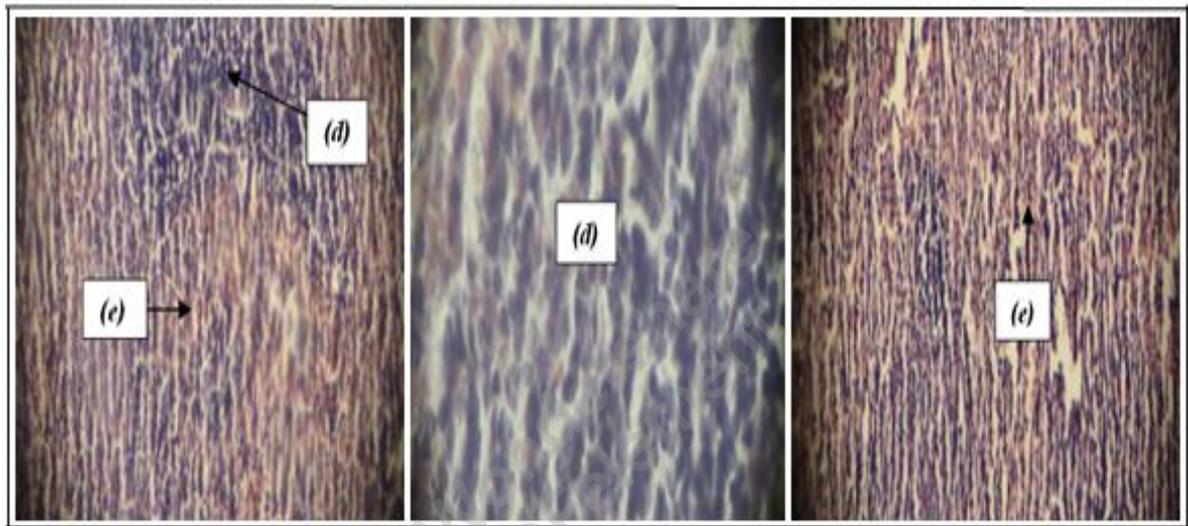


(c) : Cellules musculaires striées cardiaques

Photo 10: Observation histologique du cœur par la coloration HE avec X100 et X400

II.3.5.3. Rate

L'histologie de la rate a été examinée après l'exposition à l'EMMV afin de déterminer le niveau de l'inflammation. Considérant cet organe comme un organe lymphoïde (comportent un ensemble des cellules lymphocytaires), la rate est faite de deux structures différentes : la pulpe rouge (artériole) et la pulpe blanche ; les coupes histologiques des rats du groupe B ont démontré une légère augmentation de la pulpe blanche par rapport à la pulpe rouge. Globalement, les tissus n'ont pas présenté un tel changement de point de vue inflammation, nécrose ou hémorragie (**Photo 11**).

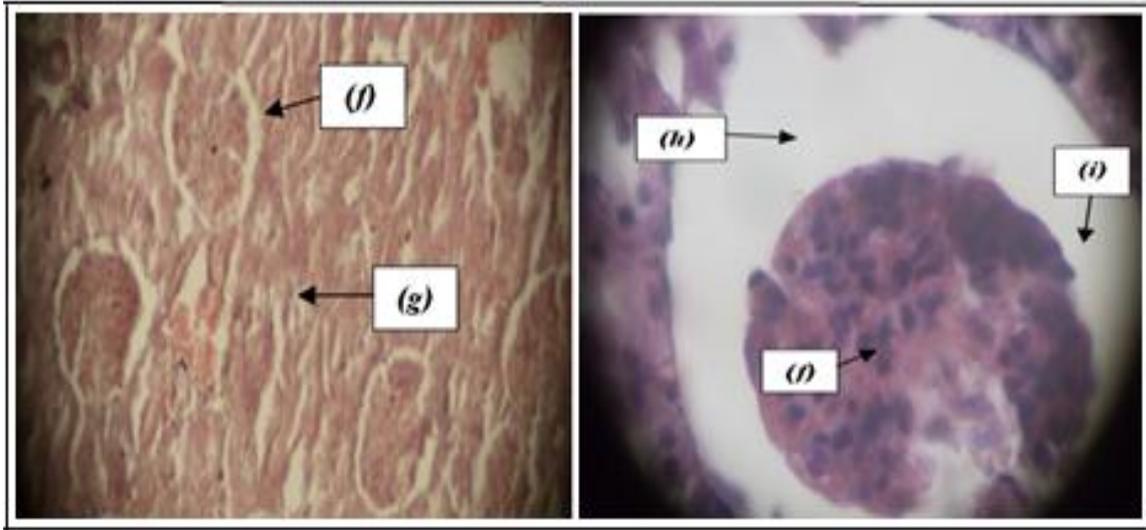


(d) : Pulpe rouge, (e) : Pulpe blanche

Photo 11: Observation histologique de la rate par la coloration HE avec X100 et X400.

II.3.5.4. Reins

L'analyse histologique du rein a révélé une forme intacte du parenchyme rénal pour les deux groupes étudiés (A-B). Les glomérules et les tubules restent intacts et aucune inflammation détectable de point de vue glomérulonéphrite (atteinte de glomérule), sclérose, accumulation des lymphocytes et les polynucléaires dans les capsules Bowman des reins (**Photo 12**).



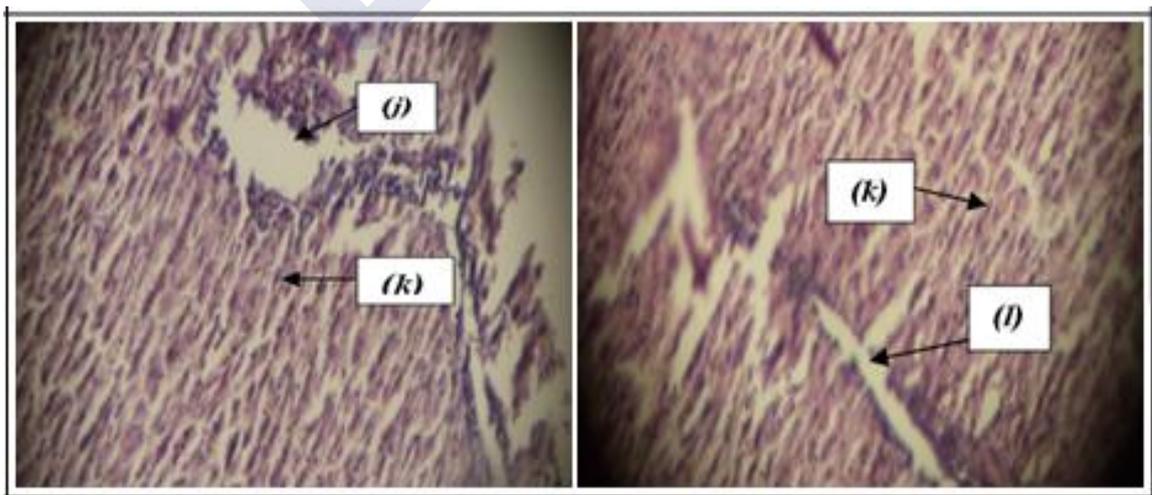
(f) : Glomérule, (g) : Tissu interstitiel, (h) : Chambre de filtration

(i) : Capsule de Bowman

Photo 12: Observation histologique du rein par la coloration HE avec X100 et X400.

II.3.5.5. Foie

En passant par le foie qui présente une structure assez spéciale caractérisée par une restitution idéale dans lequel les coupes histologiques (**Photo 13**) des rats des deux groupes (A-B) ont présenté une structure hépatique caractérisée par des veines Centro-lobulaires avec un espace porte. L'histologie hépatique des rats du groupe B n'a montré aucune zone de nécrose, d'abcès ou atrophie.



(j) : Veine centro-lobulaire, (k) : Hépatocytes, (l) : Espace porte

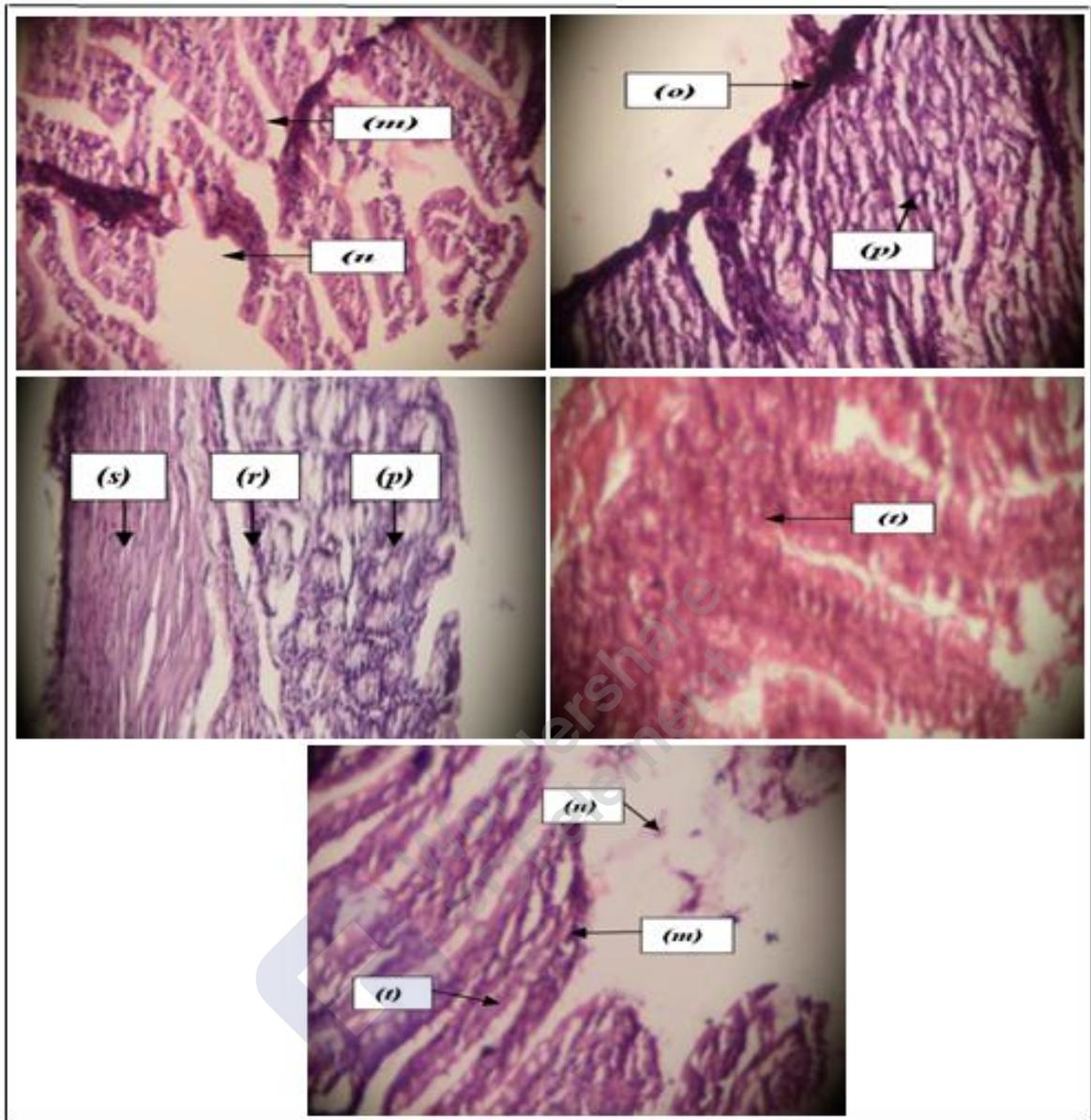
Photo 13: Observation histologique du foie par la coloration HE avec X100.

II.3.5.6. Intestin et Colon

L'administration de l'*EMMV* par voie orale indique une absence de dommages de l'intestin. L'intestin de surface conserve, sa couleur normale (**Photo 14**). Les villosités des rats des deux groupes ne présentaient aucune anomalie de point de vue trace de destruction ou même atrophie villositaire alors que la présence des cellules lymphocytaires a été considérée comme normale.

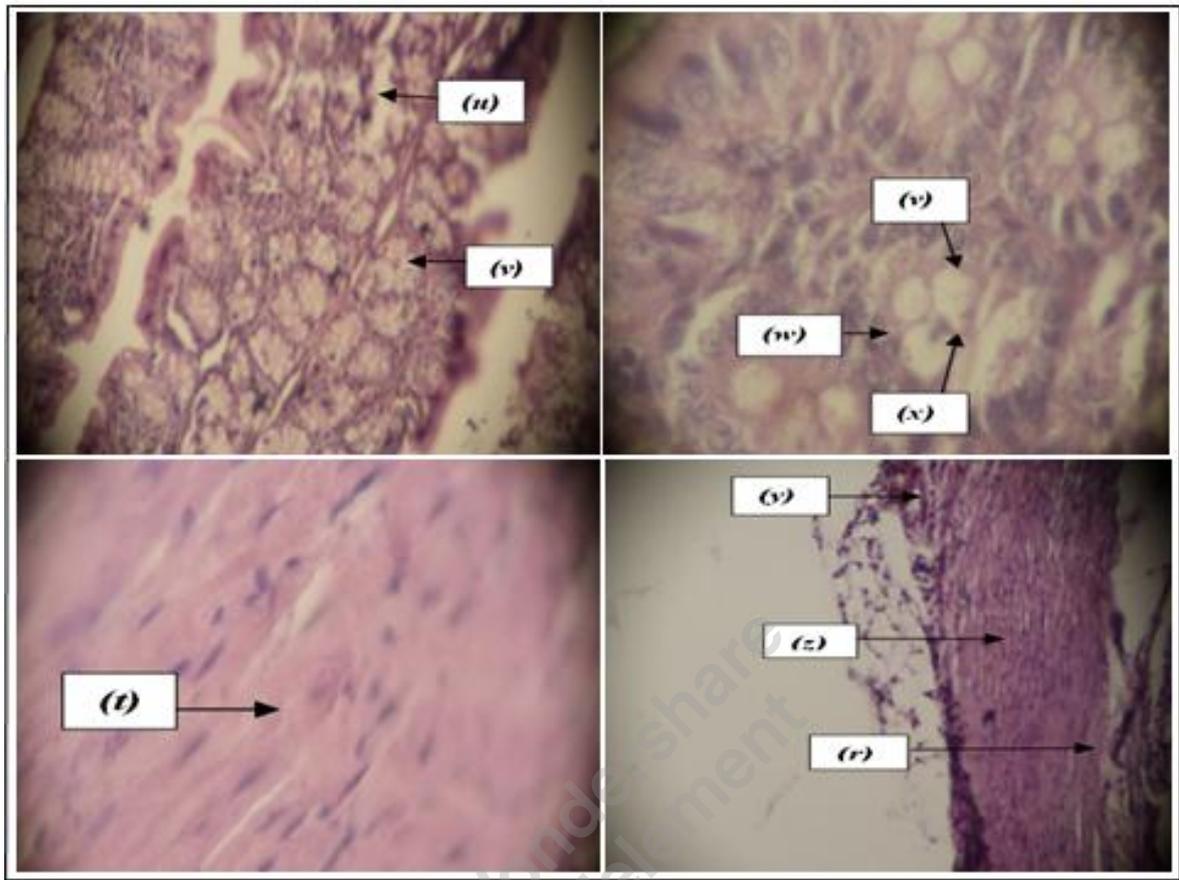
Concernant le colon, les rats du lot A et B ont présenté une architecture normale par un nombre élevé de cellules caliciformes avec un nombre décroissant de cellules entérocytaires et des glandes de lieberkhun. Nous avons noté la présence des glandes normales, une muqueuse normale (pas de diminution) avec un épithélium de type colique, en signalant la présence de lymphocytes à l'état normal (**Photo 15**).





(m) : Villosité intestinale, *(n)* : Lumière intestinale, *(o)* : Epithélium de surface
(p) : Muqueuse, *(r)* : Sous muqueuse, *(s)* : Musculaire muqueuse
(t) : Cellules musculaires lisses

Photo 14: Observation histologique de l'intestin par la coloration HE avec X100 et X400.



(u) : Cellules caliciformes, (v) : Glande de lieberkuhn, (w) : Chorion de la muqueuse

(x) : Lumière de la glande, (y) : Séreuse (z) : Musculeuse

Photo 15 : Observation histologique du colon par la coloration HE avec X100 et X400.

Dans une étude de **Jaouhari et al. (1999)** avait mené une toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* sur des souris, la préparation testée est une infusion de 1 g préparée et séchée dans 50 ml d'eau distillée, les souris traitées avec l'extrait ont montré une perte d'appétit 3 heures après l'ingestion de la perfusion mais aucun changement histopathologique n'a été observé. Dans une étude d'évaluation de la toxicité aiguë de l'extrait de *Marrubium vulgare* sur des rats femelles à une dose unique de 2000 mg/kg pendant une période de 14 jours, aucun changement n'a été détecté sur la peau, les yeux, les muqueuses et le système nerveux. Les données suggèrent que la dose toxique de l'extrait de *Marrubium vulgare* est supérieure à 2000 mg / kg. Il serait classé dans la catégorie 5 de la toxicité selon les critères du HMPC.

Des études de toxicité sont menées pour caractériser les effets toxiques potentiels que l'extrait peut produire. La littérature sur les effets toxiques de *M. vulgare* est rare. Dans ce contexte, La pathologie clinique est un outil clé lors de l'interprétation des études toxicologiques.

Dans notre étude, l'administration orale de l'*EMMV* à 800 mg/kg chez les rats et leur observation pendant 28 jours, a montré aucune apparition des symptômes de toxicité caractérisés par les deux paramètres (mortalité et morbidité) et basés sur les signes externes tel que la diminution du poids corporel, changement du comportement, la posture, le grattage, l'aspect et la chute des poils, la présence de diarrhée, l'agressivité et la température rectale (**Baba Ahmed et al. 2010**). C'était prévu que le dernier paramètre (la température rectale) sera intégré dans le protocole expérimentale, mais vu la difficulté trouvée dont la manipulation avec les rats rendant ainsi la réalisation de ce paramètre difficile (**Olfert et al. 1998**).

D'après **Abdussalam et al. (2018)** Les signes physiques de toxicité observés au cours des quatre premières heures suivant l'administration d'extrait éthanolique de *Marrubium vulgare* sont l'agitation et plus tard une réduction au niveau de l'activité physique. Ils ont constaté que l'extrait est légèrement toxique pour les souris.

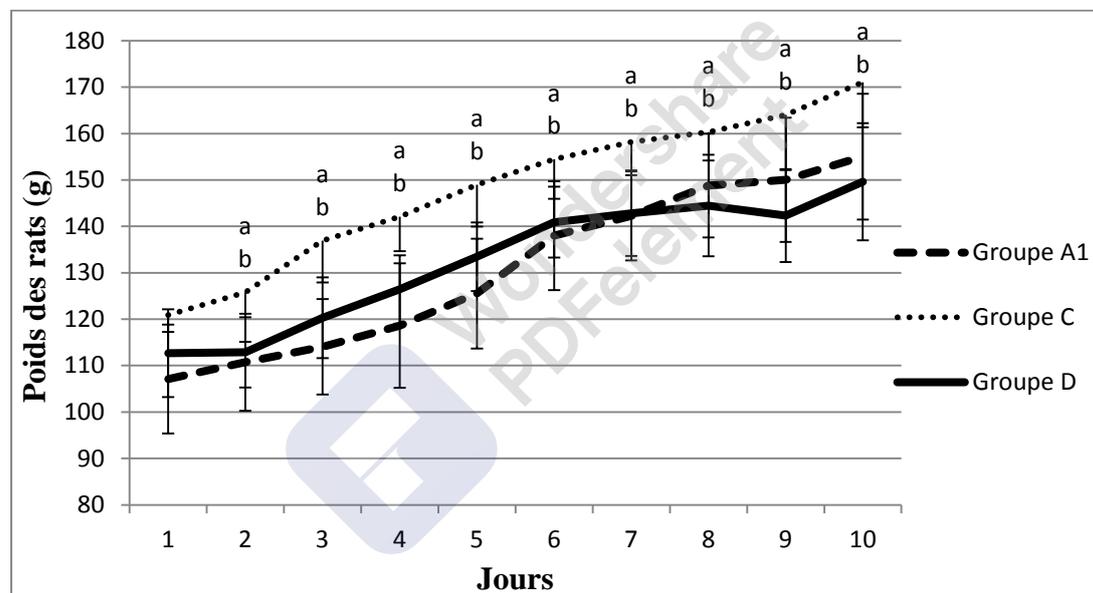
Notre résultat est en accord avec les conclusions d'**Elberry et al. (2015)** qui ont détecté que l'*EMMV* à un rôle de protection. Cette propriété peut être attribuée, aux activités antioxydantes de ces extraits d'une part ; selon **Youcefi et al. (2014)** en plus de la marrubiine, certains composés isolés des parties aériennes de *M. vulgare* comme les esters phénylpropanoïdes glycosidiques possèdent un rôle potentiel dans l'activité anti-inflammatoire contre les maladies cardiovasculaires, d'autre part.

II.3.6. Effet de l'EMMV sur le Poids des animaux infectés par *C.albicans*

II.3.6.1. Evolution des Poids des Animaux

Le poids des animaux inoculés par la souche de *Candida albicans* et non traités (Groupe D) était de $149.62g \pm 12.62$ comparativement au groupe témoin (Groupe A₁) qui était de $155.02g \pm 13.57$. Alors que l'autre groupe C, le poids des animaux était de $171.03g \pm 9.66$.

Cependant, les deux groupes C et D et suivant le (Figure 30), une différence significative ($p < 0.05$) (A₁ vs C ; C vs D) a été signalée avec une croissance perturbée du groupe D par rapport au groupe C ce qui est probablement dû à la souffrance des animaux suite à l'infection causée par *C. albicans*. Il est remarquable que l'infection par *C.albicans* affecte significativement ($p < 0.05$) le poids corporel des rats.



$p < 0.05$ (ANOVA); ^a: $p < 0.05$ groupes ; C vs D ; ^b: $p < 0.01$ groupes : A₁ vs C (Comparaison multiple des moyennes : Tukey Contrasts).

Figure 29 : Evolution du poids des rats durant les dix (10) jours post-inoculations.

Siems & Allen (1989) ont recommandé que le point limite dans un modèle de maladie (infection chronique systémique par *Candida albicans*) soit défini comme étant le point auquel les animaux perdent plus de 20 % de leur poids ou lorsque leur température corporelle baisse de plus de 04 °C.

II.3.6.2. Recherche et Dénombrement de *C. albicans* dans l'Intestin, le Côlon et sa translocation dans les Organes Internes

Dans ce travail, l'intestin et le colon ont montré une présence remarquable de *C.albicans* chez les groupes C et D.

L'intestin et le colon du groupe D ont montré la plus forte charge de *C. albicans* avec un taux respectivement de $10^2 \times 1.23 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/ g}$ d'intestin et $10^2 \times 1.11 \text{ Log}_{10} \text{ UFC / g}$ de colon à 10 jours post-infection (**Tableau 7**). Alors que la charge était relativement faible chez le groupe C infecté et traité par l'EMMV dont les taux sont $10^2 \times (0.90 \text{ et } 0.84) \text{ Log}_{10} \text{ UFC / g}$ d'organe respectivement.

Suite à l'infection, les rats ont montré une différence significative ($p < 0.001$) (A_1 vs D ; A_1 vs C ; C vs D) de leur colonisation gastro-intestinale par *C.albicans* lequel le traitement par l'EMMV a réduit significativement la charge fongique des tissus de « intestins et colons » du lot C par rapport à ceux des rats du lot D « infecté non traité ».

Tableau 7 : Nombre de colonies de *C. albicans* isolée dans les Organes.

		$10^2. \text{Log}_{10} \text{UFC/g}$ du tissu \pm SD, $\text{Log}_{10} \text{UFC}/100\mu\text{l}$ du sang \pm SD							
N° de Rats		Intestin ^a	Colon ^b	Foie ^c	Rate ^d	Rein ^e	Coeur ^e	Poumon ^e	Sang ^f
Groupe A ₁	10	0.47 \pm 0.06	0.3 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Groupe C	10	0.9 \pm 0.26	0.84 \pm 0.12	0.69 \pm 0.30	0.47 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.3 \pm 0.02	0.3 \pm 0.02
Groupe D	10	1.23 \pm 0.37	1.11 \pm 0.41	0.77 \pm 0.43	0.47 \pm 0.31	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.47 \pm 0.19	0.47 \pm 0.17

^a $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A-D, C-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^b $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D, C-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^c $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^d $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^e $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^f $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

L'efficacité de l'extrait a été observée dans le tissu pulmonaire, mais il n'y avait pas une différence significative ($p = 0.119$) (C vs D). Ceci est probablement dû à la variabilité de la réponse du système immunitaire innée à l'infection dans le tissu pulmonaire. Concernant la rate, même charge fongique a été enregistrée dans le

Résultats et discussion

groupe infecté traité et infecté non traité, cette observation a été rapportée et pourrait être expliquée par la différence d'exposition des tissus à la dose thérapeutique.

Le foie du groupe C a été moins contaminé par *C. albicans* par rapport au groupe D après la période post inoculation. En revanche, les homogénats des reins et du cœur sont restés stériles. Toute fois, *C. albicans* a été détecté également dans le sang du groupe C et D (0.3 et 0.47) Log₁₀ UFC / 100 µl respectivement.

La muqueuse intestinale est recouverte d'une couche de gel de mucus, qui agit comme une barrière de diffusion pour les petites molécules et les protège contre la colonisation par des microorganismes pathogènes et leurs toxines, et contre la protéase provenant de micro-organismes et des cellules muqueuses. Les principales composantes structurelles de mucus sont mucines: glycoprotéines de haut poids moléculaire produites par les cellules de l'épithélium de surface (Algin et al., 2005). Il est probablement que les protéases sécrétées par *C.albicans* peuvent agir comme un facteur de virulence en permettant l'accès fongique et l'adhésion aux cellules épithéliales, envahir les tissus de l'hôte et interférer avec le mécanisme de défense de l'hôte. Il a été approuvé que l'immunité innée est la première ligne de protection contre la candidose systémique; ainsi que les macrophages ayant un rôle important dans la reconnaissance et l'élimination de la candidose invasive. Bonne interaction entre l'inné et le système immunitaire adaptatif est nécessaire pour la résistance à la *C. albicans* (Vazquez-Torres et al., 1999). La croissance de plus de dix (10) d'UFC/0.1 ml d'homogénat de tissu est considérée comme indicatif de colonisation gastro-intestinale ou infection diffusée (Animal Models for Candidiasis, 1999).

En général, de nombreux champignons pathogènes différents sont capables d'adhérer à l'épithélium spécifique, mais en particulier *Candida albicans* est capable de s'associer avec une large gamme de types cellulaires différents. Cela pourrait être une des raisons pour lesquelles *C. albicans* est capable de coloniser les différents niches de l'hôte tel que l'intestin, les voies vaginales, ou la muqueuse buccale rendant cet organisme à la fois un commensal et le champignon pathogène le plus de succès chez les humains. Suzuki et al. (1988) ont travaillé sur la détection des antigènes de *Candida spp* sur des souris inoculées oralement par *C.albicans*, ils ont constaté que la colonisation à *Candida spp* dans le tractus peut s'accélérer facilement par une antibiothérapie en entraînant ainsi la destruction de la flore bactérienne normale dans le tractus gastro-intestinal.

Il y a une forte corrélation entre la flore gastrique et la colonisation gastro-intestinale par *Candida albicans*. Dans ce contexte, l'étude faite par **Mason et al. (2011)** sur la colonisation gastrique de la souris par *C.albicans* pendant la phase post-antibiotique indique que cefoperazone provoque des perturbations à long terme sur la flore bactérienne gastrique y compris une réduction du nombre des lactobacilles. Le mécanisme impliqué par la flore gastrique est le blocage d'adhésion de la levure à l'épithélium et la production de substances inhibitrices qui peuvent réduire l'adhérence de *C. albicans*, la transformation des hyphes et l'invasion fongique. Il s'agit d'un processus bidirectionnel c'est-à-dire un effet antagoniste causé par *C.albicans* et la capacité de *Lactobacillus* à bloquer la croissance de *C.albicans*, inhiber l'invasion fongique et empêcher la formation de tubes germinatifs.

Jensen et al. (1993) ont travaillé sur la colonisation de l'intestin et le rôle des leucocytes polynucléaires et les macrophages dans la Résistance des souris à *Candida albican*, où ils ont démontré que les cellules fonctionnelles T et B avaient un rôle dans le contrôle de la candidose. La suppression de la résistance à la candidose systémique aiguë chez des souris après un traitement avec des anticorps montre clairement que les fonctions immunitaires innées jouent un rôle essentiel dans la résistance à la candidose systémique en l'absence de T fonctionnelles et les lymphocytes B.

Comme un pathogène opportuniste, dans certaines circonstances, généralement liés au système immunitaire, *C. albicans* provoque des infections limitées à la muqueuse ou dans les cas graves : des infections systémiques mortelles (**Calderone & Fonzi, 2001**). Plusieurs mécanismes de virulence sont connus pour contribuer la capacité de ce champignon à coloniser et envahir les cellules et les tissus de l'hôte comme la commutation dimorphique et phénotypique, l'expression des molécules de reconnaissance de l'hôte ou des adhésines, la sécrétion des enzymes hydrolytiques telles que lipases, phospholipases et aspartyl protéases (**Sheppard et al., 2004**).

Dans ce présent travail et suite à l'infection, les rats expérimentaux ont montré une différence significative ($p < 0.001$) à leur colonisation gastro-intestinale par *C. albicans* où le traitement par l'EMMV a considérablement réduit la charge fongique dans l'intestin et le colon du groupe C par rapport à ceux des rats du groupe D " infectés non traités" ($p < 0.001$). La translocation dans les organes internes tels que dans le foie et le poumon a été considérablement réduite après le traitement, pas une différence significative ($p = 0.492$ et $p = 0.119$) respectivement.

Résultats et discussion

La rate joue un rôle important en matière de compensation des cellules de *Candida* dans le sang (**Walbaum & Dujardin, 1985**). Notre étude confirme la présence et la croissance de *Candida albicans* dans la rate des rats du groupe D.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés par (**Majithiya et al., 2009**) qui ont travaillé sur un modèle de translocation fongique montrant l'invasion des reins par *C. albicans* en présence de trois médicaments de références.

Par contre, nos résultats sont similaires à ceux trouvés par **Sundstrom et al. (2002)** en travaillant sur la translocation à travers la barrière de la muqueuse gastro-intestinale des souris immunodéficientes. Dans ce contexte, ils ont fait des cultures quantitatives des reins des souris pour déterminer si la candidose systémique a été diffusée vers les organes internes, par conséquent ils ont constaté que *C. albicans* a été rarement trouvées dans les reins.

D'après les résultats retrouvés, le nombre élevé d'UFC/g de foie confirment ceux déjà signalé précédemment par **Noumi et al. (2011)** montrant que cet organe est le moins efficace pour éliminer les microorganismes.

Remichkova et al. (2009) en travaillant sur l'effet de *C. albicans* dans le tractus gastro-intestinal, ils ont constaté que la translocation rapide de *C. albicans* dans les organes internes est probablement due par l'inactivation efficace du système immunitaire inné. D'après **Algin et al. (2005)**, La translocation de *C. albicans* dans le tractus gastro-intestinal est inhibée par un système immunitaire sain de défense, de la muqueuse intestinale et de la microflore gastro-intestinale. Les antibiotiques oraux sont particulièrement efficaces pour perturber l'équilibre écologique gastro-intestinal, conduisant à la prolifération intestinale par certaines bactéries de la flore normale et leur translocation dans le tractus gastro-intestinal.

D'après **Andrew et al. (2008)**, la nécessité d'une réduction de la flore autochtones en particulier les bactéries Gram-négatives est un critère critique lors de la translocation microbienne, étant donné que les bactéries sont toute aussi responsables pour inhiber la translocation de *C. albicans* quand l'immunosuppression est administré. Ils ont également choisi de mesurer les niveaux de champignons dans le foie comme un indicateur de translocation. Dans des expériences préliminaires, ils ont constaté que chez les souris qui ont été colonisées par *C. albicans* compte tenu de l'immunosuppression ultérieure et n'avaient pas d'autre cause infectieuse détectable de

décès que le foie est un organe plus fiable pour confirmer la translocation par rapport aux reins.

Un autre modèle en utilisant une colonisation gastro-intestinale par *C. albicans* et une translocation induite par la chimiothérapie a également noté 100 % de récupération à partir de foie mais moins reprise par les reins. Les mêmes chercheurs ont tenté de déterminer comment *C. albicans* peut se propager de la lumière gastro-intestinale aux organes internes, il a été donné que *C. albicans* est capable de diffuser vers le foie par l'intermédiaire de l'arbre biliaire en l'absence d'immunosuppression mais ne provoque pas de maladie très répandue en raison d'un système immunitaire compétent qui est capable d'empêcher la translocation importante du *C.albicans*.

D'après **Andrew et al. (2008)**, le mécanisme présumé pour toute maladie invasive par *C. albicans* consiste à une colonisation initiale de la surface de la muqueuse suivie par l'invasion dans les tissus et les organes adjacents. Les trois principaux mécanismes qui favorisent la translocation des microbes pathogènes (bactéries et champignons) dans des modèles animaux sont :

- La perturbation de l'équilibre microbiologique gastro-intestinal normale permettant la prolifération intestinale des agents pathogènes (**Tir Touil Meddah et al., 2001 ; Rigon Zimmer et al., 2008**);
- Augmentation de la perméabilité de la barrière de la muqueuse intestinale ;
- Des lacunes dans les défenses immunitaires de l'hôte et les facteurs de risque communs pour le développement de la candidémie chez les patients humains comprennent la neutropénie, l'utilisation des antibiotiques à large spectre, et les procédures médicales invasives.

Alexander et al. (1990) ont travaillé sur le processus de la translocation des microbes et plus particulier : *Candida albicans*, *E.coli* et ses endotoxines dans lequel ils ont constaté qu'il y a plusieurs facteurs sont connus pour entraîner une augmentation de la translocation des microbes dans les barrières intestinales, Il s'agit notamment une atteinte directement aux entérocytes, la réduction du flux sanguin vers l'intestin, une augmentation de la charge microbienne et une nutrition modifiée. Ils ont constaté que la translocation montrée ne se produit pas de manière uniforme. Cette variabilité parue dans certains cas de se produire en raison d'un manque d'accès des organismes à la surface de la muqueuse en raison d'une couverture de muqueuse.

Résultats et discussion

Dans ce contexte, des études ont été réalisées pour éliminer une partie de la couche de mucus par irrigation douce de la boucle avec une solution saline avant l'installation du *Candida spp.* Les mêmes chercheurs en travaillant avec la microscopie électronique à transmission ont montré une certaine érosion des extrémités des microvillosités, avec une désorientation de leur alignement linéaire suivie par la pénétration de l'organisme dans la bordure.

Les observations ont été interprétées pour montrer que *E. coli* et leur produits endotoxines ont été passés dans la lamina propria directement par les entérocytes d'une manière similaire aux *C. albicans*. D'autre part et de point de vue histopathologique, **Balish et al. (2005)** ont indiqué que la voie la plus probable pour qu'il y aura une translocation dans les organes internes est celle par les ganglions mésentériques qui ont été presque entièrement détruits par l'infiltration des cellules phagocytaires.

Kaposzta et al. (1998) ont été intéressés par le rôle des macrophages (en défense) des souris contre *Candida albicans*, ils ont démontré que la mortalité élevée des souris a pu être observée qu'à partir le 14^{ème} jour de l'infection « candidose ». Par conséquent, les lésions sont apparues dans les reins et le cœur et étaient plus vaste et nécrotique. Les reins sont souvent rapporté que l'un des principaux objectifs de la candidose, bien que leur système phagocytaire peut éliminer *C. albicans* de manière aussi efficace que ceux de la rate et du foie. Dans leur modèle, *C. albicans* a été diffusé dans les poumons par l'intermédiaire de la circulation sanguine, l'adhérence et la pénétration par la suite aux cellules endothéliales.

Hernandez & Rupp (2008) ont suggéré que le principal facteur influant le pouvoir pathogène de la candidose est la capacité de *C. albicans* à pénétrer dans l'épithélium et dans les couches des cellules endothéliales et envahir les tissus de l'hôte. Sur le même contexte et selon **Sohn & Rupp (2008)**, les champignons pathogènes ont évolué de nombreuses stratégies pour coloniser différentes niches de l'hôte. En plus de leur capacité à résister à différents types de stress lorsqu'ils sont exposés à l'environnement de l'hôte, une des principales propriétés est leur capacité à adhérer à une grande variété de tissus et les épithéliums différents d'une manière très remarquable. **Dieterich et al. (2002)** ont travaillé sur les techniques d'adhésion et d'invasion de *C. albicans* en démontrant que l'adhérence à des supports cellulaires est

Résultats et discussion

non seulement une condition préalable à la colonisation superficielle, mais aussi est nécessaire à la pénétration dans les organes et dans les tissus.

Selon plusieurs études, l'œsophage et l'estomac ont été les plus fréquemment affectés par candida dans la candidose gastro-intestinale expérimentale en utilisant des souris et des rats comme un modèle animal. D'après ses résultats, ils ont réussi à faire un modèle similaire aux patients souffrent d'une candidose systémique diffusée via la voie gastrique. Toutes les souris traitées avec les médicaments tels que les hydrocortisones, antibiotiques ont souffert de gastro-candidose, il y a entre eux qui ont souffert de dissémination candidosique. **Suzuki et al. (1988)** ont démontré que les cellules de *Candida spp* ont poussé dans le tissu sous-muqueux, quelques-unes qui ont envahi même les vaisseaux sanguins et par conséquent, *C. albicans* peut éventuellement diffuser vers tout le corps par le flux sanguin.

D'après **Sundstrom et al. (2002)** et lors de l'évaluation du rôle de la translocation à travers la barrière de la muqueuse gastro-intestinal des souris immunodéficientes, la présence de micro-organismes qui envahissent l'estomac reflète leur présence dans le ceacum en confirmant que les animaux ont été colonisés.

Sur le même volet, la présence de *Candida albicans* dans le tube digestif est modifiée par divers facteurs, dont l'écologie microbienne peut être la plus importante. **Mankowski (1972)** a indiqué que les cultures de *Lactobacillus* inhibent la croissance de *Candida albicans*; alors que la production des exoglycoprotéines par *Candida albicans* est probablement beaucoup plus sensible par l'influence de l'écologie microbienne de tube digestif. D'après **Andrew et al. (2008)**, la capacité à induire la formation des hyphes est un facteur déterminant de la virulence. Les souches mutantes de *C. albicans* qui sont incapables de former des hyphes ont été trouvées à être non virulentes dans des modèles de candidose. Dans lequel la formation des hyphes conduit à une plus grande capacité d'envahir les cellules épithéliales de l'hôte.

Le traitement par l'*EMMV* a réduit la charge fongique dans les organes trouvés contaminés par rapport au groupe témoin. La charge fongique dans les tissus hépatiques après le traitement curatif avec l'*EMMV* était plus basse que ceux du groupe des rats infectés non traités. L'efficacité de l'extrait a également été observée dans les tissus pulmonaires, mais il n'y avait pas de différence significative ($p = 0.119$) de la charge fongique entre les groupes, ceci est du probablement à la variabilité dans la réponse du système immunitaire innée à l'infection dans les tissus

pulmonaires (**Lengerova et al., 2012**). Malgré la similitude de l'efficacité de l'*EMMV* dans la réduction de la charge fongique dans les organes, il n'y avait pas de similitude dans les organes de la rate. Cette observation a été signalée et pourrait s'expliquer par la différence de l'exposition des tissus à l'*EMMV* suivant les doses thérapeutiques.

Les tissus de l'intestin, colon ont un profil similaire de réponse à la dose après l'administration de l'*EMMV* où il y avait une réduction significative ($p < 0.001$) de la charge fongique, dans tous les groupes de traitement comparativement au groupe des rats infectés non traités

Algin et al. (2005) ont travaillé sur l'efficacité d'un traitement basé de *Saccharomyces boulardii* contre la translocation de *Candida albicans* dans le tube digestif chez des rats immunodéprimés dans lequel, il a été avéré que *S. boulardii* a inhibé la translocation de *C. albicans* à partir du tractus gastro-intestinal en réduisant les niveaux gastro-intestinaux de *C. albicans* et ils ont constaté que le traitement par voie orale de *S. boulardii* a diminué le nombre de colonies de *C. albicans* dans le foie, la rate et les reins des rats immunodéprimés.

D'autres études ont montré que *S. boulardii* a inhibé la translocation de *C. albicans* à partir du tractus gastro-intestinal en réduisant les niveaux gastro-intestinaux de *C. albicans*. Leurs données montrent que le traitement par voie orale de *S. boulardii* a diminué le TNF- α sérique et des colonies de *C. albicans* dans le foie, la rate et les reins des rats immunodéprimés. D'après **Huang et al. (2004)**, au cours de la défense de l'hôte contre les infections fongiques, les souris ont une anomalie sur les niveaux des neutrophiles, ce qui inclut la mobilisation et la migration de ces dernières dans les organes infectés. Les neutrophiles sont considérés comme être des cellules de défense de l'hôte les plus importantes dans les infections fongiques systémiques.

C. albicans est généralement un commensal normal inoffensif. Pour devenir un agent pathogène, une interruption des mécanismes de défense normaux est nécessaire. L'immunité de l'hôte est importante dans la modulation de l'état de *C. albicans* dans l'organisme (**Noumi et al., 2011**). Il a été approuvé que l'immunité innée soit la première ligne de protection contre la candidose systémique; les macrophages avoir un rôle important pour la reconnaissance et l'élimination de la candidose invasive. Bonne interaction entre l'inné et le système immunitaire adaptatif est nécessaire pour la résistance à la *C. albicans* (**Vazquez-Torres et al., 1999**).

Soltani et al. (2012) ont évalué l'efficacité protectrice de *Spirulina platensis* chez des souris infectées par *Candida spp.* Dans leur étude, l'alimentation *S. platensis* à des souris inoculées avec *C. albicans* entraîne une augmentation de la résistance à la maladie qui peut être attribuée à une amélioration des fonctions immunitaires. Ils ont trouvé que chez les souris nourries avec *S. platensis* et inoculés avec *C. albicans*, une charge fongique beaucoup plus faible a été récupérée dans le foie, les reins, la rate et les poumons, ce qui peut compter sur une amélioration de la réponse immunitaire de l'hôte. La formulation des traitements administrés joue un rôle très important sur le taux d'exposition des tissus d'une part et sur l'efficacité du traitement d'autre part.

Dans l'étude de **Zida et al. (2017)**, les substances naturelles peuvent agir par une dépolarisation ou formation de pores dans la membrane fongique ; elles présentent un effet inhibiteur sur la transition levure-hyphes de *C. albicans* ; ou encore elles inhibent la formation de biofilm.

Les mêmes auteurs ont indiqué que ces plantes exercent leur activité antifongique non seulement à travers les dommages de la membrane plasmique mais aussi par le dysfonctionnement de la mitochondrie en perturbant ainsi la respiration cellulaire. Il a été signalé que l'activité antifongique de l'extrait de *Marrubium vulgare* soit apparemment liée à sa forte teneur phénolique d'une part et à l'altération de l'activité de la pompe à efflux par certains constituants d'autre part. De plus, l'efficacité optimale d'un extrait sera obtenue par l'action combinée (synergie) de différents composés de cet extrait.

Notre étude contribue à enrichir les données de la littérature sur le profil polyphénolique et les propriétés biologiques de l'EMMV. Plusieurs études ont rapporté la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes dans l'extrait de *Marrubium vulgare*. Leur quantité peut varier selon les méthodes d'extraction, en effet, les extraits méthanoliques semblent être plus riches que les extraits obtenus par d'autres solvants. Dans le même contexte, une forte activité a été observée avec des extraits méthanoliques de *Marrubium vulgare*.

De point de vue pharmacologique et selon **Tili et al. (2019)**, il est avantageux que les médicaments antimicrobiens présentent une toxicité sélective pour le germe et ne soient pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Il est intéressant de noter que *C. albicans* est un agent opportuniste c'est-à-dire un commensal normal de tube

Résultats et discussion

digestif, dans les conditions favorables à sa croissance mais suite à une perturbation de l'hôte, il peut exercer des mécanismes de virulence graves.



Conclusion

Conclusion générale et Perspective

Candida albicans est le champignon pathogène le plus fréquent chez l'homme. Il est devenu un problème clinique majeur en raison du nombre croissant de patients immunodéprimés qui sont sensibles à l'infection. En outre, le nombre des agents antifongiques disponibles limité et l'émergence des souches de *Candida* résistantes, de nouveaux agents antifongiques seront donc nécessaires de toute urgence. Le but principal de cette étude était d'évaluer l'activité antifongique (traitement curatif) de l'extrait alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* (EMMV) sur des rats mâles rendus expérimentalement candidosiques. L'étude phyto-chimique de la plante a permis de quantifier les composés majeurs responsables de propriétés biologiques tels que les phénols totaux, flavonoïdes totaux et les tanins condensés.

L'administration orale de l'EMMV à 800 mg/kg chez les rats pendant 28 jours n'a induit aucun symptôme de toxicité caractérisé par les deux paramètres : la mortalité et la morbidité d'une part et l'étude histo-pathologique d'autre part. L'efficacité orale de l'EMMV a été contestée contre la souche de *C. albicans*. Par conséquent, le principal variable qui affecterait l'activité antifongique de l'extrait serait l'activité de l'extrait lui-même et de ses niveaux thérapeutiques du site cible.

Les résultats de cette étude montrent clairement que l'EMMV diminue la colonisation de *C. albicans* dans l'intestin et le colon des rats infectés traités. La translocation de cet agent pathogène dans les organes internes en particuliers le foie et les poumons ont significativement diminué. La réduction de la translocation de *C. albicans* par le traitement curatif de l'EMMV suggère un bénéfice thérapeutique contre la dissémination de la candidose. De ces résultats, il apparaît clairement que l'application de l'EMMV pourrait être recommandé à une dose de 800 mg/kg pour des essais cliniques et ouvre une nouvelle voie d'approche pour l'utilisation des substances naturelles bioactives aux traitements antifongiques.

Cependant, d'autres tests seront nécessaires afin de s'assurer de la non toxicité de cet extrait comme les essais de toxicité chronique (à long terme), la recherche et l'isolement de molécules responsables de ces effets bénéfiques à partir de l'EMMV pour mieux cibler les molécules bioactives. Des études complémentaires seront également nécessaire afin d'évaluer les interactions synergétiques entre l'EMMV et les autres agents antifongiques tels que le fluconazole ou l'amphotéricine B.

Références Bibliographiques

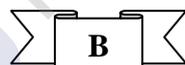
Références Bibliographiques



- Assessment report on *Marrubium vulgare* L., herba, 15 January 2013: European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC).
- Alexander J.W., Steven T. B., George F. B., Luca G., Michael D. P., David L. D., Tonyia P., Charles P. C. and Sara K. 1990: The Process of Microbial Translocation, volume 212, p 497-508.
- Andrew Y. K., Kohler J.R., Kathleen T. Coggshall¹, Rooijen N.V., Pier G.B. 2008 : Mucosal Damage and Neutropenia Are Required for *Candida albicans* Dissemination ; Volume 4, Issue 2, p 1-10.
- Abi-Said D., Anaissie E., Uzun O., Raad I., Pinzcowski H., et al. 1997: "The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species." *Clin Infect Dis* 24(6): 1122-8.
- Pierre AUGER & Jeannine JOLY. 1977 : FACTORS INFLUENCING GERM TUBE PRODUCTION IN *CANDIDA ALBICANS*. *Mycopathologia* Vol. 61, 3: pp. 183-186.
- Bédis Amri, Emanuela Martino, Francesca Vitulo , Federica Corana, Leila B. Ben-Kaâb, Marta Rui, Daniela Rossi, Michela Mori, Silvia Rossi and Simona Collina. 2017 : *Marrubium vulgare* L. Leave Extract: Phytochemical Composition, Antioxidant and Wound Healing Properties. *Molecules* 22; 1851; doi:10.3390/molecules22111851.
- Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, et al. 2011: Burden of endemic health-care associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*; 377 : 228-241.
- Albertson, G.D., Niimi, M., Cannon, R.D. et Jenlndson, H.F. 1996: Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazoic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2835-2841.
- Ameziane N, Boubaker H, Boudyach H, Msanda F, Jilal A, Ait Benaoumar A. 2007: Antifungal activity of moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron Sustain Dev*; 27(3):273-7. doi:10.1051/agro:2007022.
- Andes, D., J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht, K. Marchillo, A. Pitula. 2004: Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model, *Infection and Immunity*, 72; 6023-6031.
- Algin C, Sahin A, Kiraz N, Sahintürk V, Ihtiyar E. 2005: Effectiveness of bombesin and *Saccharomyces boulardii* against the translocation of *candida albicans* in the digestive tract in immunosuppressed rats. *Surg Today*; 35(10):869-73. doi: 10.1007/s00595-005-3049-9.
- Asadi-Samani M, Kafash-Farkhad N, Azimi N, Fasihi A, Alinia-Ahandani E, Rafieian-Kopaei M. 2015: Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine. *Asian Pac J Trop Biomed*; 5(2):146-57. doi:10.1016/S2221-1691(15)30159-3.

Références Bibliographiques

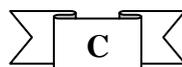
- Ajedi AS, Widodo N, Widyarti S, Rifa'i M. 2019: Immunomodulatory effect of moringa oleifera and *Marrubium vulgare* leaf aqueous extracts in balb/c mice infected with Salmonella typhimurium. Drug Invent Today; 12(4):690-700.
- Ait-Sidi-Brahim M, Markouk M, Larhsini M. 2019: Moroccan medicinal plants as antiinfective and antioxidant agents. New Look Phytomed. p. 91-142. doi:10.1016/B978-0-12-814619-4.00005-7.
- C.M. Ajila, L. Jaganmohan Rao, U.J.S. Prasada Rao. 2010: Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts; Food and Chemical Toxicology 48; 3406–3411.
- Abdussalam U, Aliyu M, Maje I. 2018: In vivo antiplasmodial activity of ethanol leaf extract of *Marrubium vulgare* l. (Lamiaceae) in Plasmodium Berghei-Berghei Infected Mice Trop J Nat Prod Res; 2(3):132-5. doi:10.26538/tjnpr/v2i3.6.
- Abeer Y. Ibrahim, Saber F. Hendawy, Ahmed A.A. Elsayed, Elsayed A. Omer. 2016: Evaluation of hypolipidemic *Marrubium vulgare* effect in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in Mice ; Asian Pacific Journal of Tropical Medicine ; 9(5): 453–459.
- Alferah MA. 2012: Toxicity induced histological changes in selected organs of male (wistar) rats by lawsonia inermis leaf extract. European J Med Plants: 151- 8. doi:10.9734/EJMP/2012/1061.
- Alwashli A, Al Sobarry M, Cherrah Y, Alaoui K. Toxicité aiguë et activité analgésique de l'extrait méthanolique de *Rumex nervosus* vahl. Phytothérapie. 2012;10(5):293-7. doi:10.1007/s10298-012-0727-9.



- Balish E., Thomas F. Warner, Peter J. Nicholas, Emily E. Paulling, Caroline Westwater and David A. Schofield. 2005: Susceptibility of Germfree Phagocyte Oxidase- and Nitric Oxide Synthase 2-Deficient Mice, Defective in the Production of Reactive Metabolites of Both Oxygen and Nitrogen, to Mucosal and Systemic Candidiasis of Endogenous Origin, infection and immunity, p. 1313–1320.
- Bouterfas K, Mehdadi Z, Aouad L, Elaoufi MM, Khaled MB, Latreche A, et al. 2016 : La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*? J Mycolo Med; 26(3):201-11. doi:10.1016/j.mycmed.2016.02.019.
- Berrougui H, Isabelle M, Cherki M, Khalil A. 2006: *Marrubium vulgare* extract inhibits human-ldl oxidation and enhances hdl-mediated cholesterol efflux in thp-1 macrophage. Life sci; 80(2):105-12.
- doi:10.1016/j.lfs.2006.08.040.

Références Bibliographiques

- Bruneton J. 1999 : Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 1120 p.
- BORN, Frédéric. 2013 : Les candidoses buccales: revue de littérature. Thèse de doctorat : Univ. Genève, no. Méd. dent. 714
- Berche P, Gallard J. L, Simonnet M. 1991: les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion ; 64-71.
- Fatima Zohra Baba Ahmed, Hafida Merzouk, Samira Bouanane, Nacira Batoul Benkalfat, SidAhmed Merzouk, Joe Kajima Mulengi, Michel Narce, 2010: Acute toxicity evaluation of 2-hydroxy-methyl-1 aziridine in Wistar rat, Ann Toxicol Anal.; 22(3): 115-121.
- Boutlelis DA, Bordjiba O. 2014 : Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du marrube blanc ou *marrubium vulgare* L.[ressource textuelle, sauf manuscrits].
- Bouvet P J M et Crimont PAD. *Acinetobacter*. In : Le MINOR L et VERON M, eds. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion, 1989 ; 599-604.
- Barnett J. A., Payne, R.W. and Yarrow, D. 2000: "Yeasts: Characteristics and Identification." Cambridge University Press 3rd edition.
- Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. 2012: Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild algerian *Marrubium vulgare* L. Infusion. Fitoterapia; 83(2):286-92. doi:10.1016/j. fitote.2011.11.005.
- Berche P, Gallard J. L, Simonnet M. les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion, 1991 : 64-71.
- Bartnicki-Garcia, S. 2006: Chitosomes: past, present and future. FEMS Yeast Res 6:957-65.
- G.S. Baillie, L.J. Douglas. 2000: Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46; 397-403.



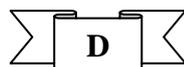
- Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. 2001: Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 9, 327.
- Srinivasulu Cheemanapalli, Ramgopal Mopuri, Ramanjaneyulu Golla, Anuradha C.M., Suresh Kumar Chitta. 2018 : Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance ; Biomedicine & Pharmacotherapy 108; 547–557.
- Cos, P., Vlietink, A., Vanden Berghe, D., Maes, L. 2006: Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. Journal of Ethnopharmacology, 106, 290–302.
- Calderone RA, Fonzi WA. 2001: Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol; 9(7):327-35. doi:10.1016/S0966-842X(01)02094-7

Références Bibliographiques

- Chakir ARS, Elbadaoui K, Alaoui TI. 2015: Antidiabetic activities of methanolic extracts of *Marrubium vulgare* leaves in rats. *Int J Pharm Phytopharmacol Res*; 4(5):258-63.
- CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux. 1993: Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Ottawa; 1: 232–256. 16.
- Carlet J, editor. 2002: Les infections liées aux soins. Actualités et Dossiers en Santé Publique. La Documentation Française. p. 23–70.
- Conseil supérieur d'hygiène publique de France. 100 recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1992, numéro spécial.
- Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Paris et Nord. Guide de définition des infections nosocomiales. Paris : C-CLIN Paris-Nord, 1995.
- Stéphanie Chacar. 2018 : Effet des composés phénoliques sur le vieillissement cardiaque et rénal: Etude expérimentale chez le rat ; Thèse De Doctorat ; L'université Saint-Joseph De Beyrouth Et L'université De Poitiers.
- Chaffin, W. L., and D. M. Stocco. 1983: Cell wall proteins of *Candida albicans*. *Can J Microbiol* 29:1438-44.
- Castaldo P., Stratta R. J., Wood R. P., Markin R. S., Patil K. D., et al. 1991: "Fungal infections in liver allograft recipients." *Transplant Proc* 23(3): 1967.
- Chastre J, Fagon J-Y. 2002: Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*; 165: 867-903.
- Cagnoni, P.J., Walsh, T.J., Prendergast, M.M., Bodensteiner, D., Hiemenz, S., Greenberg, R.N., Arndt, C.A., Schuster, M., Seibel, N., Yeldandi, V. et Tong, K.B. 2000: Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J. Clin. Oncol.* 18:2476-2483.
- Canuto, M.M. et Rodero, F.G. 2002: Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infectious Diseases* 2:550-563.
- J. Chandra, D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum. 2001: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance, *Journal of Bacteriology*, 183; 5385-5394.
- Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. 2005: Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiol Immunol*; 20(2):106-11. doi :10.1111/j.1399- 302X.2004.00202.x.
- Combrisson H. La directive 2010/63/ue: L'explicite et l'implicite. *Bull Acad Vet Fr.* 2014. doi:10.4267/2042/53809.
- Connan S, Deslandes E, Gall EA. 2007: Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *J Exp Mar Bio Ecol*; 349(2):359- doi:10.1016/j.jembe.2007.05.028.

Références Bibliographiques

- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. 2006: Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. J Ethnopharmacol; 106(3):290-302. doi:10.1016/j.jep.2006.04.003.
- Srinivasulu Cheemanapallia, Ramgopal Mopurib, Ramanjaneyulu Gollac, Anuradha C.M.b, Suresh Kumar Chitta. 2018: Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance; Biomedicine & Pharmacotherapy 108; 547–557.



- Dieterich C., Schandar M., Noll M., Johannes F.J., Brunner H., Graeve T., Rupp S. 2002: In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. Microbiology 148, 497–506.
- Doostan F, Abbasi MM, Khordadmehr M, Fallah F, Behrouzy A. 2019: Effects of pomegranate seed and peel methanolic extracts on methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. Pharm Sci; 25(2):111-7. doi:10.15171/PS.2019.17.
- Dealler SF. 1991: *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. J Clin Microbiol; 29(5):1081-2.
- De Jesus R, Cechinel-Filho V, Oliveira A, Schlemper V. 2000: Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. Phytomedicine; 7(2):111-5. doi:10.1016/S0944-7113(00)80082-3.
- Dismukes, W.E. 2000: Introduction to antifungal drugs. Clin. Infect. Dis. 30:653-657.
- Daoudi A, Benboubker H, Bousta D, Aarab L. 2008: Screening of fourteen, moroccan medicinal plants for immunomodulating activities. Moroccan J Biol.; 1:24-30.
- De Souza M, De Jesus R, Cechinel-Filho V, Schlemper V. 1998: Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. Phytomedicine; 5(2):103-7. doi:10.1016/S0944-7113(98)80005-6.
- Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, Cechinel-Filho V, Schlemper V. 2006: Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. J Ethnopharmacol; 108(3):379-84. doi:10.1016/j.jep.2006.05.023.
- Del Palacio, A., Sanz, F., Garcia-Bravo, M., Gimeno, C., Cuetara, S., Miranda, P. et Noriega, A. 1991: Single dose treatment of vaginal candidosis: randomized comparison of amorolfine (50 mg and 100 mg) and clotrimazole (500 mg) in patients with vulvovaginal candidosis. Mycoses 34:85-91.
- Ducel G, Fabry J, Nicolle L. 2002: Prevention of Hospital-acquired infections: a practical guide (2nd ed). WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12 (http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/fr/index2.html).

Références Bibliographiques



E

- Ahmed A. Elberry, Fathalla M. Harraz, Salah A. Ghareib, Salah A. Gabr, Ayman A. Nagy, Essam Abdel-Sattar, 2011: Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats, *International Journal of Diabetes Mellitus*.
- Espinel-Ingroff, A. 2009: Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: A review of the literature (2005–2009). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26, 15–22.
- Erwig, L.P. & Gow, N.A.R. 2016: Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 163–176.
- Elshama SS, El-Kenawy AE-M, Osman H-EH. 2016: Curcumin improves atorvastatin-induced myotoxicity in rats: Histopathological and biochemical evidence. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 29(4):742-52. doi:10.1177/0394632016656186.
- El Bardai S, Morel N, Wibo M, Fabre N, Llabres G, Lyoussi B, et al. 2003: The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *marrubium vulgare*. *Planta Med*; 69(01):75-7. doi:10.1055/s-2003-37042
- Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Gabr SA, Nagy AA, Abdel-Sattar E. 2015: Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Inter J Diabetes Mellit*; 3(1):37-44. doi:10.1016/j.ijdm.2011.01.004.
- European centre for disease prevention and control: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. Stockholm: ECDC, 2008. (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DisForm.aspx?ID=328).
- Ayman El Agha ; Dimitris P. Makris ; Panagiotis Kefalas. 2008: Hydrocaffeic acid oxidation by a peroxidase homogenate from onion solid wastes; *Eur Food Res Technol*; 227:1379–1386; DOI 10.1007/s00217-008-0854-6.
- Espinel-Ingroff A. 2009: Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: A review of the literature (2005-2009). *Rev Iberoam Micol*; 26(1):15-22. doi: 10.1016/S1130-1406(09)70004-X.



F

- Francisco j. rivás, fernando j. beltraâ n, jesuâ s frades and paco buxeda. 2000: oxidation of p-hydroxybenzoic acid by fenton's reagent ; *Wat. Res.* Vol. 35, No. 2, pp. 387-396.
- Fatemeh Fathiazad, Maryam Rameshrad, Samira Asghari, Sanaz Hamedeyazdan, Alireza Garjani, Nasrin Maleki-Dizaji. 2017: Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Effect of *Marrubium vulgare* L. Methanol Extract on Carrageenan-

Références Bibliographiques

- Induced Paw Inflammation in Rats. *Pharmaceutical Sciences*, 23: 3-11. doi: 10.15171/PS.2017.02
- Filler, S.G. and Sheppard, D.C. 2006: Fungal invasion of normally nonphagocytic host cells. *PLoS. Pathog.* 2, e129.
 - Finkelstein R., Wichting C., Hashmonai M. 1985: *Candida albicans* liver abscesses, department of pathology, Rambam Medical Center.
 - Firon, A., G. Lesage, and H. Bussey. 2004: Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr Opin Microbiol* 7:617-23.
 - Fagon JY. 1998 : Pneumopathies nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Inf.* 28 :159-66.
 - Omidreza Firuzi, Katayoun Javidnia,, Maryam Gholami, Mohammad Soltani and Ramin Miria. 2010: Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of 24 Lamiaceae Species Growing in Iran. *Natural Product Communications*; Vol. 5; No. 2; 261- 264.
 - R. Finkelstein, C. Wichtig, M. Hashmonai. 1985: *Candida albicans* Liver Abscesses, *Infection* 13 Nr.5, 243-4.
 - Fatima Ad, Modolo LV, Conegero Sanches AC, Porto RR. 2008: Wound healing agents: The role of natural and non-natural products in drug development. *Mini Rev Med Chem.*; 8(9):879-88. doi:10.2174/138955708785132738.



- Goldman, G. H., Da Silva Ferreira, M. E., dos Reis Marques, E., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Godoy Martinez, P. C., Goldman, M. H. and Colombo, A. L. 2004: Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 50: 25-32.
- Gebremickael A. 2017: Acute and sub-chronic oral toxicity evaluation of *Eucalyptus globulus* essential oil-water emulsion in mice. *J Cytol Histol*; 8(459):2. doi:10.4172/2157-7099.1000459.
- Gupta AK, Kohli Y. 2003: Evaluation of in vitro resistance in patients with onychomycosis who fail antifungal therapy. *Dermatology*; 207(4):375-80. doi:10.1159/000074118.
- Glisic S.B., D.R. Misic, M.D.I.T. Stamenic Zizovic, R.M. Asanin, D.U. Skala. 2007: Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity, *Food Chem.* (105): 3462-3470.
- Gurib-Fakim A. 2006: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.*;27(1):1-93. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008.
- Gow, N.A.R., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J.P. & Netea, M.G. 2011: *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews. Microbiology*, 10, 112–122.

Références Bibliographiques

- Goyer, M., Loiselet, A., Bon, F., L'Ollivier, C., Laue, M., Holland, G., Bonnin, A. & Dalle, F. 2016: Intestinal Cell Tight Junctions Limit Invasion of *Candida albicans* through Active Penetration and Endocytosis in the Early Stages of the Interaction of the Fungus with the Intestinal Barrier. PLOS ONE, 11, e0149159.
- Ghannoum, M.A. et Rice, LB. 1999: Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12:501-5 17.
- Georgopapadakou, N.H. et Walsh, T.J. 1994: Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. Science 264:371-373.
- Georgopapadakou, N.H. et Walsh, T.J. 1996: Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. Antimicrob. Agents Chemother. 40:279-291.
- Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. 2014 : Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. Phytothérapie; 12(1):15-24. doi:10.1007/s10298-014-0832-z.
- Ghannoum, M. A., K. Abu el-Teen, and S. S. Radwan. 1987: Blocking adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells. Mykosen 30:371-8.



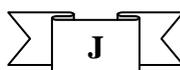
- Hossein Hosseinzadeh, Toktam Ziaee and Ali Ahi. 2007: Effect of *Marrubium vulgare* L. Aerial Parts Aqueous and Ethanolic Extracts on Morphine Withdrawal Syndrome in Mice, Pharmacologyonline 3: 422-427.
- Weitao Huang, Li Na, Paul L. Fidel and Paul Schwarzenberger. 2004: Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-*Candida albicans* Host Defense in Mice. The Journal of Infectious Diseases ; 190:624-31.
- Rosa Hernandez and Steffen Rupp. 2008: Human Epithelial Model Systems for the Study of *Candida* infections In Vitro : Part II. Histologic Methods for Studying. Chapter 10: Fungal Invasion; DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5_10.
- Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaria L, Garcia- Hernandez B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. 2004: Clinical trial of cecropia obtusifolia and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. Phytomedicine; 11(7-8):561-6. doi:10.1016/j.phymed.2004.01.006.
- Hiroshi Suzuki, Hideaki Taguchi, Kazuko Nishimura, Makoto Miyaji, Akira Nakamura and Hironori Nakajima. 1988: Studies on detection of *Candida* antigen in the sera of mice inoculated orally with *Candida albicans*, Mycopathologia 104: 7-17.
- Herrera-Arellano A. 2004: Aguilar Santamaria L., et al, Clinical trial of cecropiaobtusifolia and marrubium vulgare extract on blood glucose and srum lipids in type 2 diabetics, Phytomdicine, 11 (7-8) : 561-6.

Références Bibliographiques

- Hope, W.W., Taberero, L., Denning, D.W. et Anderson, M.J. 2004: Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4377-4386.



- Imamu X., A. Yili, H.A. Aisa, V.V. Maksimov, O.N. Veshkurova, Sh.I. Salikhov. 2007: Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Daucus carota sativa* Seeds. *Chem. Nat. Compd.* 43 (4): 495-496.
- Iwatani, W., Arika, T. et Yamaguchi, H. 1993: Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:785-788.



- Jesus R. A., Cechinel-Filho V. et al. 2000: Analysis of the antinociceptive properties of marrubinin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine*; 7 (2), 11-5.
- Julkunen-Titto, R. 1985: Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agr. Food Chem.* 33: 213-217.
- Jeremiah C, Katsayal UA, Nuhu A, Anafi SB, Ibrahim MA, Nuhu HD. 2019: Phytochemical screening and anti-inflammatory studies of *tapinanthus globiferus* (a. Rich) Teigh. Leaves three extracts. *Pharm Sci*; 25(2):124- 31. doi:10.15171/PS.2019.19.
- Jessup, C.J., Ryder, N.S. et Ghannoum, M.A. 2000: An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. *Med Mycol.* 38:155-159.
- Jensen J., Warner T. and Balish E. 1993: Resistance of SCID Mice to *Candida albicans* Administered Intravenously or Colonizing the Gut: Role of Polymorphonuclear Leukocytes and Macrophages, *the Journal of Infectious Diseases* ; 167 : 912-9.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P. 2002: Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1ère Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384.
- Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.-A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., Akira, S. & Poulain, D. 2003: *Candida albicans* Phospholipomannan Is Sensed through Toll-Like Receptors. *Journal of Infectious Diseases*, 188, 165–172.
- A. Jabrane, H. Ben Jannet, F. Harzallah-Skhiri, M. Mastouri, J. Casanova, Z. Mighri. 2009: Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *Maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and P PC-NMR Spectroscopy, and *in vitro* Antibacterial Activity. *Chem. Biodivers.* (6): 881-889.

Références Bibliographiques

- J. T. Jaouhari, H.B. Lazrek, M. Jana. 1999: Acute toxicity of 10 Moroccan plants reported to be hypoglycemic agents; 54(6):701-6. PMID: 10709443.



- Kai Sohn and Steffen Rupp. 2008: Human Epithelial Model Systems for the Study of Candida Infections In Vitro: Part I. Adhesion to Epithelial Models Host-Pathogen Interactions, DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5-9.
- Kaposzta R., Tree P., Marodi L. AND Gordon S. 1998: Characteristics of Invasive Candidiasis in Gamma Interferon and Interleukin-4-Deficient Mice: Role of Macrophages in Host Defense against *Candida albicans*, infection and immunity, p: 1708–1717.
- Kozyra M, Korga A, Ostrowska M, Humeniuk E, Adamczuk G, Gieroba R, et al. 2020: Cytotoxic activity of methanolic fractions of different *Marrubium* spp. Against melanoma cells is independent of antioxidant activity and total phenolic content. FEBS Open Bio; 10(1):86-95. doi:10.1002/2211-5463.12755.
- Kurtzman CP, Fell JW. 1998: The yeasts: a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Kanyonga P, Faouzi M, Meddah B, Mpona M, Essassi E, Cherrah Y. 2011: Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. J Chem Pharm Res; 3(1):199-204.
- Kakorin PA, Mikhalchik EV, Ramenskaya GV, Demura T, Kukes VG. 2018: Dermotropic activity of aqueous extract from *Caragana jubata* (pall.) poir. Shoots of orally administration in a model of contact dermatitis in rats. Russian J Biopharm; 10:57-63. doi:10.18097/pbmc20186403241.
- Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf. 2001: Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. Med Mycol 39 Suppl 1:1-8.
- Klis, F. M., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul. 2002: Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev 26:239-56.
- P. M. Kanyonga, M. A. Faouzi, B. Meddah, M. Mpona, E. M. Essassi and Y. Cherrah. 2011: Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities, J. Chem. Pharm. Res., 3(1):199-204.



- Lamia Belkherroubi-Sari, Zahia Boucherit, Kebir Boucherit, Slimane Belbraouet. 2011: Study of Renal Toxicity in Wistar Rats Following the Action of Amphotericin B Solution Prepared under Extreme pH Conditions, Food and Nutrition Sciences, 2, 731-735.
- Luigina Romani. 1999: Animal Models for Candidiasis, Current Protocols in Immunology; 19.6.1-19.6.16.

Références Bibliographiques

- Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Hrnairova K, Pospisilova S, Mayer J, et al. 2012: Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time pcr compared with galactomannan and (1, 3)- β -d-glucan detection. *J Clin Microbiol*; 50(3):602-8. doi:10.1128/JCM.05356-11.
- Lal S., Mitsayama M., Miyata M., Ogata N., Amako K., Nomoto K., Pulmonary defense mechanisms in mice. 1986: A comparative role of alveolar macrophages and polymorphonuclear cells against infection with candida albicans. *J. Clin Lab Immunol*; 19: 127.
- Santram Lodhi, Gautam Prakash Vadnere, Vimal Kant Sharma, Md. Rageeb Usman. 2017: *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. Volume 6; Issue 4. DOI:10.5455/jice.20170713060840.
- Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Lee, L.N., Kirkpatrick, W.R., White, T.C., Sanglard, D. et Pafterson, T.F. 1998: Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2932-2937.
- Lewis, R.E. 2005: Antifungal therapy cost analysis. Patterson, T. f. and McGinnis, M. R. (Ed.). Doctorfungus Corporation.
- Lortholary, O. et Dupont, B. 1997. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:477-504.
- J.R. Lawrence, D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, D.E. Caldwell, 1991: Optical sectioning of microbial biofilms, *Journal of Bacteriology*, 173; 6558-6567.
- Lees, N.D., Skaggs, B., Kirsch, D.R. et Bard, M. 1995: Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Lipids* 30:221-226.
- Monica Leopoldini, Immaculada Prieto Pitarch, Nino Russo and Marirosa Toscano. 2004: Structure, Conformation, and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. A First Principle Theoretical Study; *J. Phys. Chem. A* 2004, 108, 92-96.



- Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. 2009: Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(1):161-166.
- Marie Emmanuelle Hubert, Fabien Tissier, Michel Bataillon et Bernard Palate. 2008 : Place de l'histologie dans les études de toxicologie préclinique, *Rev. Fr. Histotechnol*, 21, 93-99.
- E. Mellado, M. Cuenca-Estrella, J. Regadera, M. Gonzalez, T. M. Diaz-Guerra, J. L. Rodriguez-Tudela. 2000: Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and

Références Bibliographiques

- Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 38: 21–28.
- Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, Apers S, Vingerhoets R, Cos P, et al. 2008: Screening of some tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J Ethnopharmacol*; 119(1):58-66. doi:10.1016/j.jep.2008.05.033.
 - Makhatova B, Datkhayev U, Makhatov ZB, Orazbekov Y. 2017: Antibacterial activity of verbascum songaricum various extracts against staphylococcus. *New Armenian Med J*; 11(4):67-9.
 - Maregesi, S., Pieters, L., Ngassapa, O., Apers, S., Vigerhoets, R., Cos, P., Vanden Berghe, D., Vlietink, A. 2008: Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 58–66.
 - Mason K.L., Downward J.R., Falkowski N.R., Young V.B., Kao J.Y. and Gary B. Huffnagle. 2011: Interplay between the Gastric Bacterial Microbiota and *Candida albicans* during Postantibiotic Recolonization and Gastritis, *Infection and Immunity* p. 150–158.
 - Maximiliano sortino, marcos derita, laura svetaz,marcela raimondi, melina di liberto, elisa petenatti,mahabir gupta, and susana zacchino. 2012: the role of natural products in discovery of new anti-infective agents with emphasis on antifungal compounds, *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*, Fourth Edition, 205-229.
 - Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. 2009: Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(1):161-166.
 - Mukherjee, P., Leidich, S., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N., Ghannoum, M. 2003: Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 82–86.
 - Mavor A. L., Thewes S. and Hube B. 2005: "Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes." *Curr Drug Targets* 6(8): 863-74.
 - D. W. R. Mackenzie. 1963: Serum tube identification of *Candida albicans*, *J. clin. Path.* 15, 563.
 - Meyre-Silva C, Yunes R, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V. 2005: Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (lamiaceae). *Farmacol*; 60(4):321-6. doi:10.1016/j.farmac.2005.01.003.
 - Mackenzie D. 1962: Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*; 15(6):563-5. doi:10.1136/jcp.15.6.563.
 - MONNET T. 2011: les infections nosocomiales :l'importance d'un suivi épidémiologique et de l' identification rapide des bactéries en cause, université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de Grenoble.

Références Bibliographiques

- Maruyama J., Juvvadi P. R., Ishi K. and Kitamoto K. 2005: "Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*." *BiochemBiophys Res Commun* 331(4): 1081-8.
 - Manning, M., and T. G. Mitchell. 1980: Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol* 144:258-73.
 - Martino, P., Gîrmenia, C., l'icozzi, A., De Bernardis, F., Boccanera, M. et Cassone, A. 1994: Prospective study of *Candida* colonization, use of empiric amphotericin B and development of invasive mycosis in neutropenic patients. *Eur. J Clin Microbiol.Infect Dis* 13:797-804.
 - Madhavan P, Jamal F, Chong PP. 2011: Laboratory isolation and identification of *Candida* species. *J Appl Sci*; 11:2870 doi:10.3923/jas.2011.2870.2877.
 - Niedenthal T, Mayer JG. 2017: Der weisse andorn ist zur lungesucht gar gut. *Z Phytother*; 38(06):253-7. doi:10.1055/s-0043-122334.
 - P.K. Mukherjee, G.Y. Zhou, R. Munyon, M.A. Ghannoum, *Candida* biofilm. 2005: a well- designed protected environment, *Medical Mycology*, 43; 191-208.
 - Z. Ti-Iaddeus Mankowski, M. D.1972: Increased Carbohydrate Content In The Thymus And Spleen In Mice Receiving *Candida albicans* Orally (Occurence Of Lymphomas); *Mycopathologia Et Mycologia Applicata*, Vol. 47, 3, Pag, 189-206.
 - Mokhtar M, Soukup J, Donato P, Cacciola F, Dugo P, Riazi A, et al. 2015: Determination of the polyphenolic content of a capsicum annum l. Extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity. *J Sep Sci*; 38(2):171-8. doi:10.1002/jssc.201400993.
 - Meyre-Silva C, Cechinel-Filho V. 2010: A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus *marrubium*. *Curr Pharm Des*. ;16(31):3503-18. doi:10.2174/138161210793563392
- 
- Norihiko Kanaguchi, Naoki Narisawa, Tatsuro Ito, Yosuke Kinoshita, Yasuka Kusumoto, Osamu Shinozuka and Hidenobu Senpuku. 2012: Effects of salivary protein flow and indigenous microorganisms on initial colonization of *Candida albicans* in an in vivo model, *BMC Oral Health*, 12:36
 - Emira Noumi, Mejdj Snoussi, Sonia El Ghoul, Mahmoud Rouabhia and Amina Bakhrouf. 2011: Effect of glucose supplementation on *Candida albicans* virulence in immunosuppressed Swiss albino mice (*Mus musculus*), *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(17), pp. 2479-2487

Références Bibliographiques

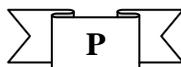
- Netea M. G., Brown G. D., Kullberg B. J. and Gow N. A. 2008: "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." *Nat Rev Microbiol* 6(1): 67-78.
- Noumi E, Snoussi M, El Ghouli S, Rouabhia M, Bakhrouf A. 2011: Effect of glucose supplementation on *Candida albicans* virulence in immunosuppressed swiss albino mice (*mus musculus*). *Afr J Microbiol Res*; 17:2479-87. doi:10.5897/AJMR10.585.
- Nawwar MA, El-Mousallamy AM, Barakat HH, Buddrus J, Linscheid M. 1989: Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*; 28(11):3201-6. doi:10.1016/0031-9422(89)80307-3.
- Nolte, F.S., Parkinson, T., Falconer, D.J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. et Wingard, J.R. 1997: Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B- resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:196-199.
- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J. & Gow, N.A.R. 2008: An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 67–78.



- Odds, F.C., Brown, A.J. et Gow, N.A. 2003: Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11:272-279.
- Offner, F., Krcmery, V., Boogaerts, M., Doyen, C., Engeihard, D., Ribaud, P., Cordonnier, C., de Pauw, B., Durrant, S., Marie, J.P., Moreau, P., Guiot, H., Samonis, G., Sytvester, R. et Herbrecht, R. 2004: Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4808-4812.
- Nadia Amessis-Ouchemoukha, Khodir Madani, Pedro L.V. Faléb, M. Luisa Serralheiro, Maria Eduarda M. Araújo. 2014: Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 53: 6– 15.
- Ernest Olfert, Jag Bhasin, Richard Latt, McGill, Warner-Lambert. Kathie McCutcheon, Don Rainnie, Michael Schunk. 1998 : Les Lignes directrices du CCPA: choisir un point limite approprié pour les expériences faisant appel à l'utilisation des animaux en recherche, en enseignement et dans les tests ont été élaborés par le Sous-comité ad hoc sur les points limites du Comité des lignes directrices du CCPA.
- OCDE. 2000: Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. *Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment*: 19.

Références Bibliographiques

- Ortega M., Rovira M., Almela M., Marco F., de la Bellacasa J. P., et al. 2005: "Bacterial and fungal bloodstream isolates from 796 hematopoietic stem cell transplant recipients between 1991 and 2000." *Ann Hematol* 84(1): 40-6.



- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Huynh, H., Louis, R.J. et Dieckma, D.J. 2002: In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:35 18-3521.
- Pfaller, M.A., Dieckema, D.J., Boyken, L., Messer, S.A., Tendoikar, S., Louis, R.J. et Goldstein, B.P. 2005: Effectiveness of anidulafungin in eradicating *Candida* species in invasive candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4795-4797.
- Popoola OK, Elbagory AM, Ameer F, Hussein AA. 2013: Marrubiin. *Molecules*; 18(8):9049-60. doi:10.3390/molecules18089049.
- V. Paunovic, M. Kopic, S. Djordjevic, A. Zugic, N. Djalina, U. Gasic, V. Trajkovic, J. Harhaji-Trajkovic. 2016 : *Marrubium vulgare* ethanolic extract induces proliferation block, apoptosis, and cytoprotective autophagy in cancer cells in vitro; *Cell. Mol. Biol.* 62 (11): 108-114.
- Paula de Oliveira A, Santin JR, Lemos M, Klein Júnior LC, Couto AG, Meyre da Silva Bittencourt C, et al. 2011: Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *J Pharm Pharmacol*; 63(9):1230-7. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01321.x.
- Paris M., Hurabielle M.1980 : *Abrégé de matière médicale Pharmacognosie*. Tome 1ere Ed : Masson. Paris. pp. 82-89.
- P.G. Rossi, L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Casanova, J.M. Bolla, L. Berti. 2007: (E)-Methyl isoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*. *J. Agric. Food.Chem.* (55): 7332-7336.
- Panwar, S.L., Krishnamurthy, S., Gupta, V., Alarco, A.M., Raymond, M., Sanglard, D. et Prasad, R. 2001: An alkane assimilating cytochrome P450, confers multidrug resistance when expressed in a hypersensitive strain of *Candida albicans*. *Yeast* 18:1117-1129.
- Prasad, R., Dewergifosse, P., Goffeau, A. et Baizi, E. 1995: Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* 27:320-329.
- Poulain, D., C. Faille, J. C. Michalsky, and D. Camus. 1990: Anticorps monoclonaux anti-*Candida albicans* : de la biologie cellulaire aux marqueurs de comportement pathogène. *Med. Scien.*:526-533.
- Poulain, D., G. Tronchin, J. F. Dubremetz, and J. Biguet. 1978: Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive

Références Bibliographiques

layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann Microbiol (Paris)* 129:141-53.

- Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, de Waard P, van Beek TA. 2012: Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in lithuania. *Food Chem*; 130(3):695- 701. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.112.
- Ana Plazonić , Franz Bucar , Željko Maleš , Ana Mornar , Biljana Nigović and Nikola Kujundžić . 2009: Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry; *Molecules* 2009, 14, 2466-2490; doi:10.3390/molecules14072466.
- Hugo Palafox-Carlos, Joana Gil-Chávez, Rogerio R. Sotelo-Mundo, Jacek Namiesnik , Shela Gorinstein and Gustavo A. González-Aguilar. 2012: Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in ‘Ataulfo’ Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids ; *Molecules* 2012, 17, 12657-12664; doi:10.3390/molecules171112657.
- Maïke Petersen,, Monique S.J. Simmonds. 2003: Rosmarinic acid ; *Phytochemistry* 62 (2003) 121–125.



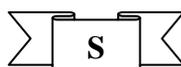
- Quezel P., Santa, S. 1963: La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed : CNRS. Paris. 360-361 p.



- Richard T. Sawyer and Allen G. Harnesen. 1989: The relative contribution of resident pulmonary alveolar macrophage and inflammatory polymorphonuclear in host resistance to pulmonary infection by *Candida albicans*, *Mycopathologia* 108: 95-105.
- Rezgui M, Majdoub N, Mabrouk B, Baldisserotto A, Bino A, Kaab LBB, et al. 2020: Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. Against pathogenic dermatophyte strains. *J Mycol Med*: 100927. doi:10.1016/j.mycmed.2020.100927.
- Renne RA, Sumner W, Harkema JR, Davis C, AG BSP. Draft oecd guidance document on histopathology for inhalation toxicity studies, supporting tg 412 (subacute inhalation toxicity: 28-day) and tg 413 (subchronic inhalation toxicity: 90-day).
- Francisco J. Rivas, Fernando J. Beltran Nm, Jesus Frades And Paco Buxeda. 2001: Oxidation Of P-Hydroxybenzoic Acid By Fenton's Reagent. *Wat. Res.* Vol. 35, No. 2, Pp. 387-396.
- Mimi Remickova, Svetla Danova , Catalin Tucureanu, Lucian Lerescu , Aurora Salageanu Petya Dimitrova. 2009: Effect of *Candida albicans* dsDNA in Gastrointestinal *Candida* Infection, *Mycopathologia* 167:333–340.

Références Bibliographiques

- Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. 1998: Efficacy of api 20c and id 32c systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*; 36(11):3396-8.
- Ronald A. Greenfield et Wendy A. Joyce. 1993: Gastric colonization with *Candida albicans*, *Mycopathologia* 122: 1-5.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996: Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.
- Raynaud J. 2007 : Prescription et conseil en phytothérapie. Ed : Tec & Doc. Paris. 149 p.
- Reiss, E., V. M. Hearn, D. Poulain, and M. G. Shepherd. 1992: Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1:143-56.
- Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentin, and R. Sentandreu. 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 6:14-29.
- Rahman, D., Mistry, M., Thavaraj, S., Challacombe, S.J. & Naglik, J.R. 2007: Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 9, 615-622.
- Rex, J.H., Walsh, T.J., Sobel, J.D., Filer, S.G., Pappas, P.G., Dismukes, W.E. et Edwards, J.E. 2000: Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis* 30:662-678.
- Polak, A. 1993: Combination of amorolfine with various antifungal drugs in dermatophytosis. *Mycoses* 36:43-49.
- Rosa Hernandez and Steffen Rupp. 2008: Human Epithelial Model Systems for the Study of *Candida* infections In Vitro: Part II. Histologic Methods for Studying Fungal Invasion, Host-Pathogen Interactions, DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5-10.



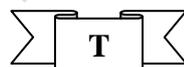
- Sanglard, D., Kucliler, K., Isclier, F., Pagani, J.L., Monod, M. et Bille, J. 1995: Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antirmicrob. Agents Chemother.* 39:2378-2386.
- Sahpaz S, Hennebelle T, Bailleul F. 2002: Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Nat Prod Lett*; 16(3):195-9. doi:10.1080/10575630290013576.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. 1965: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.
- Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. 2014: Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol*; 52(6):636-40. doi:10.1093/mmy/myu003.

Références Bibliographiques

- Schlemper V, Ribas A, Nicolau M, Cechinel Filho V. 1996: Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of marrubium vulgare on isolated tissues. *Phytomedicine*; 3(2):211-6. doi:10.1016/S0944-7113(96)80038-9.
- Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L. et Bille, J. 1998: Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP 51 Ai) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:241-253.
- Sanglard, D. et Odds, F.C. 2002: Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2:73-85.
- Squires S., Larsen K., Cheung, R.A., Hyslop T., Lai N., Schneider K.K., Kauffman D., Saag C., Dismukes M. et Powderly, W. 1997: Treatment of histoplasmosis with fluconazole in patients with acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Acquired Immunodeficiency Syndrome Clinical Trials Group and Mycoses Study Group. *Am. J. Med.* 103:223-232.
- Syed, T.A. et Maibach, L. 2000: Butenafine hydrochloride: for the treatment of interdigital tinea pedis. *Expert Opin. Pharmacother.* 1:467-473.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. et Sibley, CM. 1999: Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:40-79.
- Sturley, S.L. 2000: Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1529:155-163.
- Schaffner William. Les infections nosocomiales. *CECIL Traité de médecine interne. 1ère édition française.* ch : 267. P 1548-1555.
- Siems, J.J. ET Allen, S.D. 1989: Early euthanasia as an alternative to death in chronic infectious disease studies using a systemic *Candida albicans* model. *Abstr. 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology.*
- Kai Sohn and Steffen Rupp. 2008: Human Epithelial Model Systems for the Study of *Candida* Infections In Vitro : Part I. Adhesion to Epithelial Models. *Host-Pathogen Interactions* ; Chapter 9 ; DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5_9.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J. and Edwards, J.E. 2004: Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 279, 30480.
- Saad H.E.A., S.H. El Sharkawy, A.F. Halim. 1995: Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharm. ActaHelv.* (70): 79-84.
- Sahpaz S., Hennebelle T., Bailleul F. et al, 2002: Marrubosedia new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare*, *Nat Prod Lett*, 16 (3); 195-9.

Références Bibliographiques

- Souza M.M., Jesus R.A. et al. 1998: Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine*; 5 (2): 103-107. Etude mentionnée dans : Naturel standard- White horehound.
- Selma Tobudic, Andrea Lassnigg, Christina Kratzer, Wolfgang Graninger and Elisabeth Presterl. 2008: Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases, *Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases* 53, 208–214.
- Sundstrom P., Balish E., and Allen C.M. 2002: Essential Role of the *Candida albicans* Transglutaminase Substrate, Hyphal Wall Protein 1, in Lethal Oesophageal Candidiasis in Immunodeficient Mice ; *The Journal of Infectious Diseases* ; 185:521–30.
- Siems J, Allen S, editors. 1989: Early euthanasia as an alternative to death in chronic infectious disease studies using a systemic *Candida albicans* model. Abstr 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. 2004: Functional and structural diversity in the als protein family of *Candida albicans*. *J Bio Chem*; 279(29):30480-9. doi:10.1074/jbc.M401929200.
- M. Soltani , A.R. Khosravi, F. Asadi, H. Shokri. 2012: Evaluation of protective efficacy of *Spirulina platensis* in Balb/C mice with candidiasis, *Journal de Mycologie Médicale* 22, 329 - 334.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W. & Azeredo, J. 2012: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 288–305.



- Takahashia K., Kitab E., Konishia M., Yoshimotoa E., Mikasaa K., Naritac N., Hiroshi Kimura. 2007: Translocation model of *Candida albicans* in DBA-2/J mice with protein calorie malnutrition mimics hematogenous candidiasis in humans, *Microbial Pathogenesis* 35, p : 179–187.
- Tir Touil Meddah A., Leke L., Romond L.B., Grenier E., Cordonnier C., Risbourg B., Canarelli J.P. 2001 : The effect of mesenteric ischemia on ileal colonization, intestinal integrity, and bacterial translocation in newborn piglets. *Pediatr Surg Int* 17: 515-520.
- Tlili H, Marino A, Ginestra G, Cacciola F, Mondello L, Miceli N, et al. 2019: Polyphenolic profile, antibacterial activity and brine shrimp toxicity of leaf extracts from six tunisian spontaneous species. *Nat Prod Res*: 1- 7. doi:10.1080/14786419.2019.1616725.
- Tasseau F, Baron D. 1989 : Infections nosocomiales. In: BRUCKER G et FASSIN D, eds. Santé publique. Paris : Ellipses ; 478-92.
- Tortorano A. M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C. C., et al. 2004: "Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month

Références Bibliographiques

European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(4): 317-22.



- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Wagner R.D, Warner T, Balish E. 1999: Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. *Infect Immun*; 67: 670 - 4.

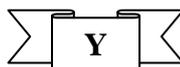


- Walbaum S, Dujardin L. 1985: Individual evolution of digestive tract colonization of holoxenic mice by *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 48: 433-438.
- Wichtl M., Anton R. 2003: *Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique*. 2e Ed : TEC & DOC. Paris. pp. 1-364.
- White, T.C., Marr, K.A. et Bowden, R.A. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:3 82-402.
- Wiederhold, N.P. et Lewis, R.E. 2003: The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 12:1313-1333.
- Waynforth D, Brain P, Sharpe M, Stewart M, Applebee M, Darke D. 1998: Good practice guidelines. Administration of substances (rat, mouse, guinea pig, rabbit). Association, LAS (Ed) (1):4.
- Warnock D. W. 2007: "Trends in the epidemiology of invasive fungal infections." *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48(1): 1-12.
- WH Organization. 1993: Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines: Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific.
- Weel KG, Venskutonis PR, Pukalskas A, Gruzdiene D, Linssen JP. 1999: Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L.) grown in lithuania. *Lipid Fett*; 101(10):395-400.doi :10.1002/(SICI)1521-4133(199910)101:10<395::AID-LIPI395>3.0.CO;2-L.
- Waynforth H.B.; P. Brain; T. Sharpe; D. F. Stewart; K. A. Applebee; P. G. G. Darke. 1998: GOOD PRACTICE GUIDELINES Administration of Substances (Rat, Mouse, Guinea Pig, Rabbit), Series 1/Issue 1.



- Xavier Thuru, Samir Jawhara , Annie Standaert-Vitse, Thierry Jouault, Serge Mordon, Boualem Sendid, Pierre Desreumaux and Daniel Poulain. 2008: Colonization of Mice by *Candida albicans* Is Promoted by Chemically Induced Colitis and Augments Inflammatory Responses through Galectin-3, *The Journal of Infectious Diseases*; 197:972– 80.

Références Bibliographiques



- Rebeca Yepez, Salvador Garc Persi Schachat, Manuel Sanchez-Sanchez, Juan H. Gonzalez-Estefan, Eduardo Gonzalez-Zamora, Ilich A. Ibarra, and Julia Aguilar-Pliego. 2013: Catalytic activity of HKUST-1 in the oxidation of *trans*-ferulic acid to vanillin; DOI: 10.1039/c3nj00000x.
- Yousefi K, Fathiazad F, Soraya H, Rameshrad M, Maleki- Dizaji N, Garjani A. 2014: *Marrubium vulgare* L. Methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *BioImpacts*; 4(1):21. doi:10.5681/bi.2014.001.
- Yahiaoui F, Zaouani M, Kardjadj M, Laghouati A, Kadour R, Bouzid N, et al. 2018: Antibacterial, antioxidant and wound healing activities of *Marrubium vulgare* and *Cytisus triflorus* extracts native to Algeria. *Phytotherapie*; 16(S1):S32-S9. doi:10.3166/phyto-2018-0015.
- Rebeca Yepez, Salvador Garcia, Persi Schachat, Manuel Sanchez-Sanchez, Juan H. Gonzalez-Estefan, Eduardo Gonzalez-Zamora, Ilich A. Ibarra and Julia Aguilar-Pliego. 2013 : Catalytic activity of HKUST-1 in the oxidation of *trans*-ferulic acid to vanillin. *New J. Chem.*,37, 1-3. DOI: 10.1039/c3nj00000x.
- Yousefi K, Soraya H, Fathiazad F, Khorrami A, Hamedeyazdan S, Maleki-Dizaji N, et al. 2013: Cardioprotective effect of methanolic extract of *Marrubium vulgare* L. On isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Indian J Exp Bio*; 51(8):653-60.



- Zhiyong He · Wenshui Xia · Jie Chen. 2008: Isolation and structure elucidation of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit; *Eur Food Res Technol*; 226:1191–1196; DOI 10.1007/s00217-007-0653-5.
- Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, Ben Mansour R, Bekir A, Mejdoub H, et al. 2011: The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. Essential oil grown in Tunisia. *Lipids Health Dis*; 10(1):161. doi:10.1186/1476- 511X-10-161.
- Huan Zeng, Yuzhi Wang, Jinhuan Kong, Chan Nie, Ya Yuan. 2010: Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants; *Talanta* 83; 582–590.
- Zohra BAF, Merzouk H, Bouanane S, Benkalfat NB, Merzouk SA, Mulengi JK, et al., editors. 2010 : Évaluation de la toxicité aiguë de la 2-hydroxyméthyl-1 (n-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat wistar. *Ann Toxicol Anal*: EDP Sciences. doi:10.1051/ ata/2010017.
- K. Rigon Zimmer, C. Mullié, A. Tir Touil Meddah, P. Buisson, L. Léké, J.P. Canarelli. 2008 : Impact of Colostomy on Intestinal Microflora and Bacterial Translocation in Young Rats Fed with Heat-Killed *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *Folia Microbiol.* 53 (1), 89–93.



Références Bibliographiques

- Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé R. 2017: Anti-Candida albicans natural products, sources of new antifungal drugs: A review. J Mycol Med; 27(1):1-19. doi:10.1016/j.mycmed.2016.10.002.



Annexe



الجزائر :

رقم :

ENSA, 3 mars 2020

ATTESTATION

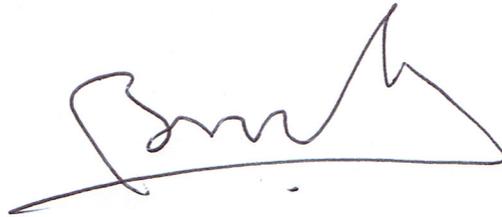
Nous attestons par la présente l'identification de l'échantillon apporté par M. Chabane Mahmoud Adel comme étant : ***Marrubium vulgare L.***

La nomenclature adoptée par Quézel et Santa (1962-1963) est validée par l'index synonymique des plantes d'Afrique du Nord et accessible sur le lien suivant : <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/recherche.php?langue=fr>.

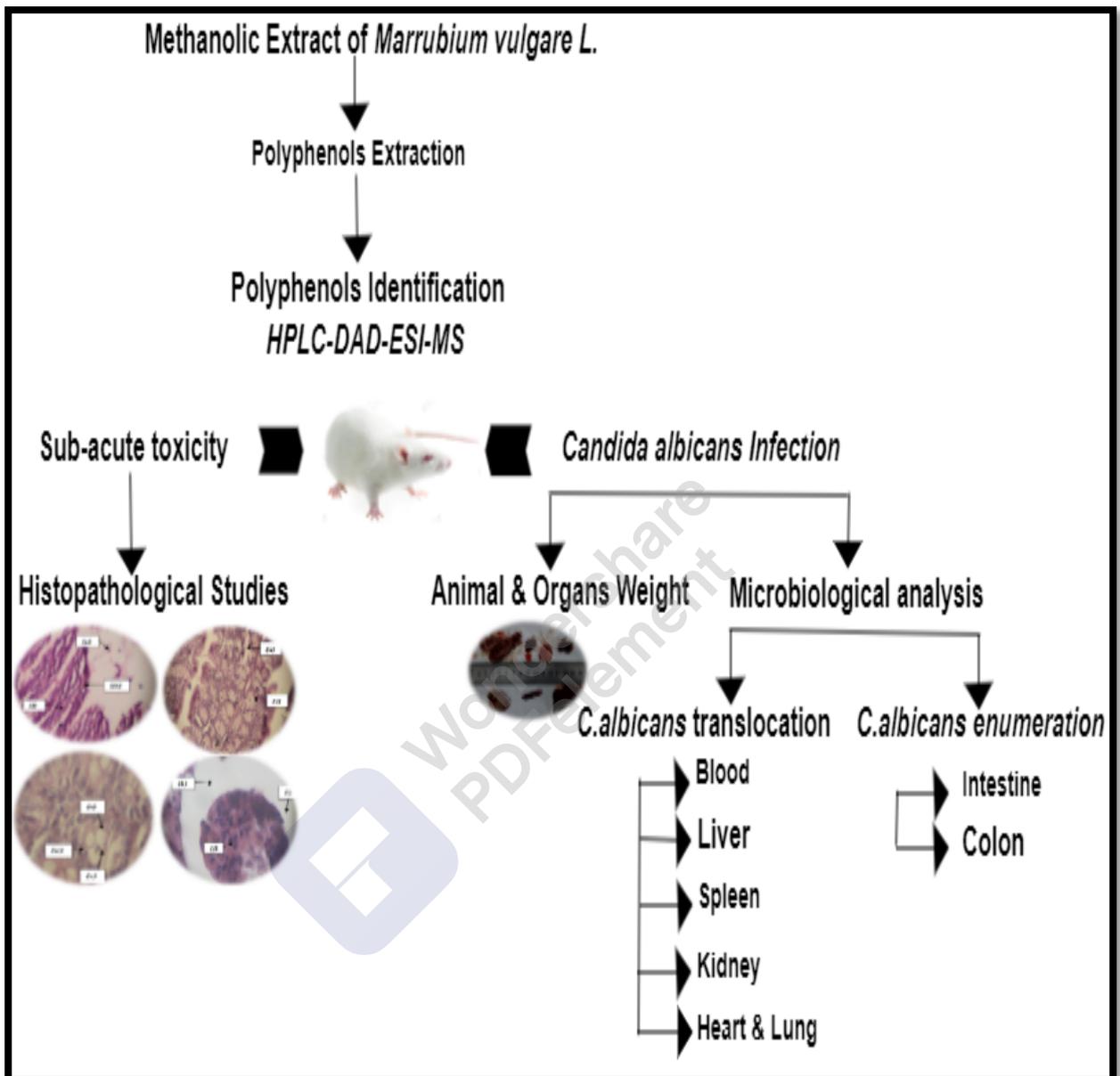
Cette attestation est délivrée à la demande du doctorant M. Chabane Mahmoud Adel.

Pour l'herbier ENSA,

Pr. Benhouhou Salima



1. Résumé graphique (Graphical abstract)



2. La composition de PBS (Phosphate Buffer Saline) :

Chlorure de sodium.....	8g
Chlorure de potassium.....	0,2g
Phosphate dissodique.....	1,15g
Phosphate monopotassique.....	0,2g

pH = 7,3

Autoclaver 15mn à 120°C.

3. La composition des milieux de culture :**• Sabouraud Dextrose Agar (SDA) :**

Peptone pepsique de viande.....	10g
Glucose.....	35g
Agar.....	15g
Chloramphénicol.....	0,5g

pH = 5,7± 0,2

Autoclaver 15mn à 120°C.

• Yeast Extract Peptone Agar (YEPA) :

Extrait de levure.....	10g
Bacto-peptone.....	20g
Glucose.....	20g
Chloramphénicol.....	0,5g

pH = 6,5 ± 0,2

Autoclaver 15mn à 120°C.

4. Préparation des solutions en histologie

- **Préparation du formol (10%) :**

- **A partir du formaldéhyde poudre :**

Poudre de formaldéhyde.....	10g
Phosphate mono sodique hydraté.....	0,45g
Phosphate di sodique hydraté.....	0,80g
Eau distillée.....	100ml

- **A partir d'une solution de formaldéhyde (40%) :**

Formaldéhyde 40%.....	25ml
Phosphate mono sodique hydraté.....	0,45g
Phosphate di sodique hydraté.....	0,80g
Eau distillée.....	100ml

- **Hématoxyline de Harris**

Hématoxyline.....	5g
Alun de potasse.....	100g
Oxyde jaune de mercure.....	2,5g
Alcool éthylique.....	50ml
Eau distillée.....	100ml

- **Eosine (1%)**

Eosine bleuâtre.....	10g
Eau distillée.....	1000ml

5. Alimentation des rats

Les rats sont nourris d'un régime complet (sous forme de granule). L'aliment est composé de céréales, huile de Soja, tourteaux de Soja, carbonate de calcium, phosphate monocalcique, lysine, méthionine plus le CMV (Complexe-minéralo-vitaminiques) : Glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 3.4%, cellulose brute 3%, cendre brute 4.9%, humidité 14%, vitamine 1.7%.

NB : Alimentation en eau et nourriture leur sont fournis *ad libitum*.

Tableau 1 : Identification biochimique de *Candida albicans* (Api-Candida)

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
1) <u>GLU</u>	D-glucose	1,4	acidification (GLUcose)	violet gris-violet	jaune vert / gris
2) <u>GAL</u>	D-galactose	1,4	acidification (GALactose)		
3) <u>SAC</u>	D-saccharose	1,4	acidification (SACcharose)		
4) <u>TRE</u>	D-trehalose	1,4	acidification (TREhalose)		
5) <u>RAF</u>	D-raffinose	1,4	acidification (RAFfinose)		
6) β MAL	4-nitrophényl- β D-maltopyranoside	0,08	β -MALtosidase	incolore	jaune pâle-jaune vif
7) α AMY	2-chloro-4-nitrophényl- α D maltotrioside	0,168	α -AMYlase	incolore	jaune pâle-jaune vif
8) β XYL	4-nitrophényl- β D-xylopyranoside	0,095	β -XYLosidase	incolore-jaune très pâle / bleu / vert **	jaune pâle-jaune vif
9) β GUR	4-nitrophényl- β D-glucuronide	0,063	β -GLUcRonidase	incolore / bleu / vert	jaune pâle-jaune vif
10) <u>URE</u>	urée	1,68	UREase	jaune-orange pâle	rouge
11) β NAG (dans tube n° 8) *	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acétyl- β D-glucosaminide	0,09	N-Acétyl- β -Glucosaminidase	incolore / jaune	bleu / vert **
12) β GAL (dans tube n° 9) *	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopyranoside	0,0815	β -GALactosidase	incolore / jaune	bleu / vert

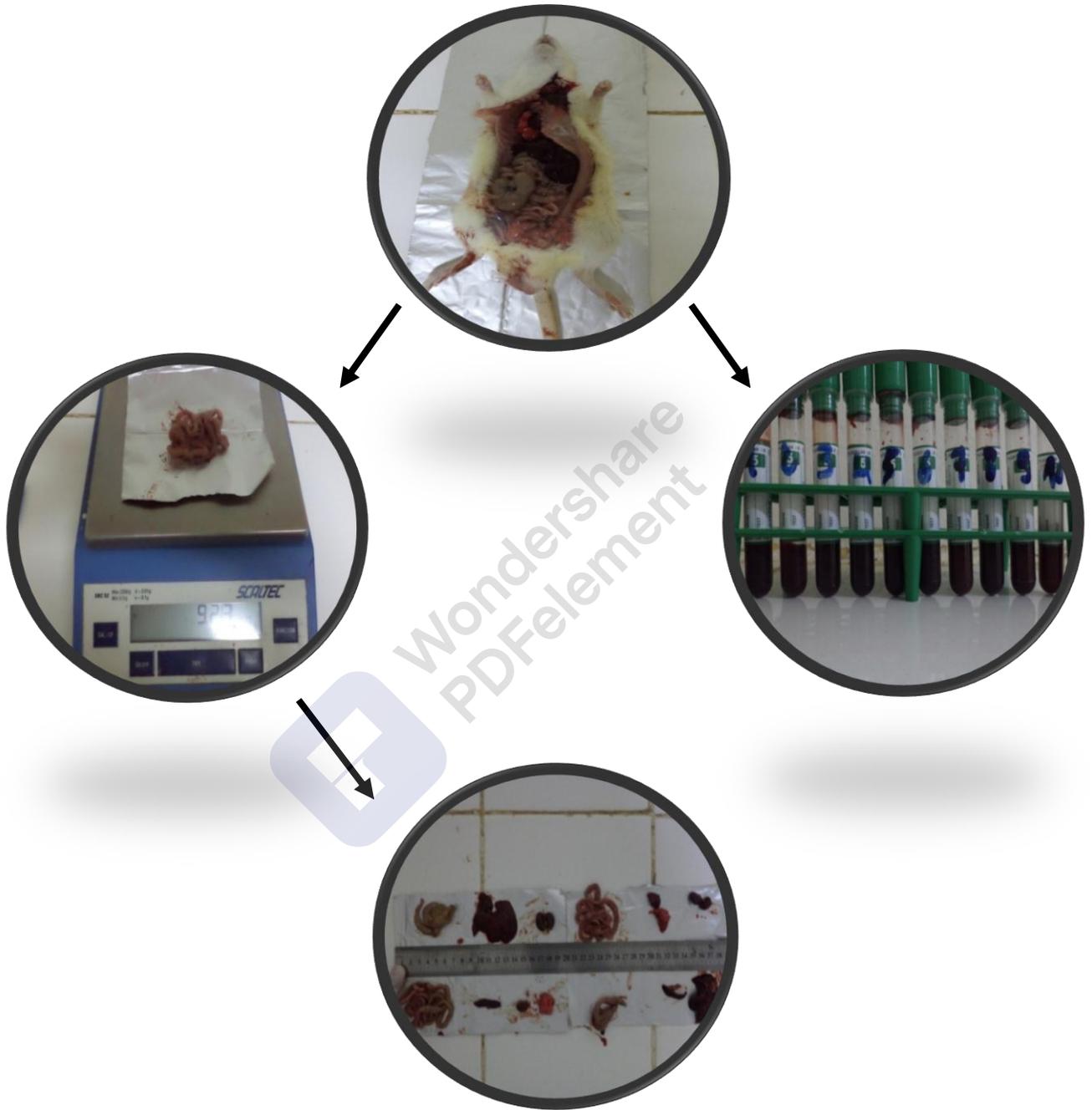


Figure 1 : Protocole de sacrifice des rats

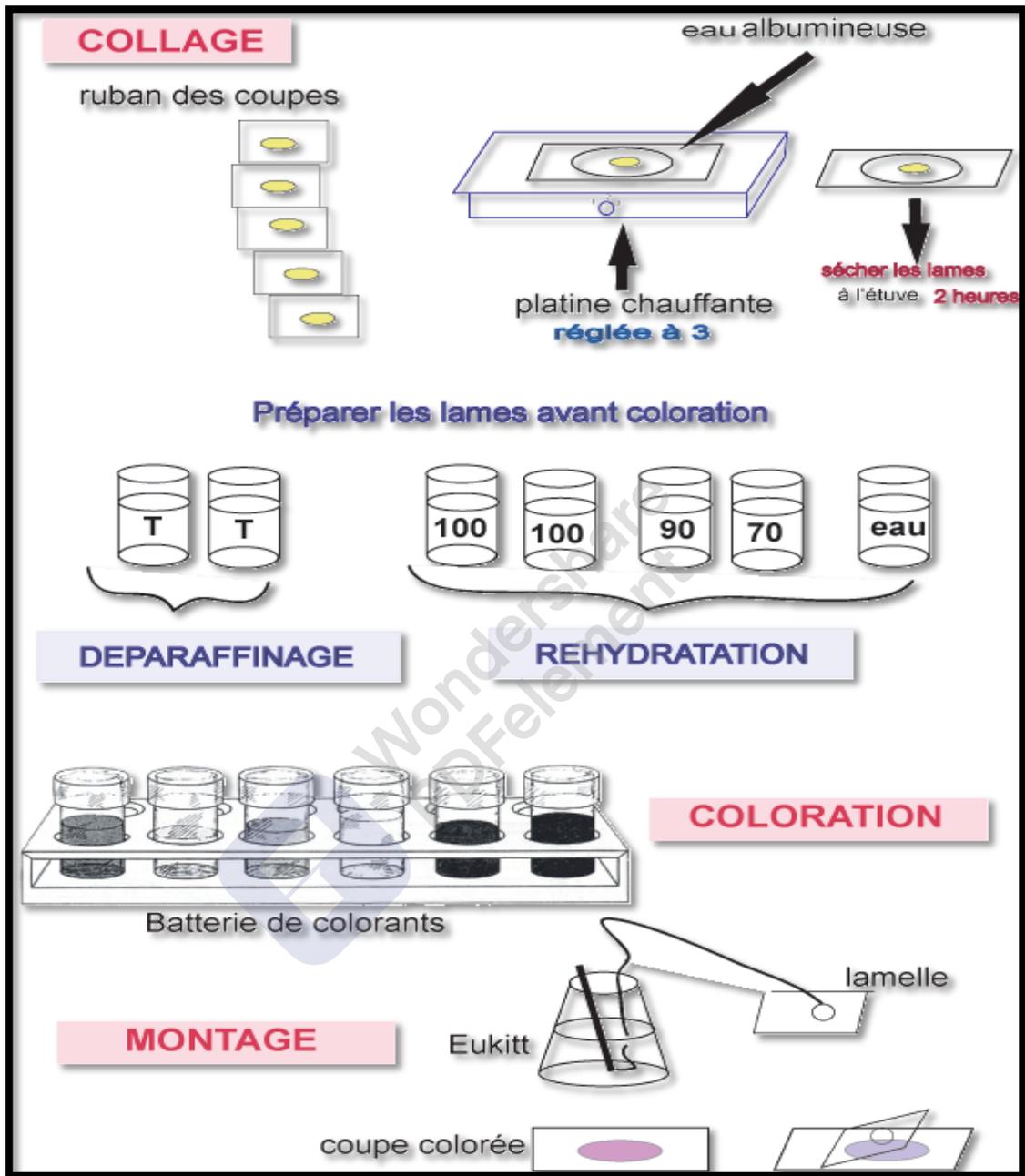


Figure 2 : Méthode classique des coupes histologiques à l'Hémaroxylyne et Eosine (HE)

6. Analyse statistique

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Les résultats sont traités par le **logiciel R (3.4.2)**, ce dernier est un logiciel de statistique créé par **Ross Ihaka & Robert Gentleman**. Il est à la fois un langage informatique et un environnement de travail: les commandes sont exécutées grâce à des instructions codées dans un langage relativement simple, les résultats sont affichés sous forme de texte et les graphiques sont visualisés directement dans une fenêtre qui leur est propre. C'est un clone du logiciel S-plus qui est fondé sur le langage de programmation orienté objet S, développé par **AT&T Bell Laboratories** en 1988. Ce logiciel sert à manipuler des données, à tracer des graphiques et à faire des analyses statistiques sur ces données.

L'analyse ANOVA multivariée a été réalisée sur les résultats ; dans lequel : les 4 groupes (Groupe A, B, C et D), les organes, les rats et les jours ont été traités comme des facteurs fixes. S'il y a une différence significative, le test « t » de Student est utilisé afin de déterminer la différence entre le groupe A « placebo » et le groupe B « essai ».

L'analyse des principaux composés (APC) a été réalisée combinée avec la comparaison multiple (Tukey Post Hoc) afin de déterminer la différence entre groupes (A, C et D) sur le nombre d'UFC dans les organes. Un ($P < 0,05$) est considéré comme significatif.

Tableau 2a. Evolution du poids des rats durant l'étude de la toxicité subaigüe

	Poids ^a des rats (g) \pm SEM				
	Jour 1	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28
Groupe A	107.01 \pm 10.38	142.24 \pm 11.38	174.61 \pm 12.29	194.28 \pm 10.47	223.06 \pm 13.74
Groupe B	104.87 \pm 9.55	136.67 \pm 13.47	180.67 \pm 14.66	227.76 \pm 11.88	256.31 \pm 11.47

^a $P < 0.05$

6.1. Test de Student "t"

The unpaired t method tests the null hypothesis that the population means related to two independent, random samples from an approximately normal distribution are equal.

Tableau 2b. Test de student “t” (Poids des deux groupes A et B).

t	df	p-value
12.079	9	0.0000007279

Il y avait une différence significative à ($p < 0.05$) ; dans lequel, l’information la plus importante à retenir c’est l’intervalle de confiance.

Table 3a. Evolution de poids des rats durant la période du traitement curatif

Poids ^a des rats exprimé en (g) ± SD			
Jours	Groupe A	Groupe C	Groupe D
1	107.1 ± 11.74	120.89 ± 3.61	112,67 ± 9.47
2	110.74 ± 10.45	125.78 ± 10.68	112,86 ± 7.56
3	114.04 ± 10.29	136.95 ± 9.02	120,32 ± 8.69
4	118.62 ± 13.42	142.1 ± 7.45	126,41 ± 7.38
5	125.52 ± 11.85	148.99 ± 9.01	133,46 ± 7.39
6	137.98 ± 11.74	154.45 ± 8.51	140,91 ± 7.65
7	142.24 ± 9.58	158.15 ± 7.11	142,83 ± 9.20
8	148.79 ± 11.18	160.33 ± 6.12	144,48 ± 10.92
9	150.03 ± 13.37	164.02 ± 11.86	142,35 ± 10.00
10	155.02 ± 13.57	171.03 ± 9.66	149,62 ± 12.62

^a $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groupes ; C vs D ; $P < 0.01$ groupes ; A vs C (Comparaison multiple des moyennes : Tukey Contrasts).

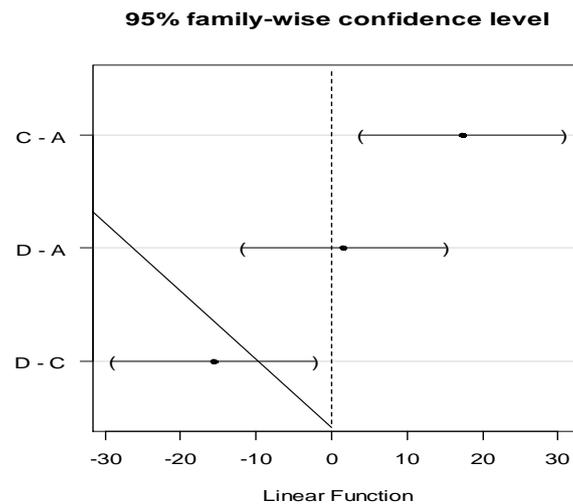
6.2. ANOVA à un seul facteur

Analyse de la variance a été réalisé (ANOVA) afin de déterminer s’il existe une différence sur le variable (poids) entre les groupes A, B et D durant une période de 10 jours.

Etant donné que le test de normalité et l’homogénéité de la distribution ont été pris en considération à l’avance afin d’appliquer l’ANOVA à un seul facteur par la suite.

Tableau 3b. Anova à un seul facteur (Tukey)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	Code
A- C	17.259	5.43	3.179	0.00994	**
A - D	1.581	5.43	0.291	0.95441	
C - D	-15.678	5.43	-2.88	0.0200	*
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					



Par conséquent, le test ANOVA a révélé une différence hautement significative ($P < 0.001$) entre les groupes : A-C et C-D durant les 10 jours post-inoculations ($P < 0.05$).

Tableau 4a. Poids des organes internes des rats

		Poids des Organes Internes exprimé en (g) \pm SD						
	N° de rats	Intestin ^a	Colon ^b	Foie ^c	Rate ^d	Rein ^e	Coeur ^f	Poumon ^g
Groupe A	10	8.70 \pm	3.79 \pm	6.99 \pm	0.5 \pm	0.83 \pm	0.73 \pm	1.16 \pm
		1.18	0.88	0.7	0.11	0.11	0.06	0.2
Groupe B	10	10.38 \pm	3.64 \pm	10.5 \pm	0.65 \pm	1.18 \pm	0.79 \pm	1.52 \pm
		1.63	0.49	0.46	0.17	0.13	0.05	0.16
Groupe C	10	8.24 \pm	5.14 \pm	7.2 \pm	0.59 \pm	0.63 \pm	0.55 \pm	1.4 \pm
		0.53	0.47	1.13	0.06	0.07	0.06	0.15
Groupe D	10	8.54 \pm	4.36 \pm	5.9 \pm	0.43 \pm	0.67 \pm	0.51 \pm	1.2 \pm
		0.83	0.34	0.42	0.14	0.05	0.04	0.21

^a $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-B; $P < 0.01$ groups; B-D; $P < 0.001$ groups; B-C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^b $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; B-D, C-D; $P < 0.01$ groups; A-C; $P < 0.001$ groups; B-C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^c $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-D; $P < 0.01$ groups; C-D; $P < 0.001$ groups; A-B, B-C, B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^d $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-B, C-D; $P < 0.01$ groups; B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^e $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.01$ groups; B-C; $P < 0.001$ groups; A-B, A-C, A-D, B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^f $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.001$ groups; A-C, A-D, B-C, B-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^g $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A-C; $P < 0.01$ groups; B-D; $P < 0.001$ groups; A-B (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

6.3. Anova multivarié

Analyse ANOVA multi-varié est déterminée lorsqu'on manipule avec plusieurs facteurs (l'un dépendant et d'autres indépendants).

Table 4b. Comparaison multiple des moyennes : « Tukey Contrasts »

	Colon	Heart	Intestine	Kidney	Liver	Lung	Spleen
A – B	0.31509	0.117	0.01071 *	< 0.001 ***	< 0.001 ***	< 0.001 ***	0.03144 *
A – C	0.00178 **	0.001 ***	0.78829	< 0.001 ***	0.93202	0.03184 *	0.36050
A– D	0.75282	0.001 ***	0.98843	< 0.001 ***	0.01802 *	0.94225	0.59818
B - C	0.001 ***	0.001 ***	< 0.001 ***	0.00372 **	< 0.001 ***	0.53108	0.61015
B - D	0.04475 *	0.001 ***	0.00438 **	< 0.001 ***	< 0.001 ***	0.00397 **	0.00116 **
C - D	0.02555 *	0.595	0.92794	0.85043	0.00377 **	0.11137	0.02994 *
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1							

La comparaison multiple a révélé les résultats suivants :

- Une différence hautement significative entre le groupe A et C par rapport les organes (Cœur, Rein et Colon) ;
- Une différence hautement significative ($P < 0.001$) entre le groupe C et D par rapport les organes (Foie et Colon) et ($P < 0.01$) par rapport la Rate.

Table 5a. Nombre Moyen de colonies de *C. albicans* dans les Organes.

		$10^2 \times \text{Log}_{10} \text{UFC/g du tissu} \pm \text{SD}, \text{Log}_{10} \text{UFC}/100\mu\text{l du sang} \pm \text{SD}$							
N° de Rats		Intestin ^a	Colon ^b	Foie ^c	Rate ^d	Rein ^e	Coeur ^e	Poumon ^e	Sang ^f
Groupe A ₁	10	0.47 ± 0.06	0.3 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Groupe C	10	0.9 ± 0.26	0.84 ± 0.12	0.69 ± 0.30	0.47 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02
Groupe D	10	1.23 ± 0.37	1.11 ± 0.41	0.77 ± 0.43	0.47 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.47 ± 0.19	0.47 ± 0.17

^a $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D, C-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^b $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D, C-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^c $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^d $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^e $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^f $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A₁-C, A₁-D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

6.4. Analyse des Principaux Composés (APC)

Les deux premiers principaux composés (PC1 et PC2) des Unités Formant Colonies (UFC) représentaient ensemble 86% de la variance totale de l'ensemble des données.

Table 5b. Valeurs propres de l'analyse (APC)

	Dim.1	Dim.2	Dim.3
Variance	4.579	0.603	0.343
% of var.	76.323	10.046	5.714
Cumulative % of var.	76.323	86.369	92.083

L'analyse (APC) du premier axe a révélé une corrélation positive entre les variables (**Table 5b**).

Le deuxième composé a révélé :

- ✓ La présence d'une corrélation positive par rapport la rate (contribution assez faible) et ;
- ✓ La présence d'une corrélation négative par rapport : Intestin, Colon et le Foie (**Table 5c**).

Table 5c. Axis results of PCA analysis

Variables	Dim.1	Dim.2
Intestine	0.846	-0.360
Colon	0.911	-0.352
Liver	0.833	-0.276
Spleen	0.781	0.437
Kidney	0.000	0.000
Heart	0.000	0.000
Lung	0.836	0.340
Blood	0.873	0.264

Table 5d. Comparaison multiple des moyennes: Tukey Contrasts

	Intestine	Colon	Liver	Spleen	Lung	Blood
A ₁ - C	<0.0001 ***	0.0000016 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.001 ***	<0.001 ***
A ₁ - D	<0.0001 ***	< 0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.001 ***	<0.001 ***
C - D	<0.0001 ***	< 0.0001 ***	0.492	1	0.119	0.104

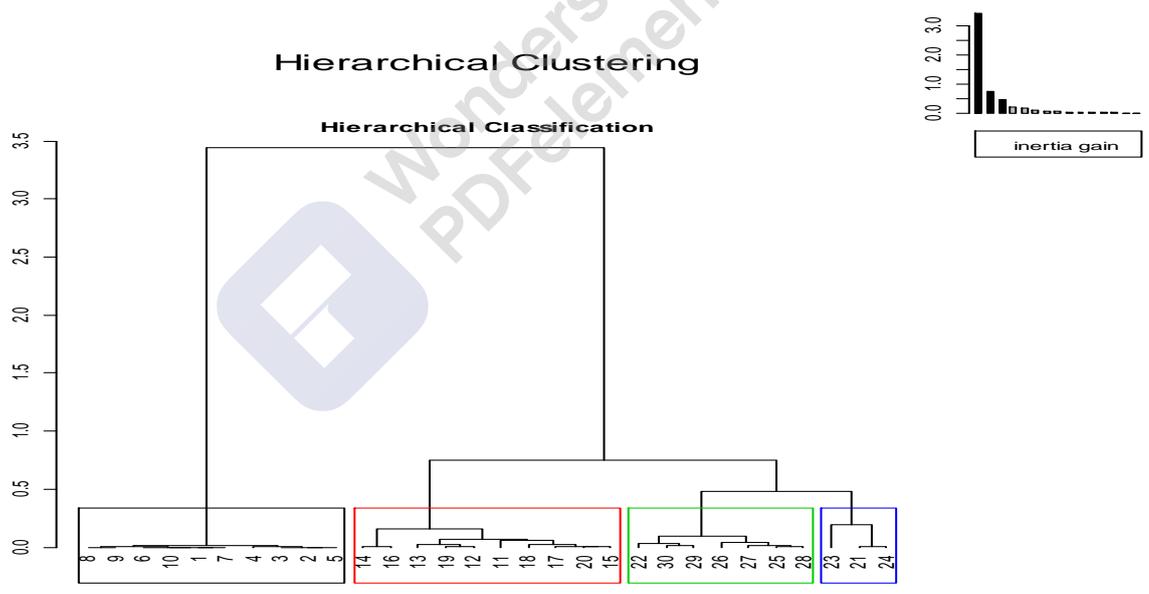
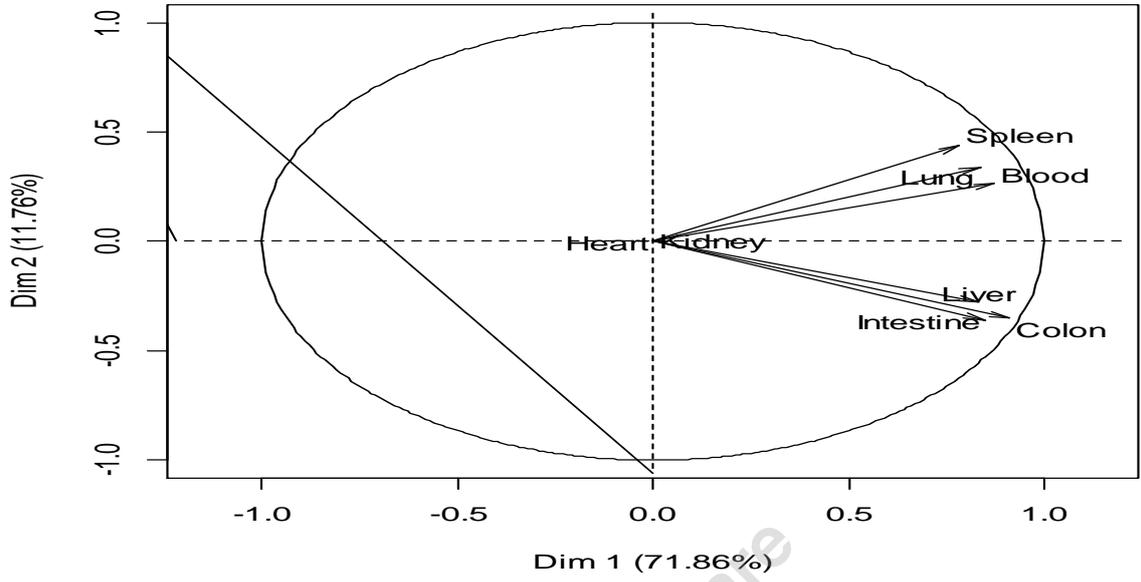


Figure 3: Résultat de la Classification hiérarchique ascendante par la PCA



Research Article

In Vivo Toxicological and Microbiological Activity of *Marrubium vulgare* L. on *Candida albicans* Isolated from Nosocomial Infections

Mahmoud Adel Chabane^{1*}, Aicha Tir Touil¹, Belkacem Khelladi², Boumediene Meddah¹, Meriem Mokhtar³

¹Laboratory of Research, Bioconversion, Microbiological Engineering and Health Safety, Faculty of Natural Sciences and Life, Mascara University-29000, Algeria.

²Laboratory of Histopathology, Public Hospital Establishment (PHE), Mascara-29000, Algeria.

³Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Food and Health (LMBAFS), Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem-27000, Algeria.

Article Info

Article History:

Received: 29 November 2019

Accepted: 20 March 2020

ePublished: 20 September 2020

Keywords:

-Plant

-Yeast

-Toxicological activity

-Antifungal activity

-Curative treatment

Abstract

Background: The objective of this study is to test the toxicology of methanolic extract of *Marrubium vulgare* "MEMV" in rat and its efficiency in the treatment of systemic candidiasis.

Methods: First, forty (40) male rats "Wistar type" are used. Second, they are divided into four groups (10 rats /group) where the toxicological, microbiological and histological studies are applied. Later, the infection with 10^7 cells /ml of *C. albicans* and the curative treatment are applied by the daily administration with a gavage of 800 mg/kg of MEMV. Finally, the toxicology studies indicate that the dose of methanolic extract of *Marrubium vulgare* at 800 mg/kg of body weight is not harmful.

Results: As a final result, the microbiological and histological analysis showed that the treatment with MEMV of rat colonized with 10^7 cells /ml of *C. albicans* limits the multiplication of the yeast in the intestine and colon of the colonized rat. The translocation of *Candida albicans* in liver, spleen and lungs in rat which is treated with 800 mg/kg after inoculation with *C. albicans* is significantly lower than in controls to seven post- infection days. However, we do not detect yeast in the kidneys and hearts of the infected treated groups and the infected untreated ones.

Conclusion: Our results suggest that MEMV limits the gastrointestinal colonization and dissemination of *C.albicans* in the other organs.

Introduction

The knowledge of herbal remedies in traditional cultures has widely contributed to the development of the use of herbal medicines, if we take into account their widespread use and since we have 80% of the world population dependent on these medicines for their health care.^{1,2} Considering these aspects, natural products, particularly higher plant species, continue to be important sources of medicine and supplementary health products. This represents a challenge to science because of various aspects, including their chemical diversity, synergism to biological activity and variable composition.^{1,3} Both the complexity and the chemical diversity with the biological properties of natural products have played an important role in the discovery and development of new compounds. The history of natural products used since ancient times by humans for the relief and cure of diseases has enriched scientific research on new active entities or phytotherapeutic products.¹ All the drugs available for the treatment of fungal infections are not completely effective. That is because they possess a certain degree of toxicity. In addition, mushrooms grow

a quick resistance due to their large-scale use. Although doctors have turned to therapies of combination, the miracle drug to prevent fungal infections and to avoid the resistance has not yet been published.^{4,5} Among the different possible sources of antifungal compounds, plants retain a great interest, because they offer limitless possibilities for the insulation of new antifungal compounds due to their uneven availability of chemical diversity.⁶⁻⁸ *Marrubium vulgare* L. is a perennial herb of the Lamiaceae family which is naturalized in North and South America, the latter and Western Asia. It possesses tonic, aromatic, stimulant, expectorant, diaphoretic and diuretic properties. *Marrubium vulgare* which is known as horehound in Europe, is frequently used in folk medicine⁹⁻¹² to cure a variety of diseases.¹³ In this context, Extensive pharmacological studies have demonstrated that *Marrubium vulgare* displays a suite of activities including antinociceptive,¹⁴ antioxidant,^{12,15} cardioprotective,¹⁶ vasorelaxant,¹⁷ gastroprotective,¹⁸ antispasmodic,¹⁹ immunomodulating,²⁰ antioedematogenic,²¹ analgesic,²²

*Corresponding Author: Mahmoud Adel Chabane, E-mail: adel.chabane@univ-mascara.dz

©2020 The Author(s). This is an open access article and applies the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited.

antidiabetic²³ and antigenotoxic properties.²⁴ Other medicinal effects are reported for *Marrubium vulgare* such as insecticidal and antinociceptive action in several models of pain in mice.²¹ Earlier phytochemical investigations of *M. vulgare* led to the characterization of several flavonoid glycosides and lactates and several labdane diterpenoids with marrubiin as main component and a small amount of an essential oil.²⁵ Recently, a large number of their constituents have been investigated for their biological activity, notably antibacterial and antifungal properties.²⁶⁻³⁰ The demands for more natural antimicrobials have driven scientists to investigate the effectiveness of inhibitory compounds such as extracts from plants that have promising biological activity to control various fungal diseases.^{31,32} This study aims at assessing the toxicological effect of the methanolic extract of *Marrubium vulgare* (MEMV) on the male rats and at evaluating the antifungal activity of the MEMV on male rats rendered experimentally candidiasis.

Materials and Methods

Plant material and preparation of the MEMV

The medicinal plant in this study is "*Marrubium vulgare* L.". The spice is collected between the months of Dec and Jan 2015. The crop is found in Khalouia (35°27'34.76" north, 0°17'37.57" east) in the East of Mascara-Algeria. The voucher specimen was deposited at the herbarium-ENSA and identified by Pr. Benhouhou Salima - Professor at the laboratory of Botany, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Algiers- Algeria. The aerial part (leaves, flowers and stems) of the plant is harvested. Next, it is dried in the shelter of the light and then chopped into powder for later use.

For the extraction of polyphenols, methanolic solutions are employed according to the method described by Boutlelis.³³ 50 g of dried plant rendered powder placed in a glass container, covered with 1000ml of MeOH aqueous 70% (7:3); the mixture is heated to 70°C over 5mn and then the sample is left macerated during one night (24 hours). After a first filtration on filter paper, the filtrate is evaporated under vacuum to dryness using a Rota steam at the temperature of 50°C. At the end, MEMV is sterilized by filtration and stored at 4 ± 1°C.

Identification of polyphenols by HPLC-DAD-ESI-MS

The identification of phenolic compounds was carried out on a Shimadzu system (Prominence i. LC-2030C 3D) equipped with a surveyor UV-Vis photodiode array (PDA) detector, and a LCQ Advantage max ion trap mass spectrometer (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), coupled through an electrospray ionization (ESI) source. The separation was carried out with Ascentis Express C18 column (15 cm X 4.6 mm) id packed with 2.7 µm partially porous particles (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The binary mobile phase consisted of water/acetic acid (solvent A) and methanol/acetic acid (solvent B), in a linear gradient mode: 0-5 min: 2% B, 5-120 min: 2-100% B. The mobile phase flow rate was 0.7 ml/min and the

chromatogram was recorded at λ = 280 nm. Spectral data were collected in the range of 200–800 nm for all peaks. HPLC-ESI-MS/MS data were acquired under positive and negative ionization modes, using the Xcalibur software.³⁴

Candida albicans strain

Identification was carried out according to Api *Candida* system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).³⁵ The strain of *C. albicans* used in this work are isolated in the Hospital "Mascara-Algeria" from the vaginal secretions of a woman with a vulvo-vaginitis infection. The identification is based on the: Test of Blastese or Filamentation on Serum. The *Candida albicans* isolates produced germ tubes when incubated in sterile tubes that contain a fungal suspension of 0.5 ml and 0.5 ml of a serum. The mixture is incubated 3-4 h at 37°C.^{35,36}

From a solid medium SDA + chloramphenicol (Sabouraud Dextrose Agar), a colony is removed with an ensemencer and placed in an erlenmeyer containing 50 ml of medium YEPD liquid. The latter is placed in a water bath shaker at 30°C for 18 hours. The chloramphenicol (0.05 %) is added in the middle YEPD liquid to avoid contamination by bacteria.³⁷ A volume of 3ml of pre-culture is sedimented media by centrifugation at 2000 x g for 10 min at 4°C. The gall is resumed in an equal volume of phosphate buffer (PBS). The cells are thus washed 3 times and resuspended particulates in PBS and then adjusted to optical density = 0.4 corresponds to a concentration of 10⁸ cells / ml; a dilution has been made (1:10) to arrive at a concentration of 10⁷ cells / ml.³⁷

Animal protocol

Our study has been carried out on forty male rats "*Wistar*" whose weight varies from 85 to 120g, distributed into : group A (n=10), group B (n=10), group C (n=10) and group D (n=10). They all present a generation descendant of a race which is not passed by any medical treatment. All experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Mascara University in which the procedures used during these studies were in accordance with the European directive concerning Animal Testing (2010/63/EU).³⁸ These animals are reared within the pet center of the experimental station of the Faculty of Natural Sciences and Life; Mascara University-Algeria. The rats are housed in cages with free access to food and water. They are put under an ambient temperature with a natural cycle of light and of darkness.^{39,40}

Sub-acute toxicity study

Two groups were selected for the toxicological study. Each group is composed of ten male rats (n=10).

Group A "placebo": receiving a cramming orally, 1 ml of a solution of distilled water.⁴¹

Group B "test": taking a cramming orally, a solution of MEMV diluted in 1 ml of distilled water at the rate of 800mg/kg/day for 28 days.⁴² This group represents the phantom in this protocol, from what it deems the acute toxicity of the

In vivo Toxicological and Microbiological Activity of *Marrubium vulgare*

extract administered. After the daily administration of the MEMV orally at a dose of 800 mg/Kg, rats were observed for 28 days to evaluate mortality and the morbidity.

In order to test the antifungal activity of the MEMV, It was interesting to assess the toxicological effect of the MEMV on our animals. Our study is, on one hand, based on the work of Elberry et al,⁴² which has demonstrated that a dose of 500 mg /kg/j does not present mortality on diabetic rats treated by the MEMV. On the other hand, the work done in our laboratory by testing the toxicity of the MEMV on rats wistar with increasing doses of the MEMV up to 500 mg/kg has given identical results to those of Elberry et al.⁴² Group B is represented by ten (10) male rats. They receive a dose of 800 mg/kg of the extract. The animals fasted for 24 hours and the various solutions are administered 1 ml taken orally. The administration is carried out by a cramming using a rigid probe for 28 days during which are noted the variations of body weight, the signs of toxicity potential (behavioral changes in and outside cage. The fall of hair, rashes, lachrymose, digestive manifestations and other, as well as the mortality rate are noted.

Histopathological studies

The rats were weighed and then sacrificed using chloroform. The organs were weighed and then fixed with neutral buffered formalin (10%). The fixed organs were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned to a thickness of 5 μ m. Microscopic observation was performed after staining with hematoxylin and eosin. Light microscopic examination by an anatomopathologist of several tissue sections of each organ of both groups was performed and images representing the typical histological profile were examined.^{43,44}

Anti *Candida albicans* treatment

Three groups of male rats have been constructed to assess the antifungal activity of the MEMV.

Group A “placebo”: receiving a cramming orally, 1 ml of a solution of distilled water.⁴¹

Group C “test + infected”: receiving 200 μ l of an inoculum of 10^7 cells / ml of *Candida albicans* by cramming and then treated with a dose of 800 mg/kg/day by oral route for seven (7) days. The treatment begins 72 hours after the inoculation of the strain of *Candida albicans* and continues seven (7) days.⁴⁵

Group D “infected non-treaty”: receiving 200 μ l of an inoculum of 10^7 cells/ml on day 0 and remaining under the followed within ten (10) post inoculations.

During the period of experimentation, all rats (witness + test) are daily weighed. After eight (8) hours of fasting, the sacrifice is held by the inhalation of chloroform. The blood is taken by a cardiac puncture. An aliquot is recovered a sowing vacuum in the eppendorf tubes sterile for microbiological analysis.

Microbiological analysis

The quantification of the degree of infection and the

determination of the effectiveness of the curative treatment has been carried out by a microbiological analysis by the enumeration of *Candida albicans* in the intestine, colon and internal organs. Samples from the intestines “5 cm” and colons “5 cm” have been sampled and cut into pieces, then hashed with a scalpel, diluted in sterile NaCl at 0.9 % and homogenized with ultra-turrax. The evaluation of the fungal load in the internal organs is made by the broyats of organs (liver, kidney, spleen, heart and lung) as well as in the blood after 10 days of post inoculation. The organs have been removed, cut into pieces, chopped with a scalpel, diluted in NaCl at 0.9 % and homogenized with ultra-turrax. The enumeration of *C. albicans* per gram of tissue has been calculated by serial dilutions that have been prepared with the aim of finding the appropriate concentrations to count the number of colonies by using sabouraud dextrose agar (SDA), and incubated for 48 hours at 37°C. Then the number of CFU /g of organ is determined according to Cem et al.⁴⁶ The blood (100 μ l) is transferred into EDTA tubes and then in boxes petri dishes containing SDA + chloramphenicol (0,05%). After incubation 24-48 h to + 37°C, the number of CFU/100 μ l is determined.³⁷

Statistical analysis

All experiments have been carried out in duplicate. The results are expressed in mean \pm Standard deviation. The data were analyzed using R program 3.4.2. The multivariate analysis of variance (ANOVA) was used. The main groups (4), organs and blood (8), individuals (40 rats) and days were treated as fixed factors. $P < 0.05$ was used to define statistical significance. If a significant difference was determined among these averages, a Student unpaired test was used to determine significant difference between standard group and the one modified by MEMV. A principal component analysis (PCA) was used followed by multiple Comparisons of averages: Tukey Contrasts to assess the variation of CFU in the different organs in relation to the three groups A, C and D.

Results

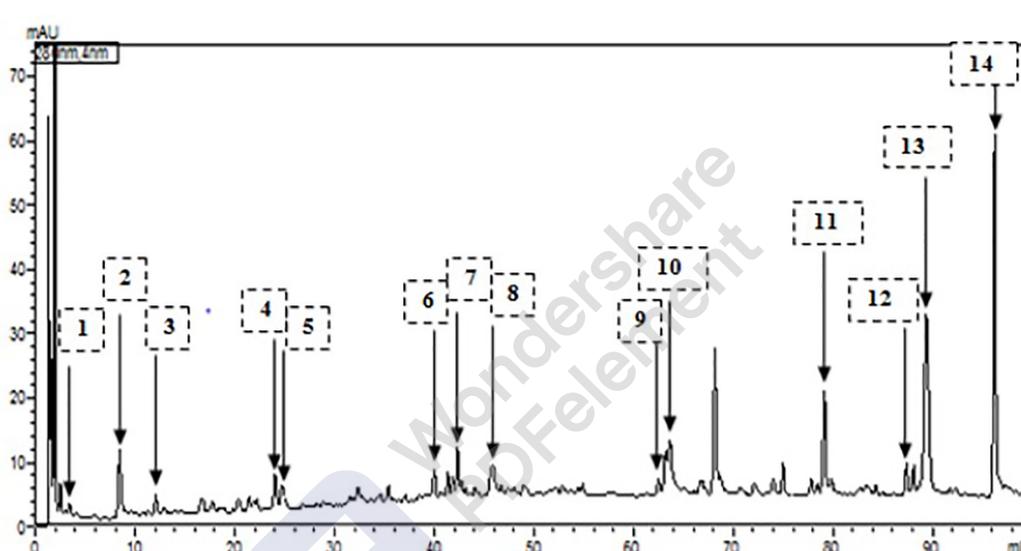
Extraction and determination of phenolic compounds

The extraction of polyphenols by the method of confrontation by organic solvent from the after crushing of the plant “*Marrubium vulgare*” shows that the extract methanol represents an average of 21 per cent \pm 01.98 in relation to the weight of the plant material. Kanyonga et al⁴⁷ have obtained a yield of 39.2 % of the MEMV whereas the groups of Elberry et al⁴² have noted a rate of 12 %. However, there is a difference between the yield obtained with those of the literature, because the efficiency is only relative and depends on the method and the conditions in which the extraction has been carried out on one hand, as well as to the geographical origin of a share and the used part of the plant on the other hand.

The comparison of the retention times of the standards (Table 1) with those recorded in the chromatogram (Figure 1) allows the probable identification of different

Table 1. Retention time of the various standard compounds.

Peak	RT	Lambda max	m/z	Compound
1	3.40	258	137	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
2	8.444	283	193	<i>trans</i> -Ferulic acid
3	12.07	279	197	Syringic acid
4	24.015	323	181	hydrocafféic acid
5	24.730	283	329	Vanillic acid glucoside
6	40.022	272. 335	577	Apigenin 7-O-rutinoside
7	42.326	276. 331	359	Rosmarinic acid
8	45.837	276. 356	609	Rutin
9	63.220	286. 338	267	Apigenin
10	63.629	286. 330	423	Verbascoside
11	79.144	288. 346	579. 285	Luteolin-7-O-glucoside
12	87.404	282. 342	285	Lutéoline
13	89.362	284. 362	741. 285	Kaempferol-3-glucoside
14	96.228	278	359. 197	Syringic acid hexoside

**Figure 1.** Chromatogram of liquid chromatography under high pressure (HPLC-DAD-ESI-MS) of methanolic extract of *Marrubium vulgare* (MEMV).

compounds in the MEMV. The chromatogram of HPLC (Figure 1) of the MEMV can conveniently be divided into three different parts: the first from 3.40 to 24.730 minutes is that in which: *p*-Hydroxybenzoic acid, *trans*-Ferulic acid, Syringic acid, hydrocafféic acid and Vanillic acid Glucoside elute progressively. The second range between 40.022 and 63.629 minutes; in which Apigenin 7-O-rutinoside (40.022 minutes), Rosmarinic acid (42.326 minutes), Rutin (45.837 minutes), Apigenin (63.220 minutes) and Verbascoside (63.629 minutes). The third range is that of Luteolin-7-O-glucoside (79.144 minutes), Luteoline (87.404 minutes), Kaempferol-3-glucoside (89.362 minutes) and Syringic acid hexoside (96.228 minutes). In a study about the extract profile of *Marrubium vulgare* L. by HPLC-PDA-ESI-MS procedures, Tlili *et al*⁴⁸ reported 11 phenolic compounds. Moreover, according to our results, we found also the presence of Vanillic acid glucoside, *trans*-Ferulic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, Syringic acid, Apigenin 7-O-rutinoside, Rosmarinic acid, Verbascoside, Kaempferol-3-glucoside and Syringic acid hexoside. Similar study has been conducted to investigate the

polyphenolic profile of *M. vulgare* in Tunisia. According to Rezgui *et al*,⁴⁹ HPLC analysis showed that the main phenolic compounds found are sinapic acid, quercetin, ferulic acid, *p*-coumaric acid, caff ic acid, apigenin and luteolin present in *M. vulgare*. In the same context, comparing with the current interest, the discrepancy between studies could be attributed to chemotype, climatic and environmental condition, extraction and quantification method plant populations. In a study by Kozyra *et al*,⁵⁰ they have found that the antioxidant activity of methanolic extracts of *Marrubium spp* was low and the total phenolic compounds was considered inferior regarding the origin of the plant. In a study by Ghedadba *et al*,²⁹ the highest concentration of polyphenols has been measured in the methanolic extract. All the content in phenolic extracts from the *Marrubium vulgare* depends on the type of extract and its polarity.⁵¹ The high solubility of phenols in the polar solvents gives the high concentration of these compounds in the extracts obtained. This difference in performance is justified by Connan *et al*,⁵² they have demonstrated that the same plant pushing in heterogeneous ecological conditions

Table 2. Evolution of the weight of the rats during the Sub-acute toxicity study Weight^a of the rats (g) ± SD.

	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Group A	107.01 ± 10.38	142.24 ± 11.38	174.61 ± 12.29	194.28 ± 10.47	223.06 ± 13.74
Group B	104.87 ± 9.55	136.67 ± 13.47	180.67 ± 14.66	227.76 ± 11.88	256.31 ± 11.47

^a $P < 0.05$

accumulates a secondary metabolites with different characteristics. The geographical variations especially the altitude, climatic factors, the nutrient content of the soil as well as the various environmental stresses are the origin of the variations of quantitative and qualitative registered in the various secondary metabolites. These factors influence on the biosynthesis of phenolic compounds of the plant and consequently on the proportion of quantitative and qualitative polyphenols.

Identification of *Candida albicans*

The current methods of clinical laboratory *C. albicans* identification depend on the germ tube (GT) test and the ability of the yeast to utilize sugars. The same result was found by Dealler,⁵³ Ramani et al,⁵⁴ Madhavan et al,⁵⁵ in this context and according to which shows the expected results of the different biochemical reactions visually examined at 37°C, based on the presence or absence of turbidity in the carbohydrate wells. A seven-digit biocode was generated on the basis of these observations by assigning a weighted score to positive reactions. These codes were then compared to those listed in the API 20C Analytical Profile Index which confirms that the strain is *Candida albicans* (7112).⁵⁴

Toxicity study

The toxicity study showed the non-toxic effect of MEMV. Rats treated with 800 mg / kg of *M. vulgare* showed no evidence of drug-induced physical toxicity throughout the study period and no deaths were recorded.

Morphological and histopathological analysis

The morphological and histopathological analysis of the internal organs is a fundamental axis to study the manifestations of diseases. In the course of the experimental period (28 days), the weight of rats (placebo and test) is noted daily at the same time. We have found that the treatment affects significantly the body weight of rats ($P < 0.05$). For the two groups, the weight of the animals has been 223.06 g (group A) and 256.31 g (group B). It is interesting to note that the weight of rats in group B, which receives the MEMV is significantly higher than that of the control which is probably due to the daily exposure of rats to the MEMV characterized as well by an increase of the gain of the body weight (Table 2). In our study, the toxicological study was determined by the administration of the MEMV at 800 mg/kg in rats and their observation for 28 days, has shown no symptoms of toxicity characterized by the two parameters (mortality and morbidity) and based on the external signs such as the decrease of the body weight, change of behavior, the

posture, the erasures, the aspect and the fall of the hairs, the presence of diarrhea, the aggressiveness and rectal temperature.⁵⁶ The internal organs of groups A and B are weighed after the sacrifice. Following the administration of the MEMV at 800 mg/kg, the weight of different organs (intestine, colon, liver, spleen, kidney, heart and lungs) has dramatically increased in relation to groups. The difference is significantly higher, especially at the liver of group B. Our results show that the MEMV tested at a dose of 800 mg/kg has significantly affected ($P < 0.05$) the weight of the different organs (liver, intestine, colon, kidney, spleen, heart and lung). There has been a noteworthy increase at the level of the liver of rats of the group B in relation to group A as well as a slight increase has been detected in the kidneys of the group B which is probably due to the MEMV. The tissues of the intestine and colon have a similar profile of response to the dose after the administration of the MEMV. Our results show that no rat of group B receiving the MEMV at 800 mg/kg is dead. In our study, pathological examination (Figures 2-8) of the organs of male rats treated with MEMV showed no difference compared to untreated groups. The histopathological study revealed no detectable abnormalities and concluded that the MEMV had no adverse effects on the internal organs. Gross macroscopic and microscopic examination of the liver, kidneys, heart, lungs, spleen, intestine and colon shows that the shape, size, cells of the organs of control together and treated rats are not deformed. MEMV did not cause degeneration of organ cells.

Search and enumeration of *C. albicans* in the intestine, colon and its translocation in the internal organs

The weight of the animals inoculated by the strain of *Candida albicans* (group D) has been reduced to 132.40 g compared to the control group: 155.02 g (Table 3). In our work, the intestine and the colon show a notable presence of the opportunistic agent of *C. albicans* among the groups C and D. In group D, the small intestine and the colon show the highest burden of *C. albicans* with a rate of $\log_{10} 1.23$ CFU /g of organ and $\log_{10} 1.11$ CFU / g of organ respectively at 10 days post-infection .When it has detected $\log_{10} 0.90$ and $\log_{10} 0.84$ CFU / g respectively of component for the group C treaty by the MEMV. There is a significant reduction ($P < 0.001$) of the fungal load (Intestine and Colon), in all treated groups compared to the group of infected rats not being treated. In the two groups C and D, according to (Table 4), a significant difference has been reported with a curve of growth disrupting the group C in relation to the group D which is probably due to the suffering of animals following the infection caused by *C. albicans*. It is noteworthy that the infection by *C.*

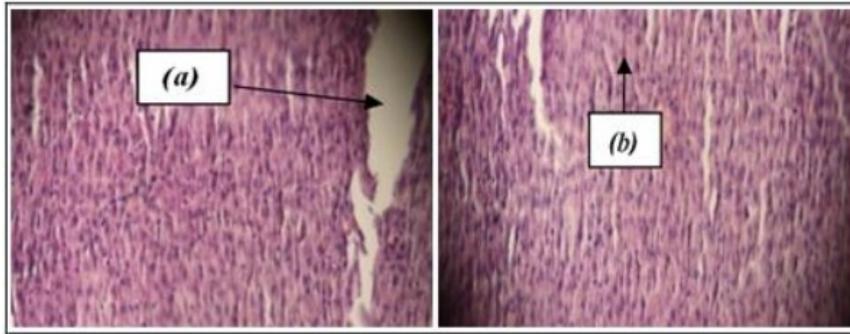


Figure 2. Histological section of Lung tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (sections were stained with H&E, X100). (a): Alveoli, (b): Alveolar epithelium

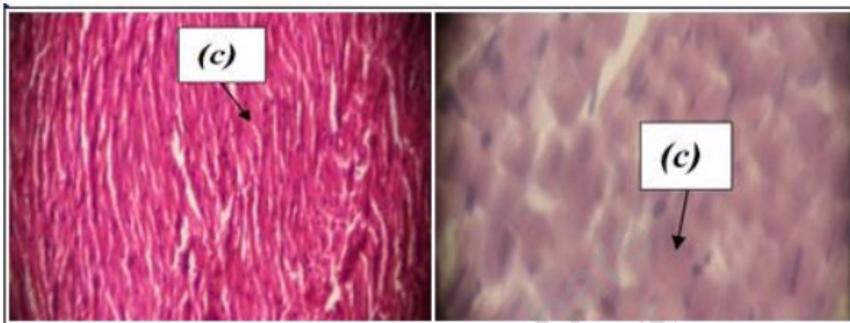


Figure 3. Histological section of Heart tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (sections were stained with H&E, X100). (c): Striated muscles cells

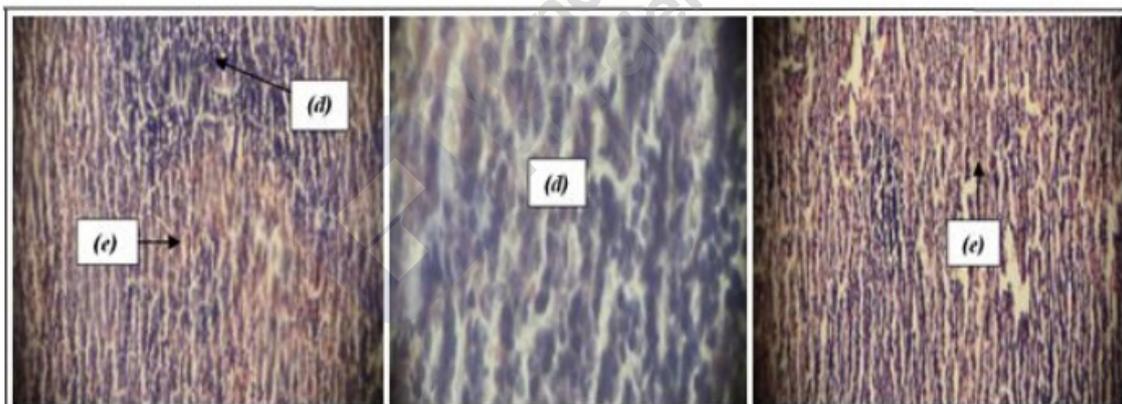


Figure 4. Histological section of Spleen tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (sections were stained with H&E, X100 and X400). (d): Red pulp; (e): White pulp

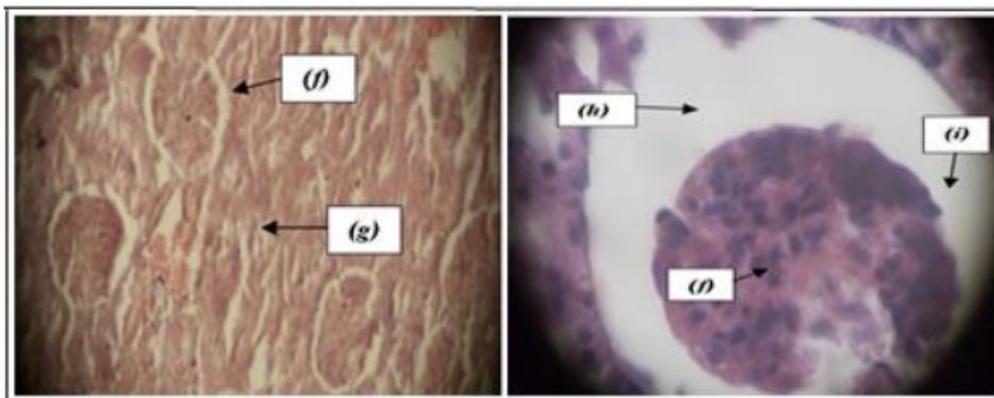


Figure 5. Histological section of Kidney tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (sections were stained with H&E, X100 and X400). (f): Glomeruli; (g): Interstitial tissue; (h): Glomerular filtrate; (i): Bowman's capsule.

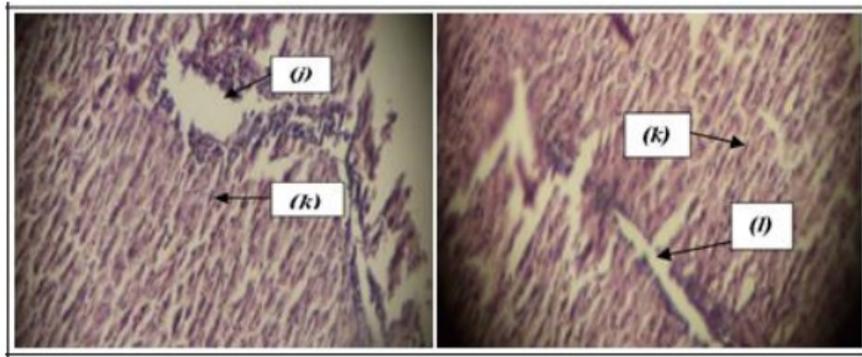


Figure 6. Histological section of Liver tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (Sections were stained with H&E, X100). (j): Central vein ; (k): Centrilobular hepatocytes ; (l): Portal vein

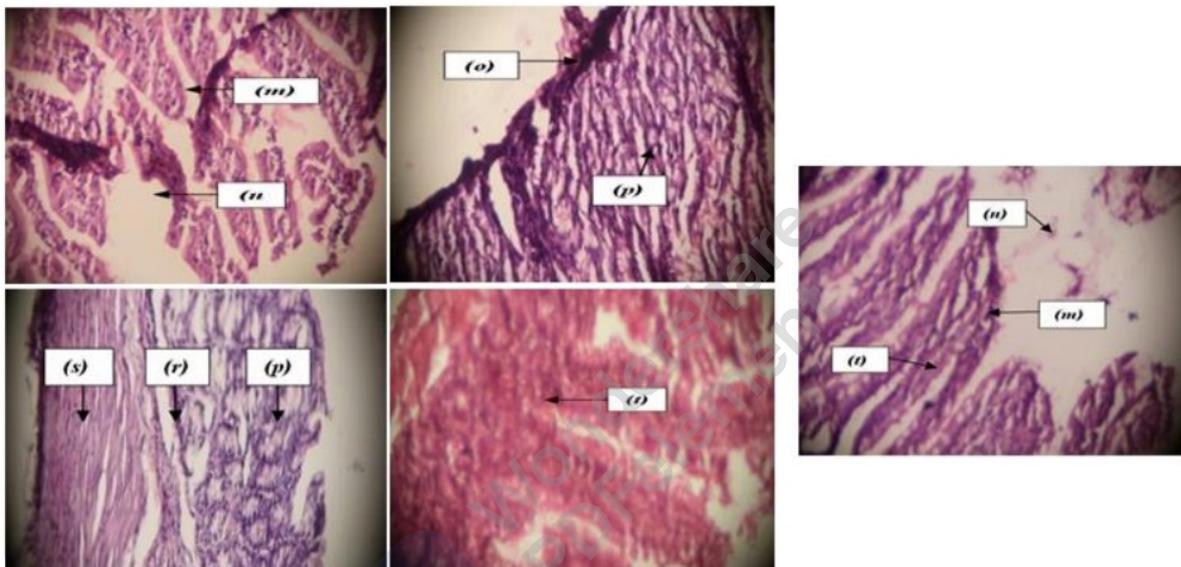


Figure 7. Histological section of Intestine tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (Sections were stained with H&E, X100 and X400). (m): Intestinal villi ; (n): Intestinal lumen ; (o) : Surface epithelium ; (p) : Mucous ; (r) : Submucosa ; (s) : Muscularis mucosae ; (t) : Smooth muscle cells.

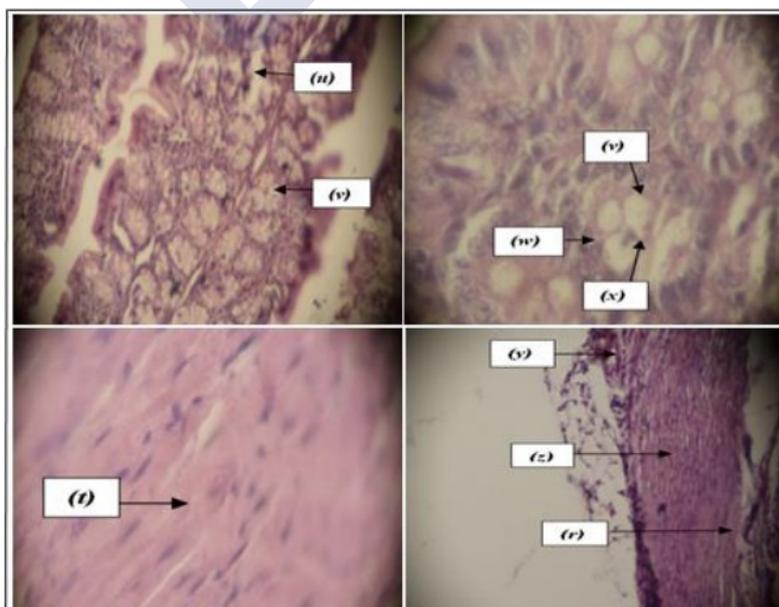


Figure 8. Histological section of Colon tissue of control group male rat, male rat treated with 800 mg/kg body weight dose (Sections were stained with H&E, X100 and X400). (u): Goblet cell; (v): Gland of Lieberkuhn ; (w): Chorion; (x): Lumen of the gland; (y): Serous; (z): Muscularis.

Table 3. Evolution of the weight of the rats during the anti *Candida albicans* treatment Weight^a of the rats (g) ± SD.

Days	Group A	Group C	Group D
1	107.1 ± 11.74	141.72 ± 13.18	129.69 ± 8.35
2	110.74 ± 10.45	140.46 ± 12.99	137.95 ± 9.97
3	114.04 ± 10.29	137.99 ± 13.52	145.47 ± 12.26
4	118.62 ± 13.42	142.24 ± 11.90	122.83 ± 9.79
5	125.52 ± 11.85	149.04 ± 14.52	118.46 ± 21.21
6	137.98 ± 11.74	156.17 ± 14.12	133.48 ± 14.42
7	142.24 ± 9.58	154.09 ± 12.78	131.88 ± 9.65
8	148.79 ± 11.18	145.33 ± 13.56	133.40 ± 14.81
9	150.03 ± 13.37	156.58 ± 15.52	140.33 ± 14.52
10	155.02 ± 13.57	159.05 ± 13.82	132.40 ± 11.54

^a $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; C–D; $P < 0.01$ groups; A–C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

Table 4. Evolution of the weight of the internal organs in rats Weight of the internal organs (g) ± SD.

	No. of rats	Intestine ^a	Colon ^b	Liver ^c	Spleen ^d	Kidney ^e	Heart ^f	Lung ^g
Group A	10	8.70 ± 1.18	3.79 ± 0.88	6.99 ± 0.7	0.5 ± 0.11	0.83 ± 0.11	0.73 ± 0.06	1.16 ± 0.2
Group B	10	10.38 ± 1.63	3.64 ± 0.49	10.5 ± 0.46	0.65 ± 0.17	1.18 ± 0.13	0.79 ± 0.05	1.52 ± 0.16
Group C	10	8.24 ± 0.53	5.14 ± 0.47	7.2 ± 1.13	0.59 ± 0.06	0.63 ± 0.07	0.55 ± 0.06	1.4 ± 0.15
Group D	10	8.54 ± 0.83	4.36 ± 0.34	5.9 ± 0.42	0.43 ± 0.14	0.67 ± 0.05	0.51 ± 0.04	1.2 ± 0.21

^a $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A–B; $P < 0.01$ groups; B–D; $P < 0.001$ groups; B–C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^b $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; B–D, C–D; $P < 0.01$ groups; A–C; $P < 0.001$ groups; B–C (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^c $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A–D; $P < 0.01$ groups; C–D; $P < 0.001$ groups; A–B, B–C, B–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^d $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A–B, C–D; $P < 0.01$ groups; B–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^e $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.01$ groups; B–C; $P < 0.001$ groups; A–B, A–C, A–D, B–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^f $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D, B–C, B–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^g $P < 0.05$ (ANOVA); $P < 0.05$ groups; A–C; $P < 0.01$ groups; B–D; $P < 0.001$ groups; A–B (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

Table 5. *C. albicans* mean colony counts log₁₀CFU/g of tissue ± SD, log₁₀CFU/100µl of blood ± SD

	No. of rats	Intestine ^a	Colon ^b	Liver ^c	Spleen ^d	Kidney	Heart	Lung ^e	Blood ^f
Group A	10	0.47 ± 0.06	0.3 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Group C	10	0.9 ± 0.26	0.84 ± 0.12	0.69 ± 0.30	0.47 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02
Group D	10	1.23 ± 0.37	1.11 ± 0.41	0.77 ± 0.43	0.47 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.47 ± 0.19	0.47 ± 0.17

^a $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D, C–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

^b $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D, C–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

^c $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^d $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^e $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts). ^f $P < 0.05$ Principal Component Analysis (PCA); $P < 0.001$ groups; A–C, A–D (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts).

albicans significantly affects the body weight of rats.

The effectiveness of the extract has been observed in the lung tissue, but there has been no significant difference ($P = 0.119$) of the fungal load between the groups C and D. This is probably due to the variability in the response of the immune system innate to the infection in the lung tissue.⁵⁷ In the same idea, there is no similarity in the bodies of the spleen. This observation has been reported and can be explained by the difference in the exposure of tissues to the MEMV following the therapeutic doses. The liver, the lung and the spleen of group A are less contaminated by *C. albicans* compared to groups C and D after the post inoculation period. On the contrary, homogenates of kidneys and the heart remained sterile (Table 5). *C. albicans* was detected also in the blood of the group C and D ($\log_{10}0.3$ and $\log_{10}0.47$ CFU / 100 µl respectively).

Discussion

In order to contribute to the highlighting efficiency of

extracts of *Marrubium vulgare* as an antifungal treatment, we have demonstrated their toxic effects. Our work is therefore devoted to the *in vivo* study which aims at determining the toxicological effect of the methanol extract of *Marrubium vulgare* in rats Wistar, and subsequently allow or not the recommendation for clinical trials in the treatment of infections of fungal origins. In a study by Jaouhari et al, had conducted an acute toxicity of the aqueous extract of *Marrubium vulgare* on albino swiss mice. The preparation tested has been an infusion of 1 g prepared and dried in 50 ml of distilled water. The mice treated with the extract have shown a loss of appetite 03 hours after the ingestion of the infusion but no histopathological changes have been observed.⁵⁸ In a study of female rats of acute oral toxicity with a single dose of 2000 mg/kg of extract of *Marrubium vulgare* for a period of 14 days,¹⁸ no change has been detected on the skin, eyes, mucous membranes and the nervous system. The data suggests that the toxic dose of the methanol extract of *Marrubium vulgare* is greater than

2000 mg/kg. It would be classified in category 05 of the toxicity according to the criteria of the HMP.58

Our work presents the first study *in vivo* on the anti *Candida albicans* treatment of *Marrubium vulgare* with an assessment of its toxicity. We have only worked with male rats by eliminating the females because they have a physiological and hormonal disturbance that can disrupt our results. The oral efficacy *in vivo* of the MEMV has been tested against a strain of *C. albicans*. Consequently, the main variable that would affect the antifungal activity of the extract would be the activity of the extract itself and its therapeutic levels at the target site. Toxicity studies are conducted to characterize the potential toxic effects the drug can produce. In this study we conducted sub-chronic toxicity study to evaluate the safety of MEMV in rat. The literature on the toxic effects of *M. vulgare* is scarce. Clinical pathology is a key tool in detection and interpretation of toxicological studies.⁵⁹

In a study by Abdussalam et al,⁶⁰ the physical signs of toxicity observed within the first four hours of ethanol leaf extract of *Marrubium vulgare* administration are restlessness, hyperventilation and later reduced physical activity. They have implied that the extract is slightly toxic to the mice. The current study showed that the rats administered with MEMV exhibited no intoxication symptoms. It revealed no microscopic alterations in the organs (lungs, kidneys, heart, spleen and liver), since the kidneys are the main organs in the body susceptible to the toxic effects of drugs.⁶¹ Our result is in agreement with findings of Elberry et al,⁴² who detected that the MEMV has a role of a protector. This effect may be attributed on one hand, to the antioxidant activities of these extracts and according to Youcefi et al⁶² in addition to marrubiin, some compounds isolated from the aerial parts of *M. vulgare* such as glycosidic phenylpropanoid esters have been an anti-inflammatory potential and cardioprotective roles in cardiovascular diseases on the other hand.

Body weight gains were recorded in the group of rat treated at the end of the study period. This is in disagreement with Chakir et al⁶³ who indicated that STZ-induced diabetic rats treated with MEMV showed an increase in body weight as compared to diabetic control rats. At a dose of 800 mg/kg, the histology doesn't show disorganization of the hepatic parenchyma, necrosis, hyperemia, and proximity of the centrilobular vein. In addition, the kidney doesn't present enlargement and cellular hypertrophy of convoluted tubules. The lungs were unaffected. There were no macroscopic observations related with the treatment. No gross abnormalities were attributed to the remedial treatment with the MEMV for sub-acute toxicities.

Invasive Candidiasis has been established in rats by using a single dose and high of the fungus (10^7 cells / animal). The infection has been established and translated and recovered from homogenized organs. Siems and Allen⁶⁴ have recommended that the limit point in a model of disease (chronic infection by systemic *Candida albicans*) is defined as the point at which the animals lose more

than 20 % of their weight or when their body temperature drop to more than 4 °C. As an opportunistic pathogen, in some situations, usually related to the immune system, *C. albicans* causes infection limited to the mucosa or in serious cases: the systemic infections death.⁶⁵ Several mechanisms of virulence are known to contribute to the ability of this fungus to colonize and invade the cells, the expression of the molecules of recognition of the host or of adhesion molecules, the secretion of hydrolytic enzymes such as lipases, phospholipases and aspartyl proteases.⁶⁶ In this present work and subsequently to the infection, the experimental rats have shown a significant difference ($P < 0.001$) to their gastro-intestinal colonization by *C. albicans* where the treatment by the MEMV has significantly reduced the burden of fungal tissue of "intestine and colon" of the group C compared with those of the rats of the group D "infected non-treaty" ($P < 0.001$). The translocation in the internal organs such as in the liver and the lung has been considerably reduced after the treatment but not with significant difference ($P = 0.492$ and $P = 0.119$) respectively. In this point of view, these natural substances, which inhibit biofilm formation, may be potentially useful for the treatment of biofilm related *Candida* infections. In a study by Zida et al,⁶⁷ they have found that natural substances may act by depolarization or formation of pores in the fungal bilayer membrane; display inhibitory effect on the *C. albicans* yeast-hyphal transition, inhibit biofilm formation and decrease preformed biofilms. Their results indicated that seeds of plants exert its antifungal activity not only through the damage of plasma membrane but also with mitochondrial dysfunction. The powerful antimicrobial agent of *Marrubium vulgare* is essentially due to these active substances such as essential oils, flavonoids and the tannins. In our rat model, we found that MEMV was effective in reducing tissue titers of *C. albicans* because this extract works via different mechanisms than the others antifungal agents. In fact, the antifungal activity of the *Marrubium vulgare* extract is apparently related to their high phenolic content on one hand and to the alteration of efflux pump activity by certain plant constituents on the other hand.⁶⁸

Our study contributes to enrich the literature data on polyphenolic profile and biological properties of *Marrubium vulgare* extract. Several studies reported the presence of phenolic compounds and flavonoids in *Marrubium vulgare* extract. Their amount can vary depending on extraction methods, indeed, the methanolic extracts seem to be richer than the extracts obtained by other solvents.⁶⁹ In the same context, strong activity has been observed with methanol extracts of *Marrubium vulgare*.⁶⁸ In other studies, the antimicrobial activity is determined on raw extracts: methanol, acetone, ethanol, and the water. According to them, the antifungal activity of extracts from plants is due to the different chemical substances present in these extracts. As well, the optimal effectiveness of an extract will be obtained by the combined action (synergy) of different compounds of this extract.²⁵

The difference on the number of *Candida albicans* in internal organs between the Group C and D is justified by the mode of action of *MEMV* on the fungal strain as it explains by Bouterfas et al.²⁸ Our results are in agreement with those found by Kanyonga et al.⁴⁷ who demonstrated the anti-inflammatory, antinociceptive and antimicrobial potential of *MEMV*. Ajedi et al.⁷⁰ have reported that the treatment with *M. vulgare* extract at a dose of 500 mg/kg as cure agent in BALB/C mice infected with *Salmonella typhimurium* showed no significant effect on the relative number of CD8+CD62L+ but treatment with same dose of *M. vulgare* extract as protective agent revealed significant increase on the relative number of T cytotoxic cells expressing CD62L. From a pharmaceutical point of view and according to Tlili et al.,⁴⁸ it is advantageous when antimicrobial drugs display selective toxicity to the microbe and are non toxic to eukaryotic cells. It is interesting to note that *C. albicans* is an opportunistic agent, a normal commensurable digestive tube, in conditions favorable to its growth. It may exercise the mechanisms of serious virulence. As a proposition: another study should be necessary to assess the synergetic interactions between *MEMV* and the other antifungal metabolites such as plant extracts, fluconazole or amphotericin B.

Conclusion

In conclusion, the main purpose of this study has been to assess the toxicological effect of the *MEMV* on male rats wistar and to assess the antifungal activity (curative treatment) of the *MEMV* in male rats rendered experimentally candidiasis. In our study, the oral administration of the *MEMV* at 800 mg/kg in rats for 28 days does not misled at some symptoms of toxicity characterized by two parameters: mortality and morbidity. It can be concluded that *MEMV* does not produce histopathological changes in the internal organs. The effectiveness of oral *MEMV* is challenged against the strain of *C. albicans* (at a dose of 10⁷ cells/animal). Consequently, the main variable that would affect the antifungal activity of the extract would be the activity of the extract itself and its therapeutic levels at the target site. The reduction of the translocation of *C. albicans* by the curative treatment of the *MEMV* suggests a therapeutic benefit against the spread of the candidiasis.

From these results, it is clear that the employment of the *MEMV* could be recommended at a dose of 800 mg/kg for clinical trials and opens a new avenue of approach to the use of natural bioactive substances to antifungal treatments.

Ethical Issues

This study protocol was approved by the Local Ethical Comity of the University, based on adequately performed laboratory and animal experimentation according to the Helsinki Declaration (1964).

Acknowledgments

We thank the leaders of the Ministry of Higher Education and Scientific Research; the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria. We wish to thank deeply: Pr. Salima Benhouhou (s.benhouhou@ensa.dz) (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie ENSA, Algiers, Algeria), for the plant identification and Dr. Ahmed Megharbi (amegharbi@usthb.dz) (University Ahmed Zabana of Relizane, Algeria), for the Statistical analysis. We also want to pay tribute to Mr. Ahmed Fidouh (fidouhahmed@hotmail.fr), independent consultant & trainer for his linguistic contribution.

Conflict of Interests

The authors claim that there is no conflict of interest.

References

1. Meyre-Silva C, Cechinel-Filho V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus marrubium. *Curr Pharm Des.* 2010;16(31):3503-18. doi:10.2174/138161210793563392
2. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 2006;27(1):1-93. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008
3. Fatima Ad, Modolo LV, Conejero Sanches AC, Porto RR. Wound healing agents: The role of natural and non-natural products in drug development. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8(9):879-88. doi:10.2174/138955708785132738
4. Espinel-Ingroff A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: A review of the literature (2005-2009). *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(1):15-22. doi: 10.1016/S1130-1406(09)70004-X
5. Gupta AK, Kohli Y. Evaluation of in vitro resistance in patients with onychomycosis who fail antifungal therapy. *Dermatology.* 2003;207(4):375-80. doi:10.1159/000074118
6. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(3):290-302. doi:10.1016/j.jep.2006.04.003
7. Kakorin PA, Mikhalkhik EV, Ramenskaya GV, Demura T, Kukes VG. Dermotropic activity of aqueous extract from *Caragana jubata* (pall.) poir. Shoots of orally administration in a model of contact dermatitis in rats. *Russian J Biopharm.* 2018;10:57-63. doi:10.18097/pbmc20186403241
8. Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, Apers S, Vingerhoets R, Cos P, et al. Screening of some tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(1):58-66. doi:10.1016/j.jep.2008.05.033
9. Berrougui H, Isabelle M, Cherki M, Khalil A. *Marrubium vulgare* extract inhibits human-I δ l oxidation and enhances hdl-mediated cholesterol efflux in thp-1 macrophage. *Life sci.* 2006;80(2):105-12.

- doi:10.1016/j.lfs.2006.08.040
10. Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaria L, Garcia-Hernandez B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. Clinical trial of cecropia obtusifolia and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*. 2004;11(7-8):561-6. doi:10.1016/j.phymed.2004.01.006
 11. Nawwar MA, El-Mousallamy AM, Barakat HH, Buddrus J, Linscheid M. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*. 1989;28(11):3201-6. doi:10.1016/0031-9422(89)80307-3
 12. Weel KG, Venskutonis PR, Pukalskas A, Gruzdiene D, Linssen JP. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L.) grown in lithuania. *Lipid Fett*. 1999;101(10):395-400. doi:10.1002/(SICI)1521-4133(199910)101:10<395::AID-LIPI395>3.0.CO;2-L
 13. Meyre-Silva C, Yunes R, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (lamiaceae). *Farmacologia*. 2005;60(4):321-6. doi:10.1016/j.farmac.2005.01.003
 14. De Jesus R, Cechinel-Filho V, Oliveira A, Schlemper V. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*. 2000;7(2):111-5. doi:10.1016/S0944-7113(00)80082-3
 15. Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, de Waard P, van Beek TA. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in lithuania. *Food Chem*. 2012;130(3):695-701. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.112
 16. Yousefi K, Soraya H, Fathiazad F, Khorrami A, Hamedeyazdan S, Maleki-Dizaji N, et al. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Marrubium vulgare* L. On isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Indian J Exp Bio*. 2013; 51(8):653-60.
 17. El Bardai S, Morel N, Wibo M, Fabre N, Llabres G, Lyoussi B, et al. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *marrubium vulgare*. *Planta Med*. 2003;69(01):75-7. doi:10.1055/s-2003-37042
 18. Paula de Oliveira A, Santin JR, Lemos M, Klein Júnior LC, Couto AG, Meyre da Silva Bittencourt C, et al. Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L. (lamiaceae). *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(9):1230-7. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01321.x
 19. Schlemper V, Ribas A, Nicolau M, Cechinel Filho V. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*. 1996;3(2):211-6. doi:10.1016/S0944-7113(96)80038-9
 20. Daoudi A, Benboubker H, Bousta D, Aarab L. Screening of fourteen, moroccan medicinal plants for immunomodulating activities. *Moroccan J Biol*. 2008;1:24-30.
 21. Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, Cechinel-Filho V, Schlemper V. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol*. 2006;108(3):379-84. doi:10.1016/j.jep.2006.05.023
 22. De Souza M, De Jesus R, Cechinel-Filho V, Schlemper V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*. 1998;5(2):103-7. doi:10.1016/S0944-7113(98)80005-6
 23. Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild algerian *Marrubium vulgare* L. Infusion. *Fitoterapia*. 2012;83(2):286-92. doi:10.1016/j.fitote.2011.11.005
 24. Popoola OK, Elbagory AM, Ameer F, Hussein AA. Marrubiin. *Molecules*. 2013;18(8):9049-60. doi:10.3390/molecules18089049
 25. Sahpaz S, Hennebelle T, Bailleul F. Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Nat Prod Lett*. 2002;16(3):195-9. doi:10.1080/10575630290013576
 26. Ameziane N, Boubaker H, Boudyach H, Msanda F, Jilal A, Ait Benaoumar A. Antifungal activity of moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agron Sustain Dev*. 2007;27(3):273-7. doi:10.1051/agro:2007022
 27. Asadi-Samani M, Kafash-Farkhad N, Azimi N, Fasihi A, Alinia-Ahandani E, Rafeian-Kopaei M. Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5(2):146-57. doi:10.1016/S2221-1691(15)30159-3
 28. Bouterfas K, Mehdadi Z, Aouad L, Elaoufi MM, Khaled MB, Latreche A, et al. La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *marrubium vulgare* vis-à-vis de *aspergillus niger* et *Candida albicans*? *J Mycol Med*. 2016;26(3):201-11. doi:10.1016/j.mycmed.2016.02.019
 29. Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*. 2014;12(1):15-24. doi:10.1007/s10298-014-0832-z
 30. Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, Ben Mansour R, Bekir A, Mejdoub H, et al. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. Essential oil grown in tunisia. *Lipids Health Dis*. 2011;10(1):161. doi:10.1186/1476-511X-10-161
 31. Jeremiah C, Katsayal UA, Nuhu A, Anafi SB, Ibrahim MA, Nuhu HD. Phytochemical screening and anti-inflammatory studies of *tapinanthus globiferus* (a. Rich) teigh. Leaves three extracts. *Pharm Sci*. 2019;25(2):124-31. doi:10.15171/PS.2019.19
 32. Makhatova B, Datkhayev U, Makhatov ZB, Orazbekov Y. Antibacterial activity of *verbascum songaricum* various extracts against *staphylococcus*. *New Armenian Med J*. 2017;11(4):67-9.
 33. Boutlelis DA, Bordjiba O. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du marrube blanc *oumarrubium vulgare* L. [ressource textuelle, sauf manuscrits]. 2014.

34. Mokhtar M, Soukup J, Donato P, Cacciola F, Dugo P, Riazi A, et al. Determination of the polyphenolic content of a capsicum annum l. Extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity. *J Sep Sci.* 2015;38(2):171-8. doi:10.1002/jssc.201400993
35. Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of candida albicans-closely related yeasts, candida africana and candida dubliniensis, in vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol.* 2014;52(6):636-40. doi:10.1093/mmy/myu003
36. Mackenzie D. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol.* 1962;15(6):563-5. doi:10.1136/jcp.15.6.563
37. Noumi E, Snoussi M, El Ghouli S, Rouabhia M, Bakhrouf A. Effect of glucose supplementation on *Candida albicans* virulence in immunosuppressed swiss albino mice (mus musculus). *Afr J Microbiol Res.* 2011;17:2479-87. doi:10.5897/AJMR10.585
38. Combrisson H. La directive 2010/63/ue: L'explicite et l'implicite. *Bull Acad Vet Fr.* 2014. doi:10.4267/2042/53809
39. Organization WH. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines: Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific. 1993.
40. Waynforth D, Brain P, Sharpe M, Stewart M, Applebee M, Darke D. Good practice guidelines. Administration of substances (rat, mouse, guinea pig, rabbit). Association, LAS (Ed) 1998(1):4.
41. Alwashli A, Al Sobarry M, Cherrah Y, Alaoui K. Toxicité aiguë et activité analgésique de l'extrait méthanolique de *Rumex nervosus* vahl. *Phytothérapie.* 2012;10(5):293-7. doi:10.1007/s10298-012-0727-9
42. Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Gabr SA, Nagy AA, Abdel-Sattar E. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Inter J Diabetes Mellit.* 2015;3(1):37-44. doi:10.1016/j.ijdm.2011.01.004
43. Elshama SS, El-Kenawy AE-M, Osman H-EH. Curcumin improves atorvastatin-induced myotoxicity in rats: Histopathological and biochemical evidence. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016;29(4):742-52. doi:10.1177/0394632016656186
44. Gebremickael A. Acute and sub-chronic oral toxicity evaluation of *Eucalyptus globulus* essential oil-water emulsion in mice. *J Cytol Histol.* 2017;8(459):2. doi:10.4172/2157-7099.1000459
45. Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(2):106-11. doi :10.1111/j.1399-302X.2004.00202.x
46. Algin C, Sahin A, Kiraz N, Sahintürk V, Ihtiyar E. Effectiveness of bombesin and *Saccharomyces boulardii* against the translocation of candida albicans in the digestive tract in immunosuppressed rats. *Surg Today.* 2005;35(10):869-73. doi: 10.1007/s00595-005-3049-9
47. Kanyonga P, Faouzi M, Meddah B, Mpona M, Essassi E, Cherrah Y. Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *J Chem Pharm Res.* 2011;3(1):199-204.
48. Tlili H, Marino A, Ginestra G, Cacciola F, Mondello L, Miceli N, et al. Polyphenolic profile, antibacterial activity and brine shrimp toxicity of leaf extracts from six tunisian spontaneous species. *Nat Prod Res.* 2019:1-7. doi:10.1080/14786419.2019.1616725
49. Rezgui M, Majdoub N, Mabrouk B, Baldisserotto A, Bino A, Kaab LBB, et al. Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. Against pathogenic dermatophyte strains. *J Mycol Med.* 2020:100927. doi:10.1016/j.mycmed.2020.100927
50. Kozyra M, Korga A, Ostrowska M, Humeniuk E, Adamczuk G, Gieroba R, et al. Cytotoxic activity of methanolic fractions of different *Marrubium* spp. Against melanoma cells is independent of antioxidant activity and total phenolic content. *FEBS Open Bio.* 2020;10(1):86-95. doi:10.1002/2211-5463.12755
51. Doostan F, Abbasi MM, Khordadmehr M, Fallah F, Behrouzy A. Effects of pomegranate seed and peel methanolic extracts on methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Sci.* 2019;25(2):111-7. doi:10.15171/PS.2019.17
52. Connan S, Deslandes E, Gall EA. Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2007;349(2):359-69. doi:10.1016/j.jembe.2007.05.028
53. Dealler SF. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1991;29(5):1081-2.
54. Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of api 20c and id 32c systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3396-8.
55. Madhavan P, Jamal F, Chong PP. Laboratory isolation and identification of *Candida* species. *J Appl Sci.* 2011;11:2870-7. doi:10.3923/jas.2011.2870.2877
56. Zohra BAF, Merzouk H, Bouanane S, Benkalfat NB, Merzouk SA, Mulengi JK, et al., editors. Évaluation de la toxicité aiguë de la 2-hydroxy-méthyl-1 (n-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat wistar. *Ann Toxicol Anal.* 2010: EDP Sciences. doi:10.1051/ata/2010017
57. Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Hrnčirova K, Pospisilova S, Mayer J, et al. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time pcr compared with galactomannan and (1, 3)- β -d-glucan detection. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):602-8. doi:10.1128/JCM.05356-11
58. Niedenthal T, Mayer JG. Der weisse andorn ist zur lungesucht gar gut. *Z Phytother.* 2017;38(06):253-7.

- doi:10.1055/s-0043-122334
59. Renne RA, Sumner W, Harkema JR, Davis C, AG BSP. Draft oecd guidance document on histopathology for inhalation toxicity studies, supporting tg 412 (subacute inhalation toxicity: 28-day) and tg 413 (subchronic inhalation toxicity: 90-day).
60. Abdussalam U, Aliyu M, Maje I. In vivo antiplasmodial activity of ethanol leaf extract of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) in Plasmodium Berghei-Berghei Infected Mice Trop J Nat Prod Res. 2018;2(3):132-5. doi:10.26538/tjnpr/v2i3.6
61. Alferah MA. Toxicity induced histological changes in selected organs of male (wistar) rats by lawsonia inermis leaf extract. European J Med Plants. 2012;151-8. doi:10.9734/EJMP/2012/1061
62. Yousefi K, Fathiazad F, Soraya H, Rameshrad M, Maleki-Dizaji N, Garjani A. *Marrubium vulgare* L. Methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. BioImpacts. 2014;4(1):21. doi:10.5681/bi.2014.001
63. Chakir ARS, Elbadaoui K, Alaoui TI. Antidiabetic activities of methanolic extracts of *Marrubium vulgare* leaves in rats. Int J Pharm Phytopharmacol Res. 2015;4(5):258-63.
64. Siems J, Allen S, editors. Early euthanasia as an alternative to death in chronic infectious disease studies using a systemic *Candida albicans* model. Abstr 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology; 1989.
65. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001;9(7):327-35. doi:10.1016/S0966-842X(01)02094-7
66. Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. Functional and structural diversity in the als protein family of *Candida albicans*. J Bio Chem. 2004;279(29):30480-9. doi:10.1074/jbc.M401929200
67. Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé R. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. J Mycol Med. 2017;27(1):1-19. doi:10.1016/j.mycmed.2016.10.002
68. Ait-Sidi-Brahim M, Markouk M, Larhsini M. Moroccan medicinal plants as antiinfective and antioxidant agents. New Look Phytomed. 2019. p. 91-142. doi:10.1016/B978-0-12-814619-4.00005-7
69. Yahiaoui F, Zaouani M, Kardjadj M, Laghouati A, Kadour R, Bouzid N, et al. Antibacterial, antioxidant and wound healing activities of *Marrubium vulgare* and *Cytisus triflorus* extracts native to algeria. Phytotherapie. 2018;16(S1):S32-S9. doi:10.3166/phyto-2018-0015
70. Ajedi AS, Widodo N, Widyarti S, Rifa'i M. Immunomodulatory effect of moringa oleifera and *Marrubium vulgare* leaf aqueous extracts in balb/c mice infected with *Salmonella typhimurium*. Drug Invent Today. 2019;12(4):690-700.

تمثل النباتات الطبية مصدرًا كبيرًا للمواد النشطة بيولوجيًا ضد العديد من الأمراض والتي لم يتم استخدامها كثيرًا حتى الآن. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم السمية والتأثيرات المضادة للفطريات للمستخلصات الميثانولية من نبتة المريوة *Marrubium vulgare* على ذكور الجرذان المصابة بداء الكونديديوز تجريبيًا. أظهر التحليل الكمي والنوعي الكيميائي النباتي للمستخلص الميثانولي بواسطة HPLC-DAD-ESI-MS وجود العديد من المركبات الفينولية. أشارت دراسة السموم والتحليل النسيجي إلى أن جرعة المستخلص الميثانولي من نبتة المريوة *Marrubium vulgare* بتركيز 800 مغ / كغ من وزن الجسم لم تكن ضارة ولم تظهر أي أعراض ضرر على أنسجة الأعضاء. أظهر التحليل الميكروبيولوجي أن الفئران الملقحة ب 10^7 مل من كونديدا أليكانس *C. albicans* وعولجت بالمستخلص الميثانولي لنبتة المريوة حدثت من تكاثر هذا الميكروب في الأمعاء والقولون للفئران المستعمرة ($P < 0.05$). كان انتقال الفطريات في الكبد والطحال ورتتي الفئران المعالجة بـ 800 مغ / كغ أقل من الفئران غير المعالجة بعد 7 أيام من الإصابة ($p < 0.05$). إلا أن كل من الكلى والقلب للمجموعات المصابة المعالجة والمصابة دون علاج لم تكن مستعمرة بهذه الجرثومة. وفقًا لهذه النتائج الأولية، قلل المستخلص الميثانولي من نبتة المريوة *Marrubium vulgare* بشكل كبير من استعمار الفطريات للجهاز الهضمي وانتقالها إلى الأعضاء الداخلية.

الكلمات المفتاحية: المريوة – كونديدا أليكانس- النشاط السمي – النشاط المضاد للفطريات- الإنتشار- الأعضاء الداخلية- الأمعاء.

Résumé

Les plantes médicinales représentent une source considérable de substances bioactives contre nombreuses pathologies et qui sont peu exploitables à ce jour. Cette étude vise à évaluer la toxicité ainsi que les effets antifongiques des extraits alcoolique (méthanol) de *Marrubium vulgare* (EMMV) sur des rats mâles rendus expérimentalement candidosiques. L'analyse phytochimique quantitative et qualitative de l'extrait par HPLC-DAD-ESI-MS, a montré la présence de plusieurs composés phénoliques. L'étude toxicologique et l'analyse histologique ont indiqué que la dose de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* à 800 mg / kg de poids corporel n'était pas néfaste et ne présentait aucune altération tissulaire des organes. L'analyse microbiologique a montré que les rats inoculés par 10^7 ufc/ml de *C.albicans* et traités avec l'EMMV limitent la multiplication de cet agent pathogène dans l'intestin et le côlon des rats colonisés ($p < 0.05$). La translocation de *Candida albicans* dans le foie, la rate et les poumons des rats traités avec 800 mg / kg après l'inoculation avec *C. albicans* était plus faible que chez les témoins à sept jours post-infection ($p < 0.05$). Cependant, les reins et les cœurs des groupes infectés traités et infectés non traités n'étaient pas colonisés par ce germe. D'après ces premiers résultats l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* a réduit significativement la colonisation gastro-intestinale et la translocation de *C. albicans* dans les organes internes.

Mots clés: *Marrubium vulgare* – *Candida albicans* – Activité toxicologique – Activité antifongique – Translocation, Organes Internes, Intestin.

Abstract

Medicinal plants represent a considerable source of bioactive substances against many pathologies and which are not very usable nowadays. This study aims to evaluate the toxicity as well as the antifungal activity of alcoholic (methanol) extracts of *Marrubium vulgare* (EMMV) on male rats experimentally rendered candidiasis. The quantitative and qualitative phytochemical analysis of the extract by HPLC-DAD-ESI-MS, showed the presence of several phenolic compounds. Toxicological study and histological analysis indicated that the dose of methanolic extract of *Marrubium vulgare* at 800 mg / kg body weight was not harmful and showed no tissue damage of the organs. Microbiological analysis showed that rats inoculated with 10^7 cfu / ml of *C. albicans* and treated with MEMV limited the multiplication of this pathogen in the intestine and colon of colonized rats ($p < 0.05$). The translocation of *Candida albicans* in the liver, spleen and lungs of rats treated with 800 mg / kg after inoculation with *C. albicans* was lower than in controls at 7 days post-infection ($p < 0.05$). However, the kidneys and hearts of the infected groups treated and infected untreated were not colonized by this microbe. Based on these initial results, the methanolic extract of *Marrubium vulgare* significantly reduced gastrointestinal colonization and translocation of *C. albicans* in internal organs.

Key words: *Marrubium vulgare* – *Candida albicans* – Toxicological Activity – Antifungal Activity – Translocation – Internal Organs – Intestine.