

UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2011

THESE N°: 21

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DE L'ACTIVITÉ
ANTIFONGIQUE IN VITRO DES HUILES ESSENTIELLES DE
QUATRE ESPÈCES DU GENRE *NEPETA* DU MAROC**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mr. Abdellatif SRIFI

Né le 01 Janvier 1975 à Sidi Redouane (Ouezzane)

Pharmacien Interne du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina de Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: Genre *Nepeta* – Huiles essentielles – Nepetalactone – Activité antifongique – In vitro.

JURY

Mr. Y. CHERRAH

Professeur de Pharmacologie

Mr. B. E. LMIMOUNI

Professeur de Parasitologie

Mme. A. BENOUDA

Professeur de Microbiologie

Mme. K. ALAOUI

Professeur de Pharmacologie

Mr. J. LAMSAOURI

Professeur Agrégé de Chimie Thérapeutique

Mr. EL H. BOUIDIDA

Docteur en Phytochimie (LNCM)

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

MEMBRE ASSOCIE

﴿سُبْحَانَكَ﴾

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ ﴿٣١﴾

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الْعَلِيِّمِ الْحَكِيمِ

﴿سورة البقرة: من الآية: 31﴾



**UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 - 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 - 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 - 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 - 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 - 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 - 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam Neurochirurgie

4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie –Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
12. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire
13. Pr. BENSOUDA Mohamed Anatomie
14. Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique
15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma Physiologie

Novembre 1983

16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*	Pneumo-phtisiologie
17. Pr. BALAFREJ Amina	Pédiatrie
18. Pr. BELLAKHDAR Fouad	Neurochirurgie
19. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia	Rhumatologie
20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine	Cardiologie

Décembre 1984

21. Pr. BOUCETTA Mohamed*	Neurochirurgie
22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil	Radiothérapie
23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne
24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
25. Pr. NAJI M'Barek *	Immuno-Hématologie
26. Pr. SETTAF Abdellatif	Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27. Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
28. Pr. BENSaid Younes	Pathologie Chirurgicale
29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie
30. Pr. IHRAI Hssain *	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
31. Pr. IRAQI Ghali	Pneumo-phtisiologie
32. Pr. KZADRI Mohamed	Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33. Pr. AJANA Ali	Radiologie
34. Pr. AMMAR Fanid Pathologie	Chirurgicale
35. Pr. CHAHED OUAZZANI Houria ép.TAOBANE	Gastro-Entérologie
36. Pr. EL FASSY Fihri Mohamed Taoufiq	Pneumo-phtisiologie
37. Pr. EL HAITEM Naïma	Cardiologie
38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*	Chimie-Toxicologie Expertise
39. Pr. EL YAACOUBI Moradh	Traumatologie Orthopédie
40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah	Gastro-Entérologie
41. Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
42. Pr. OHAYON Victor*	Médecine Interne
43. Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
45. Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie
46. Pr. FAIK Mohamed	Urologie
47. Pr. HERMAS Mohamed	Traumatologie Orthopédie
48. Pr. TOLOUNE Farida*	Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNAOUI Mohamed	Médecine Interne
50. Pr. AOUNI Mohamed	Médecine Interne
51. Pr. BENAMEUR Mohamed*	Radiologie
52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali	Cardiologie
53. Pr. CHAD Bouziane	Pathologie Chirurgicale
54. Pr. CHKOFF Rachid	Pathologie Chirurgicale

55. Pr. FARCHADO Fouzia ép.BENABDELLAH	Pédiatrique
56. Pr. HACHIM Mohammed*	Médecine-Interne
57. Pr. HACHIMI Mohamed	Urologie
58. Pr. KHARBACH Aïcha	Gynécologie -Obstétrique
59. Pr. MANSOURI Fatima	Anatomie-Pathologique
60. Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda	Neurologie
61. Pr. SEDRATI Omar*	Dermatologie
62. Pr. TAZI Saoud Anas	Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

63. Pr. AL HAMANY Zaïtounia	Anatomie-Pathologique
64. Pr. ATMANI Mohamed*	Anesthésie Réanimation
65. Pr. AZZOUZI Abderrahim	Anesthésie Réanimation
66. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM	Néphrologie
67. Pr. BELKOUCHI Abdelkader	Chirurgie Générale
68. Pr. BENABDELLAH Chahrazad	Hématologie
69. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif	Chirurgie Générale
70. Pr. BENSOU DA Yahia	Pharmacie galénique
71. Pr. BERRAHO Amina	Ophtalmologie
72. Pr. BEZZAD Rachid	Gynécologie Obstétrique
73. Pr. CHABRAOUI Layachi	Biochimie et Chimie
74. Pr. CHANA El Houssaine*	Ophtalmologie
75. Pr. CHERRAH Yahia	Pharmacologie
76. Pr. CHOKAIRI Omar	Histologie Embryologie
77. Pr. FAJRI Ahmed*	Psychiatrie
78. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*	Chirurgie Générale
79. Pr. KHATTAB Mohamed	Pédiatrie
80. Pr. NEJMI Maati	Anesthésie-Réanimation
81. Pr. OUAALINE Mohammed*	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
82. Pr. SOULAYMANI Rachida ép.BENCHEIKH	Pharmacologie
83. Pr. TAOUFIK Jamal	Chimie thérapeutique

Décembre 1992

84. Pr. AHALLAT Mohamed	Chirurgie Générale
85. Pr. BENOUDA Amina	Microbiologie
86. Pr. BENSOU DA Adil	Anesthésie Réanimation
87. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
88. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
89. Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
90. Pr. DAOUDI Rajae	Ophtalmologie
91. Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
92. Pr. EL HADDOURY Mohamed	Anesthésie Réanimation
93. Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
94. Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
95. Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
96. Pr. JIDDANE	Mohamed Anatomie
97. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine	Gynécologie Obstétrique
98. Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
99. Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

100. Pr. AGNAOU Lahcen	Ophtalmologie
101. Pr. AL BAROUDI Saad	Chirurgie Générale
102. Pr. BENCHERIFA Fatiha	Ophtalmologie
103. Pr. BENJAAFAR Noureddine	Radiothérapie
104. Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
105. Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
106. Pr. CAOUI Malika	Biophysique
107. Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
108. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
109. Pr. EL AOUAD Rajae	Immunologie
110. Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
111. Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
112. Pr. EL IDRISSI LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
113. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*	Chirurgie Cardio- Vasculaire
114. Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
115. Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
116. Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
117. Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
118. Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
119. Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
120. Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
121. Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie - Orthopédie
122. Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
123. Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
124. Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie -Obstétrique
125. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
126. Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

127. Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
128. Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie - Pédiatrique
129. Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
130. Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
131. Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
132. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie - Obstétrique
133. Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie - Orthopédie
134. Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
135. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
136. Pr. EL ABBADI Najja	Neurochirurgie
137. Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
138. Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
139. Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
140. Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

141. Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
142. Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
143. Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
144. Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
145. Pr. BEDDOUCHE Amocrane*	Urologie

146. Pr. BENAZZOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
147. Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
148. Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
149. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation
150. Pr. EL MESNAOUI Abbes	Chirurgie Générale
151. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
152. Pr. FERHATI Driss	Gynécologie Obstétrique
153. Pr. HASSOUNI Fadil	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
154. Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie
155. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
156. Pr. IBRAHIMY Wafaa	Ophtalmologie
157. Pr. MANSOURI Aziz	Radiothérapie
158. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
159. Pr. RZIN Abdelkader*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
160. Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique
161. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

Décembre 1996

162. Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
163. Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
164. Pr. BELMAHI Amin	Chirurgie réparatrice et plastique
165. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim	Ophtalmologie
166. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale
167. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*	Parasitologie
168. Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
169. Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie
170. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid	Chirurgie Générale
171. Pr. MOHAMMADI Mohamed	Médecine Interne
172. Pr. MOULINE Soumaya	Pneumo-physiologie
173. Pr. OUADGHIRI Mohamed	Traumatologie-Orthopédie
174. Pr. OUZEDDOUN Naima	Néphrologie
175. Pr. ZBIR EL Mehdi*	Cardiologie

Novembre 1997

176. Pr. ALAMI Mohamed Hassan	Gynécologie-Obstétrique
177. Pr. BEN AMAR Abdesselem	Chirurgie Générale
178. Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
179. Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
180. Pr. BOULAICH Mohamed	O.R.L.
181. Pr. CHAOUIR Souad*	Radiologie
182. Pr. DERRAZ Said	Neurochirurgie
183. Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
184. Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
185. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra	Radiologie
186. Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation
187. Pr. KANOUNI NAWAL	Physiologie
188. Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
189. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
190. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
191. Pr. NAZI M'barek*	Cardiologie
192. Pr. OUAHABI Hamid*	Neurologie

- | | |
|------------------------------|-------------------------|
| 193. Pr. SAFI Lahcen* | Anesthésie Réanimation |
| 194. Pr. TAOUFIQ Jallal | Psychiatrie |
| 195. Pr. YOUSFI MALKI Mounia | Gynécologie Obstétrique |

Novembre 1998

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| 196. Pr. AFIFI RAJAA | Gastro-Entérologie |
| 197. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali* | Pneumo-phtisiologie |
| 198. Pr. ALOUANE Mohammed* | Oto-Rhino-Laryngologie |
| 199. Pr. BENOMAR ALI | Neurologie |
| 200. Pr. BOUGTAB Abdesslam | Chirurgie Générale |
| 201. Pr. ER RIHANI Hassan | Oncologie Médicale |
| 202. Pr. EZZAITOUNI Fatima | Néphrologie |
| 203. Pr. KABBAJ Najat | Radiologie |
| 204. Pr. LAZRAK Khalid (M) | Traumatologie Orthopédie |

Novembre 1998

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| 205. Pr. BENKIRANE Majid* | Hématologie |
| 206. Pr. KHATOURI ALI* | Cardiologie |
| 207. Pr. LABRAIMI Ahmed* | Anatomie Pathologique |

Janvier 2000

- | | |
|---|--------------------------|
| 208. Pr. ABID Ahmed* | Pneumophtisiologie |
| 209. Pr. AIT OUMAR Hassan | Pédiatrie |
| 210. Pr. BENCHERIF My Zahid | Ophtalmologie |
| 211. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd | Pédiatrie |
| 212. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine | Pneumo-phtisiologie |
| 213. Pr. CHAOUI Zineb | Ophtalmologie |
| 214. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer | Chirurgie Générale |
| 215. Pr. ECHARRAB El Mahjoub | Chirurgie Générale |
| 216. Pr. EL FTOUH Mustapha | Pneumo-phtisiologie |
| 217. Pr. EL MOSTARCHID Brahim* | Neurochirurgie |
| 218. Pr. EL OTMANYAzzedine | Chirurgie Générale |
| 219. Pr. GHANNAM Rachid | Cardiologie |
| 220. Pr. HAMMANI Lahcen | Radiologie |
| 221. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim | Anesthésie-Réanimation |
| 222. Pr. ISMAILI Hassane* | Traumatologie Orthopédie |
| 223. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss | Gastro-Entérologie |
| 224. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim* | Anesthésie-Réanimation |
| 225. Pr. TACHINANTE Rajae | Anesthésie-Réanimation |
| 226. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida | Médecine Interne |

Novembre 2000

- | | |
|--------------------------------------|------------------------|
| 227. Pr. AIDI Saadia | Neurologie |
| 228. Pr. AIT OURHROUI Mohamed | Dermatologie |
| 229. Pr. AJANA Fatima Zohra | Gastro-Entérologie |
| 230. Pr. BENAMR Said | Chirurgie Générale |
| 231. Pr. BENCHEKROUN Nabiha | Ophtalmologie |
| 232. Pr. CHERTI Mohammed | Cardiologie |
| 233. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma | Anesthésie-Réanimation |
| 234. Pr. EL HASSANI Amine | Pédiatrie |
| 235. Pr. EL IDGHIRI Hassan | Oto-Rhino-Laryngologie |

236. Pr. EL KHADER Khalid	Urologie
237. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*	Rhumatologie
238. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
239. Pr. HSSAIDA Rachid*	Anesthésie-Réanimation
240. Pr. LACHKAR Azzouz	Urologie
241. Pr. LAHLOU Abdou	Traumatologie Orthopédie
242. Pr. MAFTAH Mohamed*	Neurochirurgie
243. Pr. MAHASSINI Najat	Anatomie Pathologique
244. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae	Pédiatrie
245. Pr. NASSIH Mohamed*	Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
246. Pr. ROUIMI Abdelhadi	Neurologie

Décembre 2001

247. Pr. ABABOU Adil	Anesthésie-Réanimation
248. Pr. AOUAD Aicha	Cardiologie
249. Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
250. Pr. BELMEKKI Mohammed	Ophtalmologie
251. Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
252. Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
253. Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-phtisiologie
254. Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
255. Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
256. Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
257. Pr. BENYOUSSEF Khalil	Dermatologie
258. Pr. BERRADA Rachid	Gynécologie Obstétrique
259. Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
260. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi	Anatomie
261. Pr. BOUHOUCHE Rachida	Cardiologie
262. Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
263. Pr. CHAT Latifa	Radiologie
264. Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
265. Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
266. Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
267. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira	Gynécologie Obstétrique
268. Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
269. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
270. Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
271. Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
272. Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
273. Pr. EL QUESSAR Abdeljilil	Radiologie
274. Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
275. Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
276. Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
277. Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
278. Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
279. Pr. KABIRI El Hassane*	Chirurgie Thoracique
280. Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
281. Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
282. Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
283. Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
284. Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique

285. Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
286. Pr. NABIL Samira	Gynécologie Obstétrique
287. Pr. NOUINI Yassine	Urologie
288. Pr. OUALIM Zouhir*	Néphrologie
289. Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
290. Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique
291. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia	Pédiatrie
292. Pr. TAZI MOUKHA Karim	Urologie

Décembre 2002

293. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*	Anatomie Pathologique
294. Pr. AMEUR Ahmed *	Urologie
295. Pr. AMRI Rachida	Cardiologie
296. Pr. AOURARH Aziz*	Gastro-Entérologie
297. Pr. BAMOU Youssef *	Biochimie-Chimie
298. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
299. Pr. BENBOUAZZA Karima	Rhumatologie
300. Pr. BENZEKRI Laila	Dermatologie
301. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*	Gastro-Entérologie
302. Pr. BERNOUSSI Zakiya	Anatomie Pathologique
303. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya	Psychiatrie
304. Pr. CHOHO Abdelkrim *	Chirurgie Générale
305. Pr. CHKIRATE Bouchra	Pédiatrie
306. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair	Chirurgie Pédiatrique
307. Pr. EL ALJ Haj Ahmed	Urologie
308. Pr. EL BARNOUSSI Leila	Gynécologie Obstétrique
309. Pr. EL HAOURI Mohamed *	Dermatologie
310. Pr. EL MANSARI Omar*	Chirurgie Générale
311. Pr. ES-SADEL Abdelhamid	Chirurgie Générale
312. Pr. FILALI ADIB Abdelhai	Gynécologie Obstétrique
313. Pr. HADDOUR Leila	Cardiologie
314. Pr. HAJJI Zakia	Ophtalmologie
315. Pr. IKEN Ali	Urologie
316. Pr. ISMAEL Farid	Traumatologie Orthopédie
317. Pr. JAAFAR Abdeloihab*	Traumatologie Orthopédie
318. Pr. KRIOULE Yamina	Pédiatrie
319. Pr. LAGHMARI Mina	Ophtalmologie
320. Pr. MABROUK Hfid*	Traumatologie Orthopédie
321. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*	Gynécologie Obstétrique
322. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*	Cardiologie
323. Pr. MOUSTAINE My Rachid	Traumatologie Orthopédie
324. Pr. NAITLHO Abdelhamid*	Médecine Interne
325. Pr. OUJILAL Abdelilah	Oto-Rhino-Laryngologie
326. Pr. RACHID Khalid *	Traumatologie Orthopédie
327. Pr. RAISS Mohamed	Chirurgie Générale
328. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*	Pneumophtisiologie
329. Pr. RHOU Hakima	Néphrologie
330. Pr. SIAH Samir *	Anesthésie Réanimation
331. Pr. THIMOU Amal	Pédiatrie
332. Pr. ZENTAR Aziz*	Chirurgie Générale
333. Pr. ZRARA Ibtisam*	Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

334. Pr. ABDELLAH EI Hassan	Ophtalmologie
335. Pr. AMRANI Mariam	Anatomie Pathologique
336. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas	Oto-Rhino-Laryngologie
337. Pr. BENKIRANE Ahmed*	Gastro-Entérologie
338. Pr. BENRAMDANE Larbi*	Chimie Analytique
339. Pr. BOUGHALEM Mohamed*	Anesthésie Réanimation
340. Pr. BOULAADAS Malik	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
341. Pr. BOURAZZA Ahmed*	Neurologie
342. Pr. CHAGAR Belkacem*	Traumatologie Orthopédie
343. Pr. CHERRADI Nadia	Anatomie Pathologique
344. Pr. EL FENNI Jamal*	Radiologie
345. Pr. EL HANCHI ZAKI	Gynécologie Obstétrique
346. Pr. EL KHORASSANI Mohamed	Pédiatrie
347. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*	Cardiologie
348. Pr. HACHI Hafid	Chirurgie Générale
349. Pr. JABOUIRIK Fatima	Pédiatrie
350. Pr. KARMANE Abdelouahed	Ophtalmologie
351. Pr. KHABOUZE Samira	Gynécologie Obstétrique
352. Pr. KHARMAZ Mohamed	Traumatologie Orthopédie
353. Pr. LEZREK Mohammed*	Urologie
354. Pr. MOUGHIL Said	Chirurgie Cardio-Vasculaire
355. Pr. NAOUMI Asmae*	Ophtalmologie
356. Pr. SAADI Nozha	Gynécologie Obstétrique
357. Pr. SASSENOU ISMAIL*	Gastro-Entérologie
358. Pr. TARIB Abdelilah*	Pharmacie Clinique
359. Pr. TIJAMI Fouad	Chirurgie Générale
360. Pr. ZARZUR Jamila	Cardiologie

Janvier 2005

361. Pr. ABBASSI Abdellah	Chirurgie Réparatrice et Plastique
362. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*	Chirurgie Générale
363. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid	Microbiologie
364. Pr. ALLALI Fadoua	Rhumatologie
365. Pr. AMAR Yamama	Néphrologie
366. Pr. AMAZOUZI Abdellah	Ophtalmologie
367. Pr. AZIZ Noureddine*	Radiologie
368. Pr. BAHIRI Rachid	Rhumatologie
369. Pr. BARKAT Amina	Pédiatrie
370. Pr. BENHALIMA Hanane	Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
371. Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
372. Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
373. Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie
374. Pr. BOUKLATA Salwa	Radiologie
375. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
376. Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
377. Pr. EL HAMZAOUI Sakina	Microbiologie
378. Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
379. Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
380. Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie

381. Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
382. Pr. KENDOSSI Mohamed*	Cardiologie
383. Pr. LAAROSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
384. Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
385. Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
386. Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
387. Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
388. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam	Ophtalmologie
389. Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
424. Pr. AFIFI Yasser	Dermatologie
425. Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra	Dermatologie
427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
428. Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
429. Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio – Vasculaire
432. Pr. CHEIKHAOUI Younes	Chirurgie Cardio – Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa	Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibtissam	Cardiologie
437. Pr. FAROUDY Mamoun	Anesthésie Réanimation
438. Pr. GHADOUANE Mohammed*	Urologie
439. Pr. HARMOUCHE Hicham	Médecine Interne
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*	Anesthésie Réanimation
441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine	Microbiologie
442. Pr. JROUNDI Laila	Radiologie
443. Pr. KARMOUNI Tariq	Urologie
444. Pr. KILI Amina	Pédiatrie
445. Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
446. Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*	Médecine Interne
448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique
449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*	Parasitologie
450. Pr. MANSOURI Hamid*	Radiothérapie
451. Pr. NAZIH Naoual	O.R.L
452. Pr. OUANASS Abderrazzak	Psychiatrie
453. Pr. SAFI Soumaya*	Endocrinologie
454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra	Psychiatrie
455. Pr. SEFIANI Sana	Anatomie Pathologique
456. Pr. SOUALHI Mouna	Pneumo – Phtisiologie
457. Pr. TELLAL Saida*	Biochimie
458. Pr. ZAHRAOUI Rachida	Pneumo - Phtisiologie

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila	Anatomie pathologique
459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid	Anesthésie réanimation
460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid	Anesthésier réanimation
461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *	Anesthésie réanimation
462. Pr. BAITE Abdelouahed *	Anesthésie réanimation
463. Pr. TOUATI Zakia	Cardiologie
464. Pr. OUZZIF Ez zohra *	Biochimie
465. Pr. BALOUCH Lhousaine *	Biochimie
466. Pr. SELKANE Chakir *	Chirurgie cardio vasculaire
467. Pr. EL BEKKALI Youssef *	Chirurgie cardio vasculaire
468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *	Chirurgie cardio vasculaire
469. Pr. EL ABSI Mohamed	Chirurgie générale
470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *	Chirurgie générale
471. Pr. ACHOUR Abdessamad *	Chirurgie générale
472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq *	Chirurgie générale
473. Pr. GHARIB Nouredine	Chirurgie plastique
474. Pr. TABERKANET Mustafa *	Chirurgie vasculaire périphérique
475. Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
476. Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
477. Pr. RABHI Monsef *	Médecine interne
478. Pr. MRABET Mustapha *	Médecine préventive santé publique et hygiène
479. Pr. SEKHSOKH Yessine *	Microbiologie
480. Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
481. Pr. LOUZI Lhoussain *	Microbiologie
482. Pr. MRANI Saad *	Virologie
483. Pr. GANA Rachid	Neuro chirurgie
484. Pr. ICHOU Mohamed *	Oncologie médicale
485. Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophtalmologie
487. Pr. MELLAL Zakaria	Ophtalmologie
488. Pr. AMMAR Haddou *	ORL
489. Pr. AOUI Sarra	Parasitologie
490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
492. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
493. Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib *	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
500. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
501. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
502. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
503. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
504. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
505. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes
Pr. AZENDOUR Hicham *
Pr. BELYAMANI Lahcen *
Pr. BOUHSAIN Sanae *
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. LAMSAOURI Jamal *
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. AMAHZOUNE Brahim *
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
Pr. BOUNAIM Ahmed *
Pr. EL MALKI Hadj Omar
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. CHTATA Hassan Toufik *
Pr. BOUI Mohammed *
Pr. KABBAJ Nawal
Pr. FATHI Khalid
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. CHAKOUR Mohammed *
Pr. DOGHMI Kamal *
Pr. ABOUZAHIR Ali *
Pr. ENNIBI Khalid *
Pr. EL OUENNASS Mostapha
Pr. ZOUHAIR Said*
Pr. L'kassimi Hachemi*
Pr. AKHADDAR Ali *
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AGADR Aomar *
Pr. KARBOUBI Lamya
Pr. MESKINI Toufik
Pr. KABIRI Meryem
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
Pr. BASSOU Driss *
Pr. ALLALI Nazik
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. AMINE Bouchra
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
Pr. KADI Said *

Anatomie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Biochimie
Cardiologie
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Chirurgie Cardio-vasculaire
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Dermatologie
Gastro-entérologie
Gynécologie obstétrique
Hématologie biologique
Hématologie biologique
Hématologie clinique
Médecine interne
Médecine interne
Microbiologie
Microbiologie
Microbiologie
Neuro-chirurgie
Neurologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Radiologie
Radiologie
Radiologie
Rhumatologie
Rhumatologie
Traumatologie orthopédique
Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. CHERRADI Ghizlan
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. ALILOU Mustapha
Pr. KANOUNI Lamya
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. MALIH Mohamed*

Médecine interne
Gastro entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie réanimation
Radiothérapie
Radiologie
Radiologie
Pédiatrie
Pédiatrie

Pr. BOUSSIF Mohamed*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. RAISSOUNI Zakaria*
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. LEZREK Mounir
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. LAMALMI Najat
Pr. ZOUAIDIA Fouad
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. CHADLI Mariama*

Médecine aérologique
Chirurgie plastique et réparatrice
Chirurgie pédiatrique
Urologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
ORL
Ophtalmologie
Hématologie
Anatomie pathologique
Anatomie pathologique
Physiologie
Biochimie chimie
Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES **PROFESSEURS**

1. Pr. ABOUDRAR Saadia
2. Pr. ALAMI OUHABI Naima
3. Pr. ALAOUI KATIM
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
5. Pr. ANSAR M'hammed
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed
9. Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
10. Pr. DAKKA Taoufiq
11. Pr. DRAOUI Mustapha
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen
13. Pr. ETTAIB Abdelkader
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine
17. Pr. KABBAJ Ouafae
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine
19. Pr. REDHA Ahlam
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
21. Pr. TOUATI Driss
22. Pr. ZAHIDI Ahmed
23. Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Applications Pharmaceutiques
Génétique Humaine
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Chimie Organique

Biochimie
Biologie
Biochimie
Chimie Organique
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

*** Enseignants Militaires**



✿ Je dédie cette thèse à ... ✿

A MES TRÈS CHERS PARENTS

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien être. Vous avez toujours été présents et généreux et c'est à travers vos prières et vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez placés en moi. Ce modeste travail est aussi le votre. Puisse Dieu tout puissant vous protéger, vous procurer longue vie et bonne santé afin que je puisse vous restituer un minimum de ce que je vous dois.

A MES SŒURS ET FRÈRES

*Pour votre soutien moral et vos encouragements.
Permettez-moi de vous exprimer mon amour le plus profond et mes vœux de réussite.*

A Tous Les Membres de la Famille SRIFI

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de longue vie.

A Tous Les Membres de la Famille IBRAHIMI

Avec l'expression de mon profond dévouement et tout mon attachement.

A Tous Mes Amis

En souvenir des agréables moments partagés et en témoignage de notre amitié.

A Tous Mes Maîtres et Professeurs de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat

A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire

A Tous les Internes et Résidents en Pharmacie

Merci pour votre soutien et vos encouragements



REMERCIEMENTS

*A Nôtre Maître et Président de Jury de Thèse
Monsieur le Professeur Yahia CHERRAH
Professeur de Pharmacologie*

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de notre thèse.

Nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre rigueur, votre modestie, et votre disponibilité.

Nous espérons à travers ce travail être à la hauteur de vos enseignements, veuillez y trouver, cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A Nôtre Maître et Rapporteur de Thèse
Monsieur le Professeur Badreddine LMIMOUNI
Professeur de Parasitologie

Cher maître, préparer ce travail sous votre direction a été pour nous un grand honneur et un véritable privilège.

Les qualités tant humaines que professionnelles qui sont les vôtres ne sont plus à présenter, elles font depuis des années votre réputation.

C'est avec beaucoup de patience, de disponibilité et de minutie que vous avez dirigé ce modeste travail. Sans votre engagement, votre accompagnement, et votre soutien sans faille, il n'aurait pu voir le jour.

Nous espérons à travers notre travail être à la hauteur de votre confiance et de vos attentes, veuillez y trouver l'expression de notre plus sincère reconnaissance.

*A Nôtre Maître et Juge de Thèse
Madame le Professeur Amina BENOUDA
Professeur de Microbiologie*

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre thèse.

Votre rigueur de travail, ainsi que votre dévouement professionnel sans limites, sont pour nous source d'admiration et de profond respect, et un exemple dans l'exercice de la profession.

Veillez accepter, cher maître, l'expression de notre reconnaissance et de notre profonde estime

*A Nôtre Maître et Juge de Thèse
Madame le Professeur Katim ALAOUI
Professeur de Pharmacologie*

Vous avez accepté en toute simplicité de juger ce travail, et c'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger parmi notre jury.

Par vos éclairages et votre disponibilité, vous avez également contribué à la genèse de ce travail.

Veillez y trouver, cher maître, l'expression de nos vifs remerciements et de notre profond respect.

A Nôtre Maître et Juge de Thèse
Monsieur le Professeur Jamal LAMSAOURI
Professeur Agrégé de Chimie Thérapeutique

Pour avoir travaillé sous votre direction pendant une année, nous avons appris à apprécier vos nombreuses qualités tant humaines que scientifiques et professionnelles.

C'est avec la même modestie et le même accueil qui vous caractérisent que vous avez accepté de faire partie de ce jury, nous sommes conscients de l'honneur que vous nous faites et espérons être à la hauteur de vos encouragements et de votre soutien.

Veillez trouver en ce modeste travail l'expression de notre gratitude.

*A Nôtre Juge de Thèse
Monsieur le Docteur EL Houcine BOUIDIDA
Docteur en Phytochimie
Laboratoire National de Contrôle des Médicaments
Direction du Médicament et de la Pharmacie-Ministère de la Santé*

Les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre gratitude et notre attachement. Sans votre collaboration précieuse, votre vision juste et votre générosité - aussi bien scientifique que morale - ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

Nous avons trouvé en vous un homme de science et de cœur.

Pour tout le temps et l'énergie que vous nous avez consacrés, merci infiniment.

Ce travail est aussi le votre, veuillez y trouver l'expression de mon respect et de mon attachement sincère.

*A Nôtre Maître Madame le Professeur
Wafae El MELLOUKI
Professeur de Parasitologie*

Nous avons durant nôtre cursus eu la chance de faire partie de vos disciples, votre gentillesse, votre disponibilité, votre engagement ainsi que la qualité et la clarté de votre enseignement sont tout autant de qualités humaines et professionnelles qui font de vous une personne d'exception et un enseignant modèle.

Travailler dans votre service a été pour moi source de d'honneur et de fierté.

Veillez trouver en ce modeste travail l'expression de ma profonde estime et de mon profond attachement.

*Aux docteurs M. BOUCHRIK et H. NAOUI ainsi qu'à tout le
Personnel du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital
Militaire d'Instruction Mohammed V à Rabat*

*Nos plus sincères remerciements pour votre accueil, votre bonne humeur, vos
conseils et votre soutien.*

Nos plus sincères remerciements également pour :

*Tous les responsables et les Personnels du Laboratoire National de
Contrôle des Médicaments
Direction du médicament et de la pharmacie*

*Tous les responsables du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie
l'équipe de Recherche Toxico-Pharmacodynamie
(Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat).*

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>A.n</i>	: <i>Aspergillus niger</i>
AMB	: Amphotéricine B
ATF	: Antifongique
<i>C.a</i>	: <i>Candida albicans</i>
<i>C.g</i>	: <i>Candida glabrata</i>
<i>C.t</i>	: <i>Candida tropicalis</i>
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG - SM	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
EDS	: Eau Distillée Stérile
EVE	: Entraînement à la Vapeur d'Eau
FCZ	: Fluconazole
ICZ	: Nitrate d'isoconazole
IR	: Infra rouge
<i>M.c</i>	: <i>Microsporium canis</i>
<i>M.g</i>	: <i>Microsporium gypseum</i>
<i>N.a</i>	: <i>Nepeta atlantica</i> Ball
<i>N.C</i>	: <i>Nepeta cataria</i> L
<i>N.g</i>	: <i>Nepeta granatensis</i> Boiss
<i>N.t</i>	: <i>Nepeta tuberosa</i> L. ssp. <i>reticulata</i> (Desf.) Maire
RMN ¹³C	: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
SC	: Sabouraud Chloramphénicol
SCA	: Sabouraud Chloramphénicol Actidione
SCT80/2%	: Milieu Sabouraud Chloramphénicol à 2% de Tween 80
SL	: Sabouraud Liquide
SM	: Solution Mère
<i>T.r</i>	: <i>Trichophyton rubrum</i>
TBF	: Terbinafine

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
II. MATERIELS ET METHODES	5
II.1 Etude phytochimique	6
II.1.1 Matière première	6
II.1.2 Extraction des huiles essentielles	7
II.1.3 Analyse et identification.....	8
II.2 Isolats fongiques	10
II.2.1 Origine et entretien des isolats	10
II.2.2 Préparation et dénombrement des suspensions	15
II.2.2.1 Suspensions de <i>Candida</i>	15
II.2.2.2 Suspensions d' <i>Aspergillus niger</i>	15
II.2.2.3 Suspensions de dermatophytes	15
II.2.3 Techniques de mise en culture	17
II.2.3.1 Technique d'ensemencement des suspensions préparées	17
II.2.3.2 Technique de tracées pour le repiquage des dermatophytes	18
II.3 Mise au point du protocole d'étude de l'activité in vitro des antifongiques témoins	20
II.3.1 Antifongiques témoins utilisés	20
II.3.2 Choix et préparation des milieux de culture utilisés	21
II.3.3 Etude de la solubilité des différents antifongiques témoins.....	21
II.3.4 Miscibilité et compatibilité du diméthylsulfoxyde avec le milieu Sabouraud Chloramphénicol.....	23
II.3.5 Effet du diméthylsulfoxyde sur les isolats fongiques	24
II.3.6 Choix des dilutions à préparer	27
II.4 Etude de l'activité in vitro des antifongiques témoins.....	30
II.4.1 Méthode de dilution en milieu solide	30
II.4.2 Méthode de dilution en milieu liquide	30
II.5 Etude de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles.....	35
II.5.1 Méthode des puits dans le milieu de culture	35
II.5.2 Méthode de dilution en milieu solide	38

III. RESULTATS.....	41
III.1 Composition chimique des huiles essentielles des quatre espèces du genre <i>Nepeta</i>.....	42
III.2 Structure du composé majoritaire nepetalactone	43
III.3 Mise au point du protocole d'étude de l'activité in vitro des antifongiques témoins	47
III.4 Activité in vitro des antifongiques témoins	52
III.4.1 Sur milieu solide	54
III.4.2 Sur milieu liquide.....	58
III.4.3 Tableau récapitulatif des résultats des antifongiques témoins.....	62
III.5 Activité antifongique in vitro des huiles essentielles	63
III.5.1 Méthode des puits dans la gélose.....	63
III.5.2 Méthode de dilution des huiles essentielles dans la gélose	65
IV. DISCUSSION	70
IV.1 Mise au point du protocole d'étude de l'activité in vitro des antifongiques témoins	71
IV.2 Etude phytochimique.....	72
IV.3 Activité antifongique in vitro	74
V. CONCLUSION	79
TRAVAUX COMMUNIQUES	
RESUMES	
ANNEXES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

I. INTRODUCTION

La situation géographique et la diversité des étages bioclimatiques du Maroc, offrent une végétation riche et diverse, essentiellement concernant les plantes aromatiques médicinales qui poussent spontanément, certaines d'entre elles donnent des huiles essentielles ayant des propriétés antibactériennes [2, 36, 39], et antifongiques avérées [23, 31, 29, 47-49].

A cet effet, notre travail se propose de valoriser le potentiel aromatique et médicinal des plantes marocaines, à travers l'étude de l'activité antifongique in vitro de certaines espèces du genre *Nepeta*, qui appartient à la famille des Labiées ou « Lamiacées ». Cette famille regroupe des plantes herbacées, pour la plupart aromatiques, partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres), elle comporte de nombreuses plantes médicinales et aromatiques dont le genre *Nepeta* représenté au Maroc par 9 espèces sur 200 répertoriées dans le bassin méditerranéen [8, 33, 52].

Contexte de l'étude :

Le *Nepeta* L. est un genre assez riche de la famille des Lamiacées, puisqu'il compte près de 200 espèces, réparties dans la zone tempérée de l'ancien monde, surtout dans la région méditerranéenne. Il est représenté au Maroc par 9 espèces dont 4 endémiques, les 5 autres espèces sont spécifiques à la portion méridionale de la région méditerranéenne occidentale [8, 9].

Les plantes vivaces forment des sous-arbrisseaux dressés, elles sont pubescentes ou parfois très velues, à poils simples, tecteurs et glanduleux. Les feuilles toujours simples, sont diversement découpées sur les bords, pétiolées, subsessiles ou sessiles. Les inflorescences sont en épis ou en cymes lâches, denses, parfois pédonculées. Les bractées florales sont développées, linéaires ou lancéolées, de longueur et forme très variables. Les fleurs hermaphrodites, sont réunies en verticillastres distants ou plus ou moins rapprochés sur la tige. Le

calice cylindrique à ovoïde, droit ou courbé, a 15 nervures, il est accrescent, présentant 5 dents subégales, les supérieures parfois plus longues. Les graines sont lisses, tuberculeuses ou rugueuses [17, 26, 33, 52].

Le genre *Nepeta* a été longtemps utilisé comme aromate et plante médicinale, par plusieurs populations à travers le monde. Il est utilisé comme analgésique, sédatif, antitumoral, antibactérien, antiallergique, antileishmanien, antiasthmatique, antitussif, emménagogue, carminatif et tonique [30, 59].

L'indication traditionnelle la plus fréquente de genre *Nepeta* est son utilisation pour améliorer la fonction gastrique, combattre la nervosité excessive, l'hystérie et les spasmes de voies digestifs et respiratoires [7, 41, 58].

Nepeta cataria est une plante qui facilite la digestion, calme les toux rebelles, stimule les organes féminins, facilite et calme les règles. Fraîche, il suffit de la mâcher pour soulager les névralgies dentaires [43].

Au Maroc, l'espèce de *Nepeta* L. la plus utilisée est *Nepeta apulei* Ucr., au nom vernaculaire *gestân* ou *gestâl*. Cette espèce se rencontre fréquemment dans la région de Rabat – Salé – Zemmour - Zaer, où elle est utilisée fraîche et hachée comme vulnéraire, en cataplasme [7].

Après une brève description botanique et l'utilisation traditionnelle du genre *Nepeta*, notre choix s'est porté sur les espèces les plus courantes au Maroc, à savoir *Nepeta tuberosa* L.ssp.*reticulata* (Desf.) Maire (**Annexe 1**) et *Nepeta granatensis* Boiss (**Annexe2**), récoltées au Moyen Atlas (Val d'Ifrane), *Nepeta cataria* L (**Annexe 3**) récoltée dans la région de kénitra (Sidi Taïbi) et *Nepeta atlantica* Ball (**Annexe 4**) récoltée à Boumia-Tounfit; cette dernière espèce est endémique au Maroc [25].

Sur le plan pharmacologique, des travaux ont rapporté l'activité analgésique centrale et périphérique de l'huile essentielle de *N. italica* [4]. De même

Bouidida et al ont montré l'activité analgésique centrale et périphérique des huiles essentielles et des extraits de *N. atlantica* et *N. tuberosa*, et l'étude de leur toxicité aiguë par voie intra péritonéale témoigne d'une faible toxicité de ces huiles essentielles par cette voie [12-14]. D'autres travaux effectués sur *N. caesarea* identifiant le nepetalactone comme le produit responsable de l'activité analgésique [3], ainsi qu'un travail réalisé sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* a montré que cette activité dépend de leur composition chimique, et que le nepetalactone a un rôle important dans cette activité antibactérienne [61]. Par ailleurs, Jyoti S et al ont isolé deux nouveaux composés l'iridodial acetate β -monoénol à partir de l'huile essentielle de *N. leucophylla* et un terpène alcaloïde l'actinidine à partir de *N. clarkei*, ces deux composés ont montré une activité antifongique intéressante [34].

L'émergence de la résistance de nombreux isolats fongiques cliniques aux antifongiques commercialisés [6, 22, 24, 32, 35, 54, 55, 60], pose un réel problème de santé publique notamment chez les patients immunodéprimés (VIH, brûlés, hémopathies malignes, cancers...). De ce fait, la découverte de nouvelles molécules ayant une activité antifongique à base des huiles essentielles, aurait un impact favorable sur la recherche de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Objectifs de l'étude :

- ➔ Mise en place, optimisation et évaluation d'un protocole d'étude de l'activité antifongique in vitro des antifongiques témoins.
- ➔ Etude de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc.

II. MATÉRIELS ET MÉTODES

Il s'agit d'une étude expérimentale effectuée entre **Décembre 2007 et Avril 2009**. Trois laboratoires ont contribué à la réalisation de ce travail :

L'étude phytochimique a été effectuée au ***Laboratoire National de Contrôle des Médicaments*** (Direction du Médicament et de la Pharmacie de Rabat), et au ***Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie***, sous la responsabilité de l'équipe de Recherche Toxico-Pharmacodynamie (Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat).

L'étude mycologique concernant l'évaluation de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles a été réalisée au sein du ***service de Parasitologie-Mycologie à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat*** sous la responsabilité de l'équipe de recherche sur les infections fongiques (Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat).

II.1 Etude phytochimique

II.1.1 Matière première ^[15]

Les espèces choisies pour notre étude appartiennent à la famille des labiées et plus précisément au genre *Nepeta* réputé pour l'arôme et l'abondance des huiles essentielles, elles ont été récoltées en période de floraison à des endroits précis sous le contrôle des botanistes de l'Institut Scientifique de Rabat, qui assurent leur identification sur le terrain. Chaque espèce ainsi récoltée est mise à sécher sous forme étalée à l'abri des rayons solaires à température ambiante et régulièrement retournée. Le matériel végétal est grossièrement découpé au niveau de sa partie aérienne (feuilles, tiges, fleurs et brindilles).

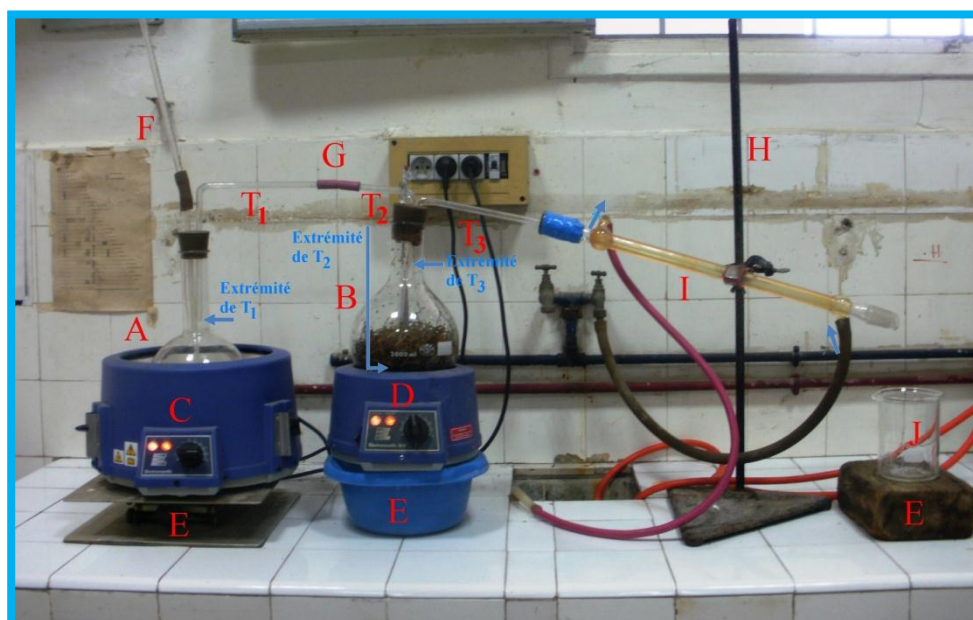
Le tableau **1** regroupe les noms latins des espèces récoltées ainsi que les étages bioclimatiques des lieux de récolte et leurs altitudes.

Tableau 1: Stations de récolte des espèces choisies

Espèce	Lieux de récolte	Etage bioclimatique	Altitude (m)
<i>Nepeta tuberosa L. ssp. reticulata (Desf.) Maire</i>	Val d'Ifrane	Humide	1500
<i>Nepeta atlantica Ball</i>	Boumia –Tounfit	Aride	1000
<i>Nepeta granatensis Boiss</i>	Val d'Ifrane	Humide	1500
<i>Nepeta cataria L</i>	Kenitra (sidi taïbi)	Subhumide	250

II.1.2 Extraction des huiles essentielles [15]

Le matériel végétal est soumis à l'entraînement par la vapeur d'eau pendant 5heures.



Photos 1 : Montage pour l'extraction des huiles essentielles du genre *Nepeta* par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau.

- A :** Ballon générateur de vapeur ou chaudière, contenant de l'eau.
- B :** Ballon d'entraînement ou bouilleur, contenant la matière végétale découpée et imbibée d'eau.
- C :** Chauffe-ballon avec un régulateur de chauffage (ébullition).
- D :** Chauffe-ballon avec un régulateur de chauffage (garder la température de vapeur constante).
- E :** Valet élévateur.
- F :** Tube de sureté (long tube de verre étroit immerger dans l'eau pour maintenir une pression stable dans (A))
- G :** Bague en caoutchouc raccorde les deux tubes (T_1) et (T_2).
- H :** Statif et une pince plate pour fixer le réfrigérant lié au tube (T_3).
- I :** Réfrigérant.
- J :** Récipient collecteur.

II.1.3 Analyse et identification ^[15]

Pour l'analyse des huiles essentielles nous avons adopté la technique la plus utilisée dans ce domaine à savoir la chromatographie en phase gazeuse « CPG ». Nous avons utilisé deux types de chromatographes.

Le premier est de marque Perkin Elmer Clarus 500, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme alimenté par un mélange hydrogène – air. L'analyse est faite sur une colonne capillaire Cpsil 8 CB (5% Phényl - 95% Diméthylpolysiloxane) 30 m x 0.32 mm, film 0.25 µm. Le gaz vecteur utilisé est l'azote. La température de la colonne est programmée automatiquement à 60°C durant 10 min, puis de 60°C à 200°C à raison de 2°C /min, et enfin de 200°C à 300°C à raison de 20°C/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur gardent une valeur constante respectivement 220°C et 300°C, avec une pression de 14 Psi sous Split Ratio de 1/10. Les volumes des échantillons injectés sont de l'ordre de 0,1 µl.

La détermination des compositions chimiques des huiles essentielles a été réalisée par plusieurs techniques. D'abord la lecture directe des temps de rétention sur les chromatogrammes. L'identification des constituants se fait donc par comparaison à un témoin authentique dont on soupçonne l'existence dans le mélange. On peut apporter une confirmation supplémentaire à l'identité du produit en additionnant à l'huile essentielle une faible quantité d'échantillon de référence du produit supposé, la probabilité est augmentée lorsque le pic correspondant du chromatogramme de l'huile essentielle grandit par rapport aux autres, nous avons particulièrement utilisé ceci pour tenter l'identification des produits légers et des produits en quantité faible.

Ensuite quand un produit présente un large pourcentage dans l'huile ($\geq 70\%$), et qu'il cristallise à l'état pur, il est possible de favoriser sa cristallisation au sein de l'huile par refroidissement. Cette méthode permet donc d'isoler ce produit pur et présente l'intérêt d'augmenter dans le filtrat les proportions des autres constituants. Nous avons particulièrement utilisé cette méthode pour isoler la nepetalactone à partir de l'huile essentielle des espèces *N. tuberosa*, *N. atlantica* et *N. cataria*. Dans ce cas, le produit isolé est identifié par les méthodes physico-chimiques habituelles à la chimie organique (RMN ^1H , RMN ^{13}C , IR, SM...etc). Nous avons aussi vérifié la répétition des temps de rétention en injectant le produit de référence d'un produit connu d'une part et l'huile essentielle d'autre part, dans les mêmes conditions de programme de température. Si la superposition continuait dans les mêmes conditions, il y avait alors une bonne certitude de l'identité du produit.

Enfin la confirmation finale s'est faite grâce à la CPG couplée à la spectrométrie de masse. Il s'agit d'un chromatographe en phase gazeuse type Hewlett Packard 5890 série II couplé à un spectromètre de masse de type 5972A, équipé d'une colonne DB5, 30m, de diamètre 0,25 mm et d'épaisseur de film 0,25 mm. Les conditions d'analyse étaient les suivantes : la température de la colonne programmée automatiquement à 60°C durant 10 min, puis de 60°C à 200°C à raison de 2°C /min, et enfin de 200°C à 300°C à raison de 20°C/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur gardent une valeur constante respectivement 220°C et 300°C, avec une pression de 14 Psi sous Split Ratio de 1/10. Les volumes des échantillons injectés sont de l'ordre de 0,1 μl .

II.2 Isolats fongiques

II.2.1 Origine et entretien des isolats

L'activité antifongique a été réalisée sur des isolats de la mycothèque du laboratoire de parasitologie mycologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat. Ces isolats sont obtenus après incubation à 28°C pendant 48h pour les levures du genre *Candida*, 72h pour *Aspergillus niger* et 1 semaine à 1 mois pour les dermatophytes. Ils sont ensuite entretenus par repiquages réguliers. Les isolats fongiques incluaient trois levures : *Candida albicans* (*C.a*), *Candida tropicalis* (*C.t*) et *Candida glabrata* (*C.g*) (**Photo 2 et 3**), qui sont les plus fréquemment identifiées dans les prélèvements cliniques [27, 35], une moisissure : *Aspergillus niger* (*A.n*) (**Photos 4 et 5**), et trois dermatophytes : *Microsporum canis* (*M.c*) (**Photos 6 et 7**), *Microsporum gypseum* (*M.g*) (**Photos 8 et 9**) et *Trichophyton rubrum* (*T.r*) (**Photos 10 et 11**).

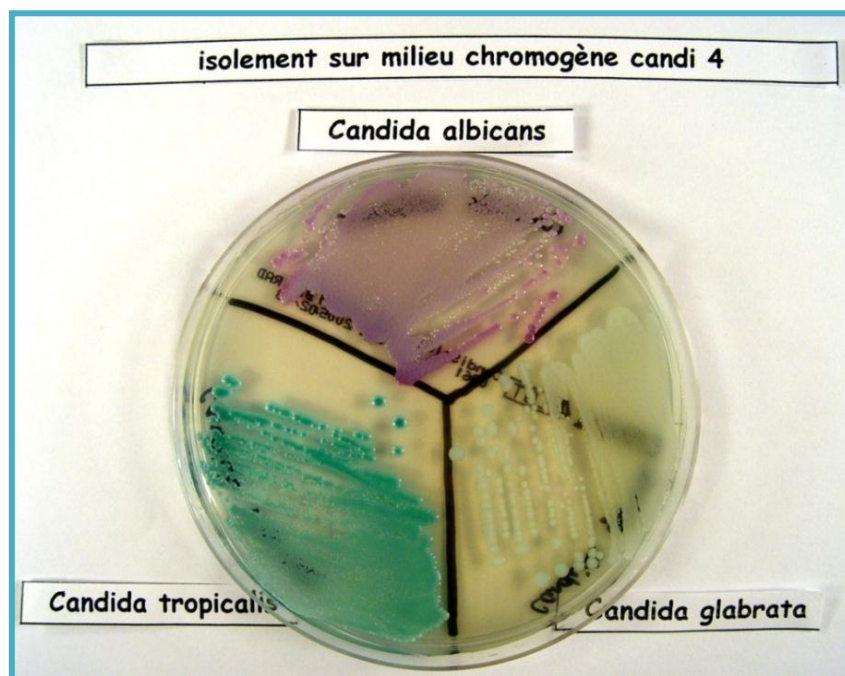


Photo 2: Aspect macroscopique [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV]

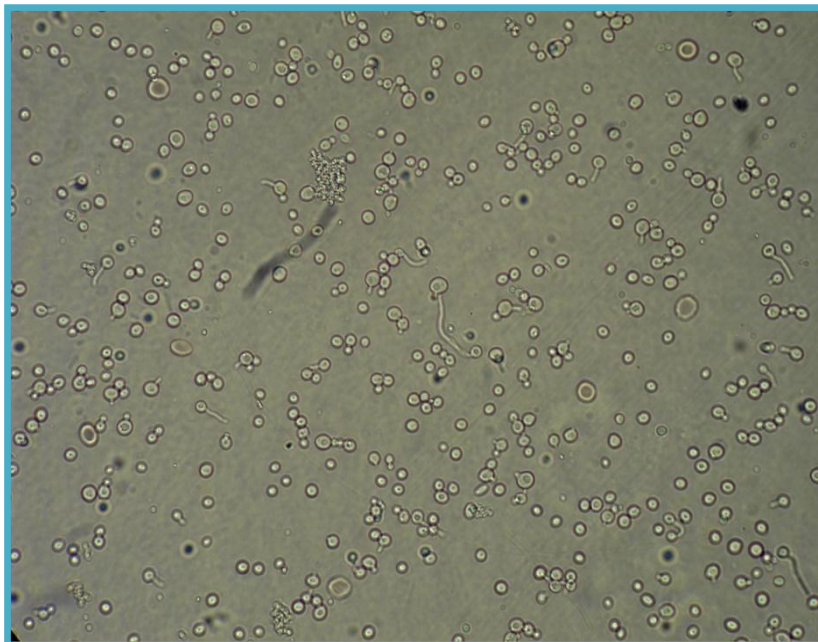


Photo 3: Aspect microscopique des levures du genre *Candida*
[Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV]

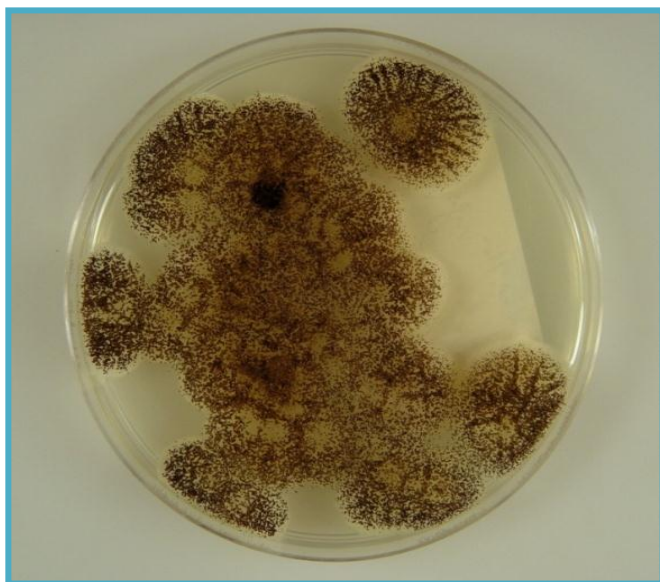


Photo 4 : Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger* sur gélose au malt [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV]

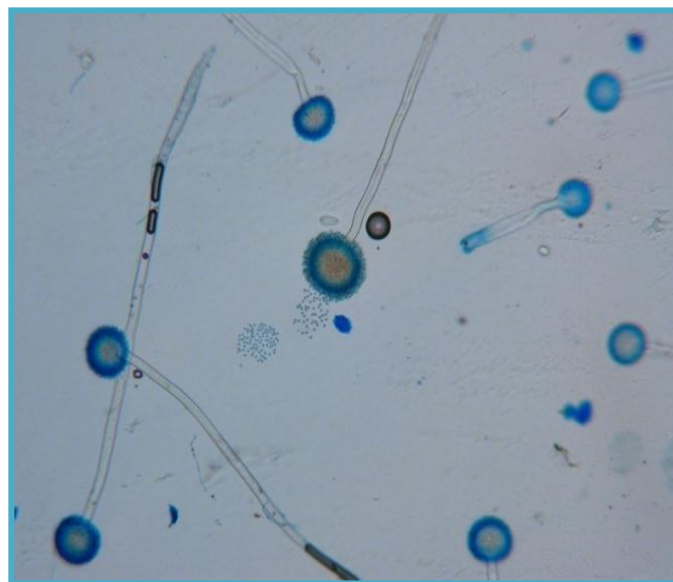


Photo 5 : Aspect microscopique des têtes aspergillaires au bleu de lactophénol, obj x 40 [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV]

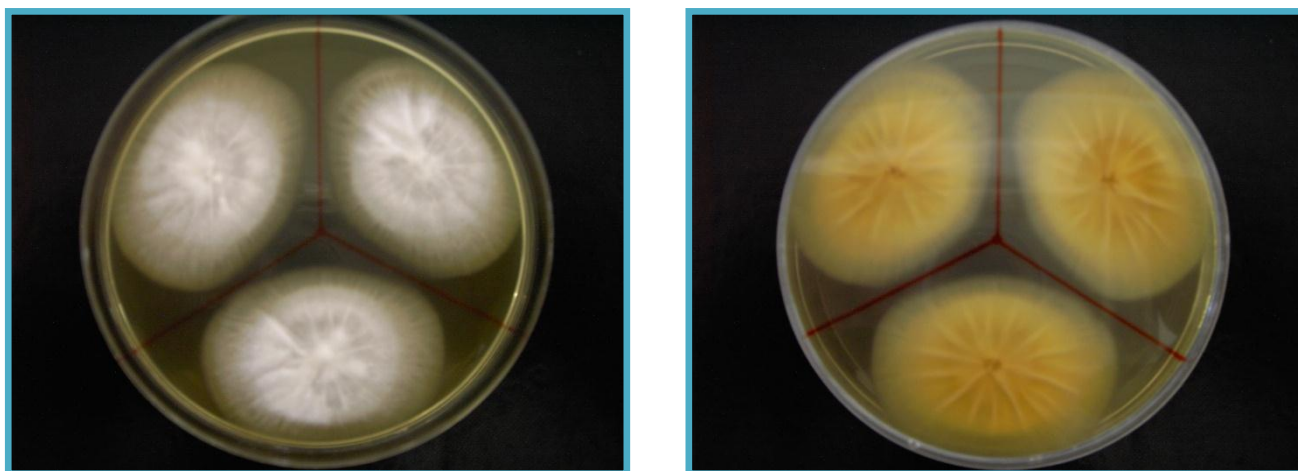


Photo 6 : Aspect macroscopique de *Microsporium canis* sur milieu SC, obtenu par une technique de repiquage à l'aide de tracé, recto (à gauche), verso (à droite) [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV].

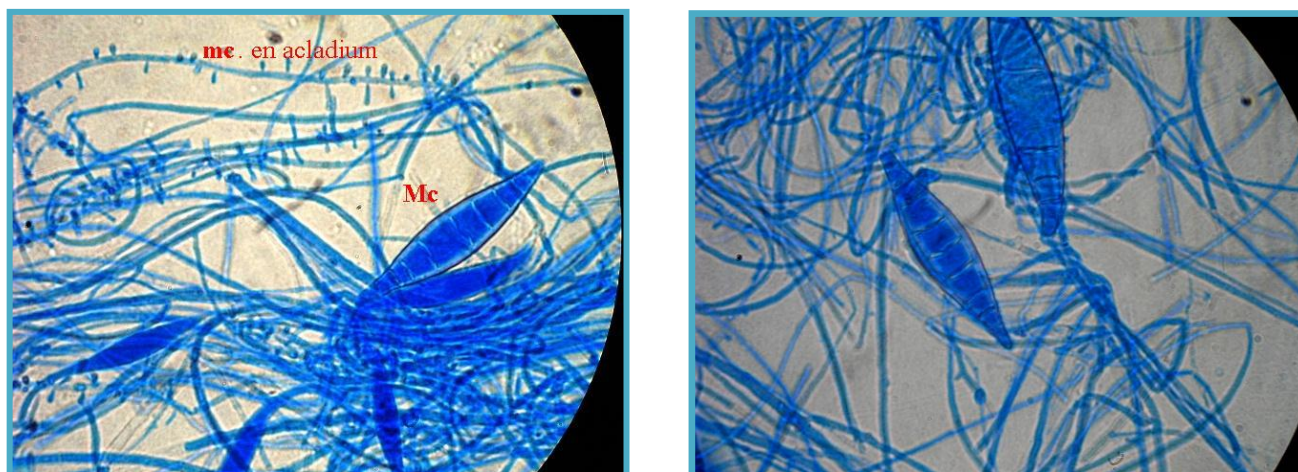


Photo 7 : Aspect microscopique des macroconidies (**Mc**) et microconidies (**mc**) en acladium de *Microsporium canis* au bleu de lactophéno, obj. × 40. [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV]

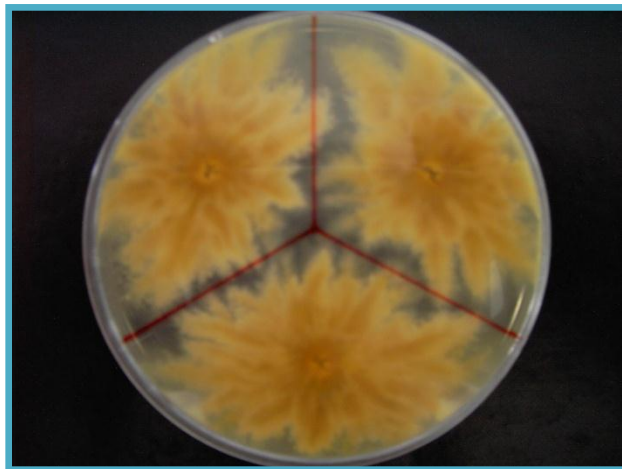


Photo 8 : Aspect macroscopique de *Microsporium gypseum* sur milieu SC, obtenu par une technique de repiquage à l'aide de tracé, recto (à gauche), verso (à droite) [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV].

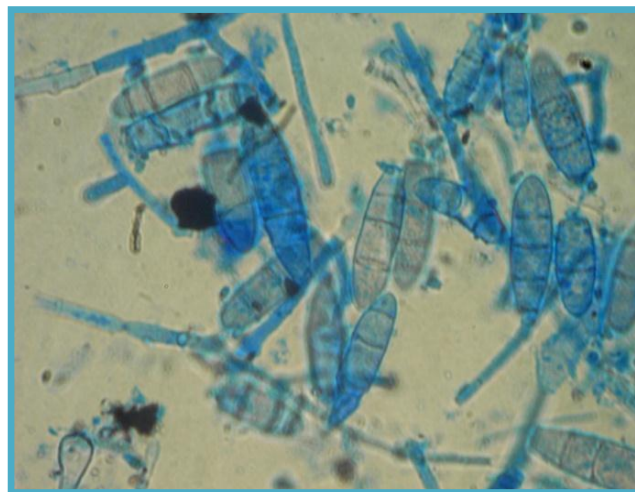
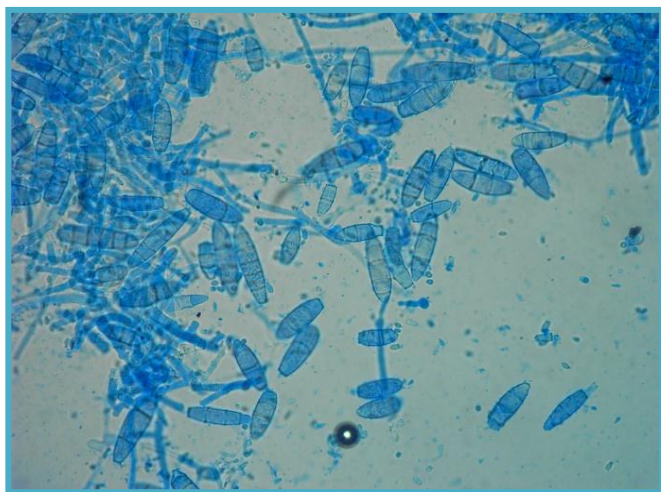


Photo 9 : Aspect microscopique des macroconidies en cocon de *Microsporium gypseum* au bleu de lactophénol, obj. × 40 (à gauche), et (à droite) [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV].

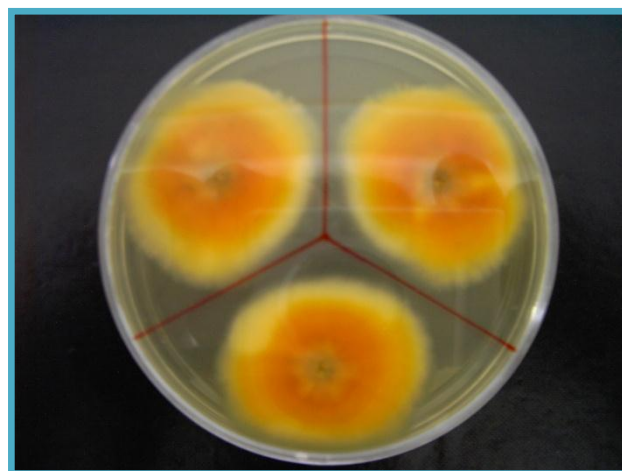
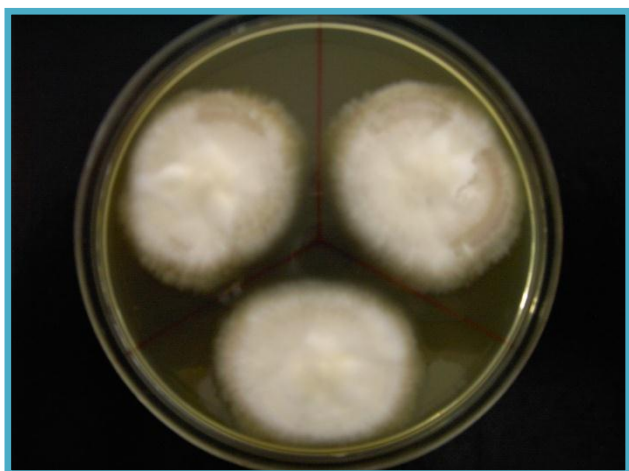


Photo 10 : Aspect macroscopique de *Trichophyton rubrum* sur milieu SC, obtenu par une technique de repiquage à l'aide de tracé, recto (à gauche), verso (à droite) [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV].

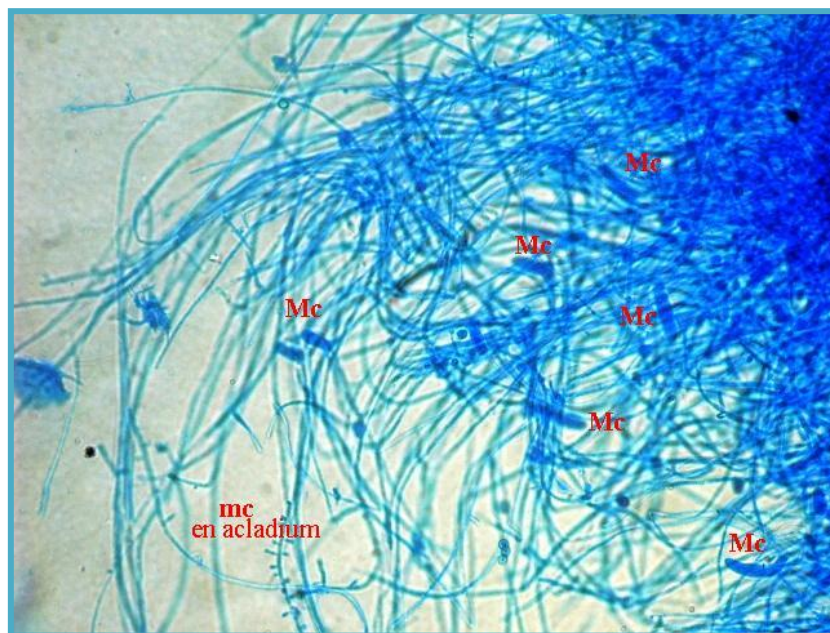


Photo 11 : Aspect macroscopique de *Trichophyton rubrum* avec des microconidies (**mc**) piriformes disposées en accladium, et des macroconidies (**Mc**) en forme de cigare ou de saucisse [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV].

II.2.2 Préparation et dénombrement des suspensions

II.2.2.1 Suspensions de Candida

Quelle que soit l'espèce de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, et *Candida glabrata*), la préparation des suspensions est identique. À partir d'une culture de 48 h, 2 ou 3 colonies de *Candida* sont mises en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile, en agitant suffisamment la suspension à l'aide de micropipette de manière à l'homogénéiser. Chaque suspension est ajustée à une valeur comprise entre 1,5 et 2.10^6 levures/ml après dénombrement sur cellule de Malassez.

II.2.2.2 Suspensions d'Aspergillus niger

Selon la littérature les isolats sont préparés dans du tampon phosphate salin/Tween-80 et ajustés à 1.10^5 unités formant colonies (UFC) /ml [32]. Dans notre étude, la suspension d'*Aspergillus niger* a été préparée de la manière suivante : A partir d'une culture de 7 j d'*Aspergillus niger* sur milieu au Malt, on racle 4 à 5 fois les têtes aspergillaires en surface de la culture par l'ensemenseur, qu'on met dans 4,9 ml d'eau physiologique chauffée. Les spores restent à la surface de la suspension, car elles sont hydrophobes. Pour résoudre ce problème nous avons ajouté 0,1 ml de Tween-80 (2%) préalablement chauffé, ce qui a facilité l'homogénéisation de la suspension. Enfin La suspension de spores est ajustée à 1.10^7 spores/ml après dénombrement sur cellule de Malassez.

II.2.2.3 Suspensions de dermatophytes

Nous avons essayé de préparer les dermatophytes en suspension à l'aide de l'ultrason. A cet effet, nous avons mis 5 colonies de chaque dermatophytes découpés par lame de bistouri, dans des tubes contenant 10 ml d'eau

physiologique. Ces tubes sont passés à la sonication dans l'ultrason (**Photo 12**) pendant 15min, la suspension obtenue était trouble avec des restes de fragments en culot.



Photo 12 : Appareil d'ultrason [Photo du LNCM].

Nous avons ensuite réalisé des cultures en ensemencant 100 μ l de chaque suspension dans le milieu Sabouraud Chloramphénicol. Après deux semaines d'incubation, la pousse était faible, voire absente dans certaines boites. Ceci était principalement dû à l'éclatement des filaments et macroconidies, confirmé par l'observation microscopique.

Compte tenu de la difficulté de mettre en suspension les dermatophytes, les tests ont été directement réalisés sur les fragments de colonies. Pour cela, nous avons mis en place une nouvelle technique de repiquage développée au sein du service de Parasitologie Mycologie de l'HMIMV, qui nous a permis d'entretenir et repiquer les isolats.

II.2.3 Techniques de mise en culture

Les techniques de culture diffèrent selon les espèces fongiques.

II.2.3.1 Technique d'ensemencement des suspensions préparées

Sur milieu solide (SC) : l'ensemencement est réalisé par étalement à l'aide de pipette Pasteur en râteau adaptée aux petites surfaces. Cette méthode concerne les isolats faciles à mettre en suspension : *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, et *Aspergillus niger*.

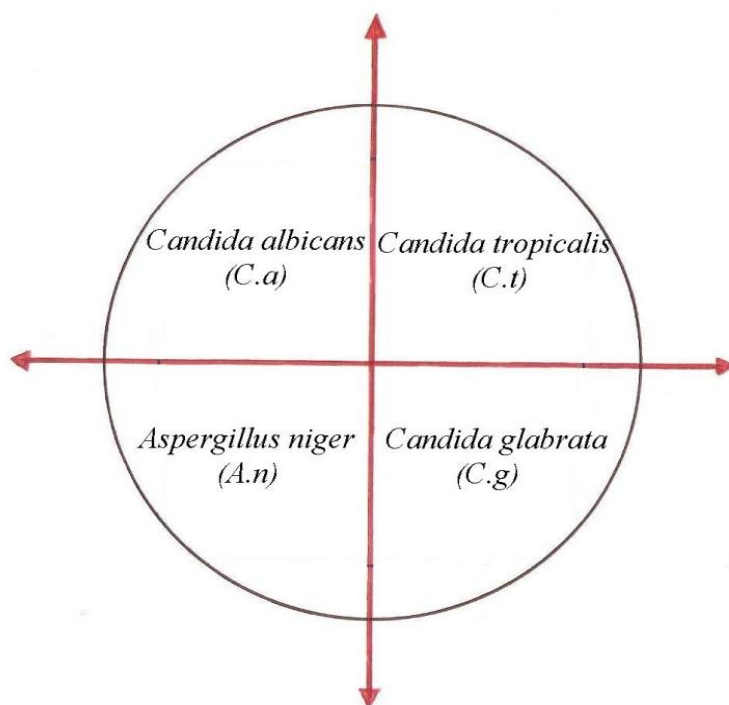


Figure 1: Tracé de repiquage (ensemencement) par l'étalement des boîtes de Pétri à quatre compartiments (Un étalement / compartiment)

Chaque compartiment est ensemencé par étalement de **20µl** à partir de la suspension correspondante (**Photo 13**), l'ensemencement doit être fait à l'aide de micropipette, sans jet d'air, afin d'éviter la contamination des autres compartiments de la même boîte.



Photo 13 : Préparation des suspensions de *Candida* et *Aspergillus niger*, et les pipettes Pasteur en râteau réservés pour l'étalement des suspensions.

Sur milieu liquide (SL) : les tubes à hémolyse contenant le milieu Sabouraud liquide sont ensemencés par **20 μ l** de chaque suspension correspondante, chaque tube contenant un volume final de 4 ml.

II.2.3.2 Technique de tracées pour le repiquage des dermatophytes

Les colonies de dermatophytes étant difficiles à mettre en suspension, nous les avons repiqués selon une nouvelle technique que nous avons établie au Laboratoire de Parasitologie Mycologie, et le repiquage varie selon qu'il s'agit de milieu solide ou liquide.

Préparation des colonies des dermatophytes à repiquer : La plupart des dermatophytes ont des colonies dures et difficiles à prélever. Leur repiquage nécessite une préparation réalisée de la manière suivante : des colonies de chaque dermatophyte (*M.c*, *M.g*, *T.r*) sont découpées finement sur une lame stérile contenue dans une boîte de Pétri en plastique pour éviter toute contamination (**Photo 14 et 15**).



Photo 14: Méthode de préparation des fragments de dermatophytes dans une boîte de Pétri stérile

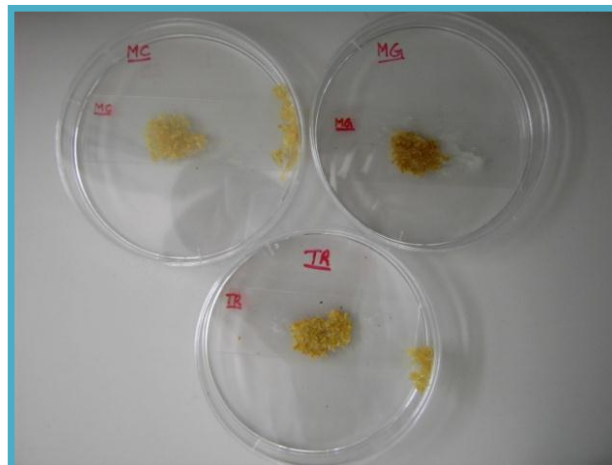


Photo 15: Colonies de (*M.c*, *M.g* et *T.r*) découpés en petits fragments fins et homogènes.

Repiquage des dermatophytes sur le milieu solide : Le repiquage des dermatophytes ne doit pas être arbitraire. Pour cela nous avons mis en place pour la première fois une technique de repiquage des dermatophytes à l'aide de tracés sur papier à quatre ou trois compartiments, qui nous permet d'obtenir une répartition uniforme et homogène dans toutes les boîtes de pétri. Ainsi, nous déposons sur un papier le couvercle inférieur de la boîte de Pétri, en traçant son périmètre. Nous avons par la suite divisé le cercle en trois compartiments égaux équivalents aux 3 dermatophytes à étudier (pour 4 dermatophytes on va utiliser le tracé de repiquage à quatre compartiments). L'utilisation de trois isolats dans la même boîte nous permet d'éviter le gaspillage du milieu de culture et du produit à tester. Nous avons utilisé un tracé à trois compartiments avec six points de repiquages par compartiment. Chaque boîte de pétri contenant le milieu SC, a ainsi été subdivisée selon ce tracé. Les fragments de colonies préalablement préparés sont ensuite déposés à la surface de la gélose au niveau des points de repiquage (**Figure 2**).

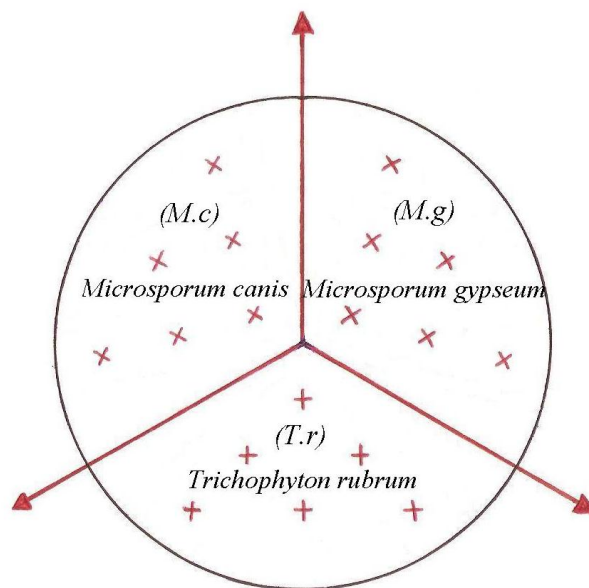


Figure 2: Tracé de repiquage des dermatophytes dans les boîtes de Pétri à trois compartiments, (Six repiquages par souche par compartiment)

Repiquage des dermatophytes sur le milieu liquide : Le repiquage est réalisé en immergeant 3 ou 4 petits fragments, prélevés par l'öse, directement dans le tube à hémolyse contenant un volume de 4 ml de milieu Sabouraud liquide.

II.3 Mise au point du protocole d'étude de l'activité in vitro des antifongiques témoins

II.3.1 Antifongiques témoins utilisés

Les antifongiques utilisés sont l'amphotéricine B (**AMB**), terbinafine (**TBF**), et ceux qui appartiennent à la famille des imidazolés : fluconazole (**FCZ**) et le nitrate d'isoconazole (**ICZ**).

II.3.2 Choix et préparation des milieux de culture utilisés

Deux milieux sont usuellement utilisés pour l'isolement des champignons : Sabouraud Chloramphénicol (SC) et Sabouraud Chloramphénicol Actidione (SCA). Le Chloramphénicol inhibe la pousse des bactéries et l'Actidione (Cycloheximide) inhibe la pousse des moisissures.

Pour notre étude nous avons choisi comme milieu de culture :

- Le milieu Sabouraud Chloramphénicol (SC) sans Actidione pour la recherche d'activité antifongique sur milieu solide.
- Le milieu Sabouraud Liquide (SL) sans Chloramphénicol, pour la recherche d'activité antifongique sur milieu liquide.

La préparation de ces milieux est détaillée en **annexe 6**.

II.3.3 Etude de la solubilité des différents antifongiques témoins

Le but de cette partie est de chercher le solvant qui peut solubiliser une masse maximale des différents produits sans saturation. A cet effet, nous avons consulté la solubilité des produits antifongiques témoins selon la pharmacopée européenne, et les données de solubilité selon la littérature. Nous avons réalisé un essai de solubilité de ces produits à différentes concentrations et dans différents solvants

Solubilité selon la pharmacopée européenne ^[51] :

Amphotéricine B : Soluble dans le DMSO et dans le propylène glycol, peu soluble dans le diméthylformamide, très peu soluble dans le méthanol, pratiquement insoluble dans l'alcool.

Fluconazole : Peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'acétone.

Nitrate d'Isoconazole : Très peu soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol, peu soluble dans l'éthanol à 96%,

Terbinafine : Peu soluble ou très peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol, peu soluble dans l'acétone.

Données de solubilité des produits témoins selon la littérature : Selon la littérature, différents solvants peuvent être utilisés pour solubiliser les produits antifongiques (Tableau 2).

Tableau 2: Solvants utilisés pour solubiliser les produits antifongiques selon la littérature.

Produits	Solvants utilisés	Concentrations finales des solutions mères	Références
Amphotéricine B	DMSO	1 mg/ml 1280 µg/ml 1,6 mg/ml	[1, 10, 27, 35, 37, 44, 46, 50]
Fluconazole	ED	1280 µg/ml	[10, 27, 35, 37, 44, 50]
	DMSO	6,4 mg/ml	[46]
Isoconazole	DMSO	1 mg/ml	[48]
Terbinafine	DMSO	1280 µg/ml	[35]

Essai de solubilité des produits à différentes concentrations et à différents solvants : Nous avons étudié la solubilité des quatre antifongiques témoins dans l'eau distillée stérile et le DMSO à trois concentrations différentes, dans le but de chercher la concentration maximale totalement soluble. La préparation d'une dilution d'un produit dans un solvant nécessite que ce produit y soit totalement soluble, s'il est insoluble ou partiellement soluble, on obtient une suspension non homogène.

Tableau 3: Résultats de la solubilité des produits antifongiques témoins dans l'eau distillée et le DMSO aux différentes concentrations.

Produits		Solvants	20,48 mg/ml	10,24 mg/ml	5,12 mg/ml
TEMOINS	AMB	EDS	Insoluble	Insoluble	Insoluble
		DMSO	Partiellement soluble (saturation)	Totalement soluble (chauffer et agiter)	Totalement soluble
	FCZ	EDS	Partiellement soluble ou très peu soluble	Partiellement soluble ou très peu soluble	Partiellement soluble ou Peu soluble
		DMSO	Totalement soluble	Totalement soluble	Totalement soluble
	ICZ	EDS	Insoluble	Insoluble	Insoluble
		DMSO	Totalement soluble	Totalement soluble	Totalement soluble
	TBF	EDS	Insoluble ou partiellement soluble	Peu soluble partiellement soluble	Peu soluble partiellement soluble
		DMSO	Totalement soluble	Totalement soluble	Totalement soluble

D'après les essais de solubilité, nous avons conclu que tous les produits ne sont pas solubles ou partiellement soluble dans l'eau distillée stérile (**EDS**) aux différentes concentrations testées. Par contre le **DMSO** solubilise tous les produits à la concentration de 20,48 mg/ml sauf pour l'AMB qui n'est pas soluble à cette concentration. Dans notre étude nous avons donc choisi de travailler avec une concentration de solution mère (DMSO + Antifongique) de 10,24 mg/ml et le DMSO comme solvant de dilution.

II.3.4 Miscibilité et compatibilité du diméthylsulfoxyde avec le milieu SC

Miscibilité : Le diméthylsulfoxyde (**DMSO**) est un solvant miscible à l'eau et à la plupart des liquides organiques ^[28]. Lorsqu'on ajoute ce solvant au milieu SC à l'état liquide ou au milieu Sabouraud liquide, le DMSO reste miscible, il n'y a pas séparation de phase ce qui permet une solubilisation des produits à étudier avant leur répartition homogène dans les milieux de culture.

Compatibilité : Nous avons étudié la compatibilité du milieu SC avec le DMSO, à savoir, la capacité du milieu de culture à garder son pouvoir gélifiant lorsqu'il est mélangé avec le DMSO. A cet effet nous avons préparé des milieux de culture SC à différentes proportions en DMSO dans les boîtes de Pétri selon le tableau suivant :

Tableau 4: Etude de la compatibilité de DMSO dans le milieu solide à différentes concentrations

Tubes à Essai	T	1	2	3	4	5	6
Milieu SC à l'état liquide (ml)	20	19,5	19	18	17	16	15
DMSO (ml)	0	0,5	1	2	3	4	5
Volume final dans les Boîtes de Pétri (ml)	20	20	20	20	20	20	20
DMSO dans le milieu SC solide en (%)	0 %	2,5 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %

Le milieu SC associé au DMSO contenu dans les tubes à essai et préparé à différents volumes (tubes 1 à 6) est bien agité au vortex et versé dans les boîtes de Pétri. Après refroidissement à température ambiante, les boîtes préparées sont comparées à un témoin (T). Il s'est avéré que le milieu SC a gardé son pouvoir gélifiant avec toutes les concentrations de DMSO utilisées, ce dernier ne pose donc aucun problème de compatibilité avec le milieu de culture utilisé.

II.3.5 Effet du diméthylsulfoxyde sur les isolats fongiques

Le DMSO est l'un des solvants organiques les plus puissants. Il est utilisé de manière commerciale depuis plus de quarante ans, c'est un solvant efficace pour un vaste éventail de substances organiques, y compris plusieurs polymères. Le DMSO dissout également plusieurs sels organiques, particulièrement les nitrates, cyanures et bicarbonates de métaux de transition ^[28]. La molécule de

DMSO contient un atome de soufre qui peut induire une certaine activité sur les champignons. Pour cela nous avons étudié son éventuel pouvoir inhibiteur sur les différents isolats, en déterminant la quantité du solvant pouvant être incorporée dans le milieu de culture sans générer d'activité antifongique. Ce test représente le témoin négatif nécessaire pour l'évaluation de notre protocole.

Méthode de dilution en milieu solide SC : 2 séries de dilutions de DMSO dans le milieu de culture SC ont été préparé à différents pourcentages comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5: Préparation de la dilution de DMSO à différentes proportions dans le milieu solide Sabouraud chloramphénicol.

N° des Tubes à essai	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Milieu SC à l'état liquide en (ml)	20	19,75	19,5	19,25	19	18,75	18,5	18,25	18	17,5	17	16,5	16
Volume de DMSO ajouté au milieu en (ml)	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,5	3	3,5	4
Volume final dans les boîtes de Pétri en (ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
% de DMSO dans le milieu SC (2 séries de boîtes)	0	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10	12,5	15	17,5	20

Le volume final de chaque mélange DMSO/SC (tubes 1 à 12) ainsi que le témoin (tube T₀) sont versé dans les boîtes de pétri avant la gélification (2 séries de 12 boîtes et 2 témoins T₀). On laisse refroidir le milieu coulé dans les boîtes pendant 24h à température ambiante.

La première série de boîtes de Pétri (T₀ et 1- 12) estensemencée successivement par les suspensions de (*C.a*, *C.t*, *C.g* et *A.n*) déjà préparées (20 µl pour chaque suspension), en utilisant le tracé à quatre compartiments (**figure 1**). La deuxième série de boîtes de Pétri (T₀ et 1- 12) estensemencée par les fragments de

colonies de dermatophytes par repiquage à l'aide d'un tracé à trois compartiments avec six points de repiquage (**figure 2**). Les boites sont ensuite incubées dans l'étuve à 28°C. La lecture des résultats est faite après 48h pour les levures du genre *Candida*, 72h pour *Aspergillus niger* et 14j pour les dermatophytes.

Méthode de dilution en milieu liquide Sabouraud liquide (SL) : 7 séries de dilutions de DMSO dans le milieu de culture SL ont été préparé à différents pourcentages comme indiqué dans le tableau 6.

Tableau 6: Préparation de la dilution de DMSO à différentes proportions dans le milieu Sabouraud Liquide.

N° des Tubes à hémolyse	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VOLUME de SL en (ml)	4	4	3,95	3,9	3,85	3,80	3,75	3,70	3,65	3,60	3,50	3,40	3,30	3,20
VOLUME de DMSO ajoute dans chaque tube en (ml)	0	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
VOLUME final dans chaque tube en (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
% de DMSO dans le milieu SL (7 séries de tubes)	0	0	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10	12,5	15	17,5	20

20µl de chaque suspension des différents isolats (*C.a*, *C.g*, *C.t*, *A.n*) ont été ajoutés successivement aux 4 séries de tubes (1 à 12 et T₀), sauf pour le témoin T₀' (qui n'a pas été ensemencé). Par ailleurs, 4 petits fragments de chaque colonie de dermatophyte (*M.c*, *M.g*, et *T.r*), ont été également immergés chacun dans une série de tubes (1 à 12 et T₀). Les tubes sont ensuite incubés dans l'étuve à 28°C. La lecture des résultats est faite après 48h pour les levures du genre *Candida*, 72h pour *Aspergillus niger* et 14j pour les dermatophytes.

II.3.6 Choix des dilutions à préparer

Nous avons choisi de travailler avec les mêmes concentrations qui figurent dans les bandelettes E-test ^[53], allant de 256 µg/ml jusqu'à 0,002 µg/ml avec la dilution au ½ (**Photo 16**).

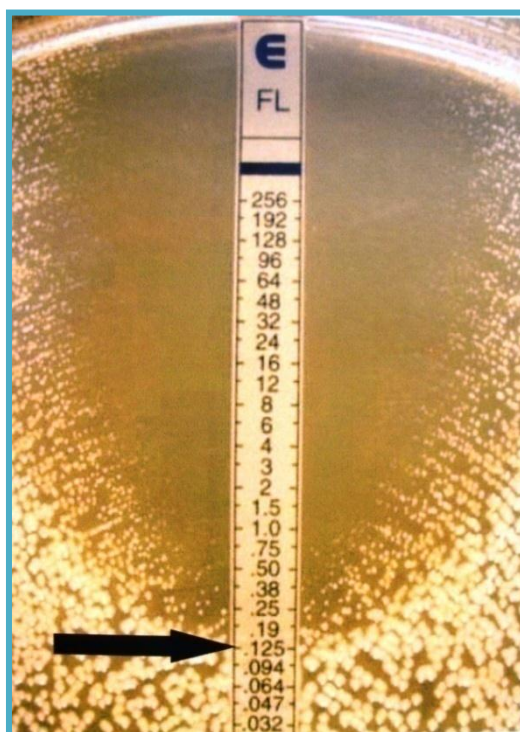


Photo 16: Bandelette E-test de Fluconazole [Photo du service de parasitologie mycologie, HMIMV]

A cet effet, nous avons proposé une méthode pour préparer nos produits avec les mêmes concentrations finales dans les milieux de culture, quelque soit la méthode utilisée (la méthode de dilution en milieu solide ou la méthode de dilution en milieu liquide). Toutes les pesées sont réalisées au Laboratoire National de Contrôle de Médicament en utilisant la balance de précision de l'ordre de 0,01mg.

Les différents calculs sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Calcul de la concentration de la solution mère à préparer.

	Concentration initiale de la solution mère à préparer (C_i)	Volume à prélever à partir de la solution mère selon la méthode utilisée	Volume final dans les milieux de culture selon la méthode utilisée	Concentration finale dans les milieux de culture les plus concentrés (C_f)
Méthode de dilution en milieu solide (SC)	10240 μ g/ml (10,24 mg/ml)	$V_p = 0,5$ ml	$V_f = 20$ ml	256 μ g/ml
Méthode de dilution en milieu liquide (SL)		$V_p' = 0,1$ ml	$V_f' = 4$ ml	

Méthode de réalisation de la dilution (Tableau 8) : La dilution finale à préparer que ce soit dans les boîtes de Pétri ou dans les tubes à hémolyse, a été faite en deux dilutions successives :

→ Une dilution verticale permet d'obtenir la dilution de $\frac{1}{2}$ de la solution mère dans le solvant.

→ Une dilution horizontale permet d'obtenir des concentrations finales dans les milieux de culture (boîtes de Pétri ou tubes à hémolyse) à partir de la dilution verticale.

Cette méthode permet de maintenir le volume à prélever constant à partir de différentes concentration de la dilution verticale, et par conséquent de ne pas dépasser 2,5% de solvant dans les milieux de culture et d'éviter l'effet inhibiteur induit par le DMSO.

Tableau 8: Méthode de préparation de la gamme de dilution des produits témoins antifongiques que se soit en milieu solide SC, ou en milieu liquide.

Dilution Horizontale					
Dilution Verticale	N° des tubes de dilution	Différentes Concentrations de la dilution 1/2 de la solution mère (C_i) en mg/ml	Volume à prélever à partir de chaque concentration selon la méthode utilisée en (ml)	Volume final dans les milieux de culture selon la méthode utilisée en (ml)	Concentrations finales dans les milieux de culture pour les deux méthodes en µg/ml
	18	10,24	V _p = 0,5	V _f = 20	256
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	17	5,12	V _p = 0,5	V _f = 20	128
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	16	2,56	V _p = 0,5	V _f = 20	64
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	15	1,28	V _p = 0,5	V _f = 20	32
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	14	0,64	V _p = 0,5	V _f = 20	16
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	13	0,32	V _p = 0,5	V _f = 20	8
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	12	0,16	V _p = 0,5	V _f = 20	4
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	11	0,08	V _p = 0,5	V _f = 20	2
			V _p ' = 0,1	V _f ' = 4	
	10	0,04	V _p = 0,5	V _f = 20	1
V _p ' = 0,1			V _f ' = 4		
9	0,02	V _p = 0,5	V _f = 20	0,5	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
8	0,01	V _p = 0,5	V _f = 20	0,25	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
7	0,005	V _p = 0,5	V _f = 20	0,125	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
6	0,0025	V _p = 0,5	V _f = 20	0,062	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
5	0,00125	V _p = 0,5	V _f = 20	0,031	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
4	0,000625	V _p = 0,5	V _f = 20	0,016	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
3	0,0003125	V _p = 0,5	V _f = 20	0,008	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
2	0,00015625	V _p = 0,5	V _f = 20	0,004	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		
1	0,000078	V _p = 0,5	V _f = 20	0,002	
		V _p ' = 0,1	V _f ' = 4		

Méthode sur milieu solide :
V_p = 0,5 ml : volume à prélever
V_f = 20 ml : volume final

Méthode sur milieu liquide :
V_p' = 0,1 ml : volume à prélever
V_f' = 4ml : volume final

II.4 Etude de l'activité in vitro des antifongiques témoins

Dans cette partie nous avons réalisé l'évaluation de l'activité des produits antifongiques (AMB, FCZ, ICZ, TBF) utilisés comme témoins dans cette étude. La préparation de la solution mère de chaque produit témoin à 10,24 mg/ml dans 6ml de DMSO, avec un volume final de 6ml.

II.4.1 Méthode de dilution en milieu solide

Tableau 9: Préparation de la gamme de dilution des antifongiques témoins dans les boîtes de pétri contenant le milieu SC.

Tubes à Essai	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Milieu Sabouraud Chloramphénicol (SC) à l'état liquide en (ml)	19,5	20	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
Volume à prélever en (ml) des différentes concentrations de la dilution ½ de la SM (Tableau 8)	0,5 (Solvent)	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume finale dans chaque boîte de Pétri en (ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Concentration de l'antifongique témoin dans chaque boîte de pétri en (µg/ml)	2,5% (Solvent)	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256

Chaque tube homogénéisé au vortex est immédiatement coulé dans la boîte de Pétri correspondante (**Figure 3**). On laisse refroidir le milieu coulé dans les boîtes de Pétri pendant 24h à la température ambiante. On prépare ensuite les suspensions de *C.a*, *C.t*, *C.g*, *A.n* (**voir page 15 et Photos 13**) et les colonies de dermatophytes (*M.c*, *M.g*, et *T.r*) (**Photos 14 et 15**). Le tube T₀' contient le Sabouraud Chloramphénicol à l'état liquide et le DMSO, il témoigne de l'absence d'activité antifongique du DMSO, c'est notre témoin négatif. Le tube

T₀ contient uniquement le SC à l'état liquide, il constitue notre témoin positif (il doit y avoir pousse après ensemencement des champignons).

La première série de boîtes de Pétri (T₀' , T₀, et 1-18) est ensemencée successivement par les suspensions de *C.a*, *C.t*, *C.g* et *A.n* (20 µl pour chaque suspension), en utilisant le tracé à quatre compartiments (**figure 1**). La deuxième série de boîtes de Pétri (T₀' , T₀, et 1-18) est ensemencée par les fragments de colonies de dermatophytes par repiquage à l'aide d'un tracé à trois compartiments avec six points de repiquage (**figure 2**). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C. La lecture des résultats est faite après 48h pour les levures du genre *Candida*, 72h pour *Aspergillus niger* et 14j pour les dermatophytes.

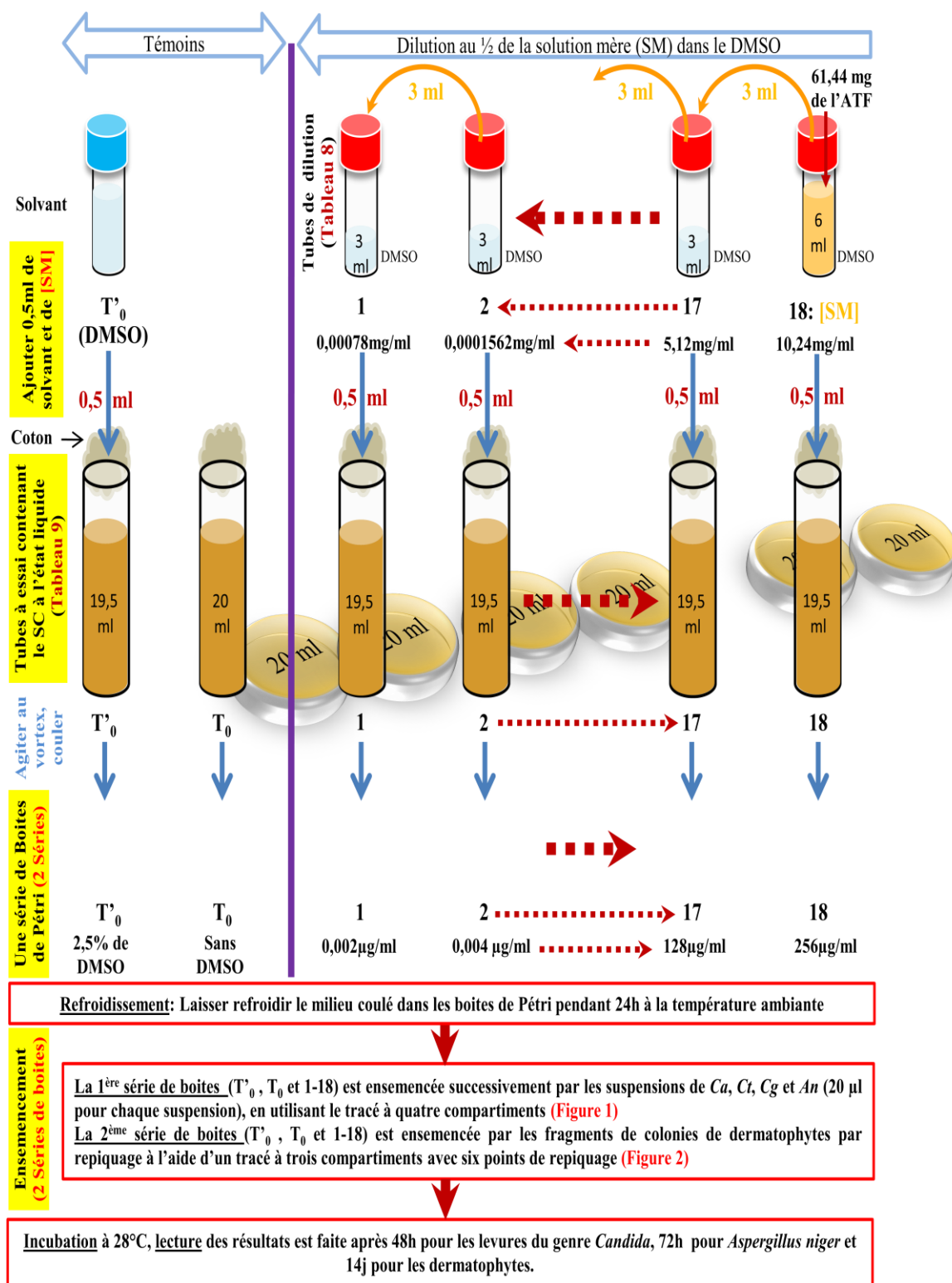


Figure 3 : Schéma explicatif de la méthode de dilution des antifongiques (ATF) témoins en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

II.4.2 Méthode de dilution en milieu liquide

Tableau 10: Préparation de la gamme de dilution des antifongiques témoins dans les tubes à hémolyse contenant le milieu Sabouraud liquide.

Tubes à hémolyse en verre	T ₀ ''	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Milieu Sabouraud Liquide (SL) (ml)	4	3,9	4	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Volume à prélever en (ml) des différentes concentrations de la dilution ½ de la SM (Tableau 8)	0	0,1 (Solvant)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Volume final dans chaque tube à hémolyse en (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentration de l'antifongique témoin dans chaque tube à hémolyse en (µg/ml) (7 séries de tubes)	0	2,5% (Solvant)	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256

Chaque tube est homogénéisé au vortex. On prépare ensuite les suspensions de *C.a*, *C.t*, *C.g*, *A.n* et les colonies de dermatophytes (*M.c*, *M.g*, et *T.r*). Chaque tube (T₀, T₀' et de 1 à 18) est ensuiteensemencé avec 20 µl de la suspension de chaque champignon ou avec quelques fragments de colonies de dermatophytes. Le tube T₀'' ne contient que le Sabouraud liquide et il n'est pasensemencé, il témoigne de la stérilité du milieu de culture. Le tube T₀' contient le Sabouraud liquide et le DMSO, il témoigne de l'absence d'activité antifongique du DMSO, c'est notre témoin négatif. Le tube T₀ contient uniquement le Sabouraud liquide, il constitue notre témoin positif (il doit y avoir pousse après ensemencement des champignons). Les tubes sont ensuite incubés à 28°C. La lecture des résultats est faite après 48h pour les levures du genre *Candida*, 72h pour *Aspergillus niger* et 14j pour les dermatophytes (**Figure 4**). A noter que le volume d'ensemencement (20µl) n'a pas été tenu en compte au cours de la dilution finale dans le milieu liquide.

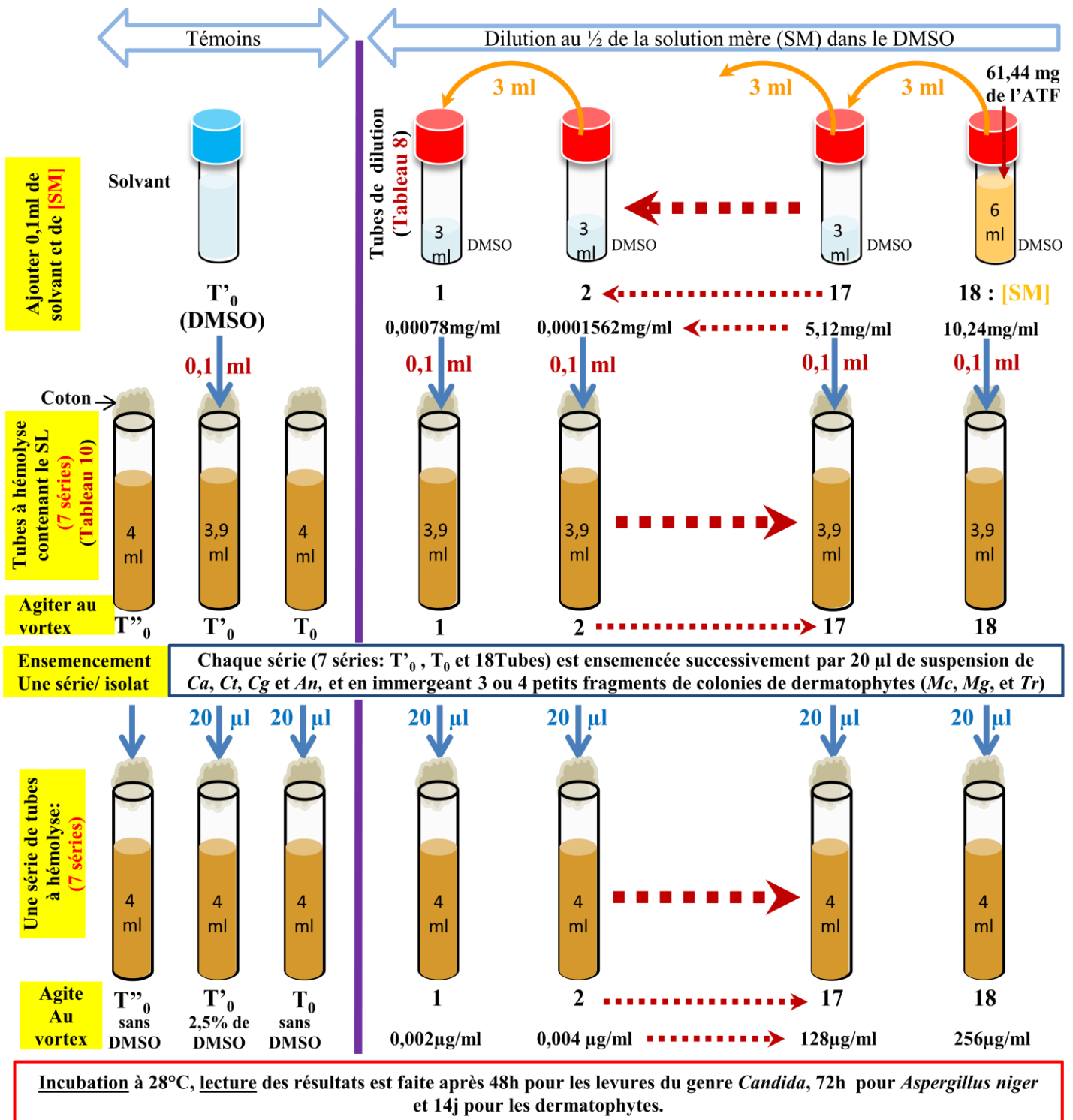


Figure 4: Schéma explicatif de la méthode de dilution des antifongiques (ATF) témoins en milieu Sabouraud liquide dans les tubes à hémolyse.

II.5 Etude de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles

II.5.1 Méthode des puits dans le milieu de culture

Préparation des boîtes : Après fluidification du milieu SC au bain-marie à 50°C, on coule de façon stérile un volume de 20 ml de ce milieu dans des boîtes de diamètre 90 mm, on laisse refroidir à température ambiante pendant 24h pour permettre une meilleur solidification du milieu dans les boites de pétri (**Figure 5**).

Ensemencement par inondation : L'ensemencement est fait à partir des suspensions de levures et d'*Aspergillus niger* préparées, sous un volume de 5 ml d'eau physiologique stérile, de telle façon à avoir une suspension de levures ajustée à 1,5 à 2.10⁶ levures/ml et 1.10⁷ spores d'*Aspergillus*/ml (**voir page 15**). Après avoir rejeté l'excès de liquide, la boîte de Pétri est maintenue inclinée à 45° et le liquide de l'inoculum collecté est aspiré à la micropipette et jeté. Un séchage, 30 min à 37° dans l'étuve, avec la boîte semi ouverte est nécessaire avant la création des puits dans la gélose à l'aide de l'emporte pièce. Il faut signaler que nous avons ensemencé 2 boites par suspension (2 huiles essentielles par boite), ce qui nous donne un total de 8 boites pour les 4 champignons (levures et *Aspergillus niger*) pour l'essai des huiles essentielles. Nous avons également préparé 8 boites qui constituent les témoins.

Création des puits dans la gélose à l'aide de l'emporte pièce en utilisant la technique des tracées : On utilise le tracé de repiquage à quatre compartiments sur lequel on dépose la boite de pétri, à l'aide l'emporte pièce stérile, on applique dans la gélose un puit de 6 mm de diamètre dans chaque compartiment, au total 4 puits par boite.

Remplissage des puits :

- 4 boîtes témoins : chacun des 4 puits est rempli avec un volume de **25 μ l** à partir de chaque solution mère des 4 produits antifongiques témoins à la concentration de 10,24 mg/ml (ce volume correspond à une charge de puit de **256 μ g**). Ces boîtes servent à vérifier que les isolats sont sensibles aux antifongiques usuels.

- 4 boîtes témoins à 4 puits contenant chacun **25 μ l** de solvant **DMSO** seul. Ces boîtes servent à vérifier que le DMSO à ce volume n'a pas d'activité antifongique.

Le volume de prise à 25 μ l est calculé comme suit :

10240 μ g (10,24 mg) \rightarrow 1000 μ l

256 μ g \rightarrow X μ l \Rightarrow X = **25 μ l**

- Essai (8 boîtes) : pour les deux huiles essentielles, nous avons utilisé deux volumes différents **32 μ l** et **64 μ l** par souche dans la même boîte (**Photo 17**).

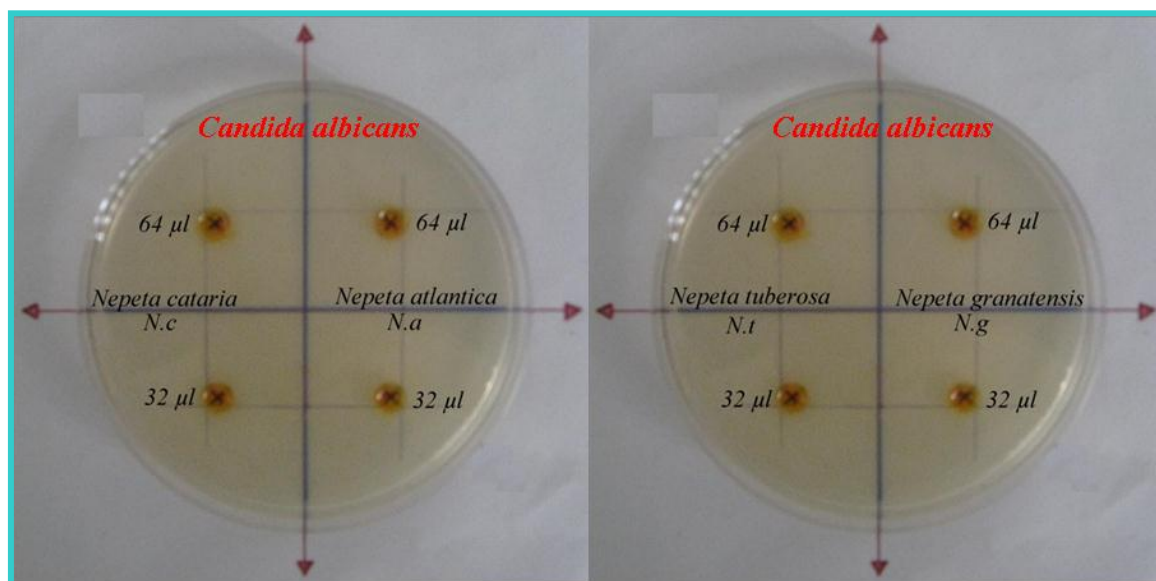


Photo 17: Méthode des puits dans la gélose utilisant des huiles essentielles de *N.c*, *N.a*, *N.t* et *N.g* à deux charges différentes 32 μ l et 64 μ l dans deux boîtes pour l'isolat de *Candida albicans*.

On laisse pré-diffuser les produits (antifongiques et HE) 30 min à température ambiante, puis on place les boîtes à l'étuve (28°C) pendant 48h pour les *Candida*, et 4 jours pour l'*Aspergillus niger*.

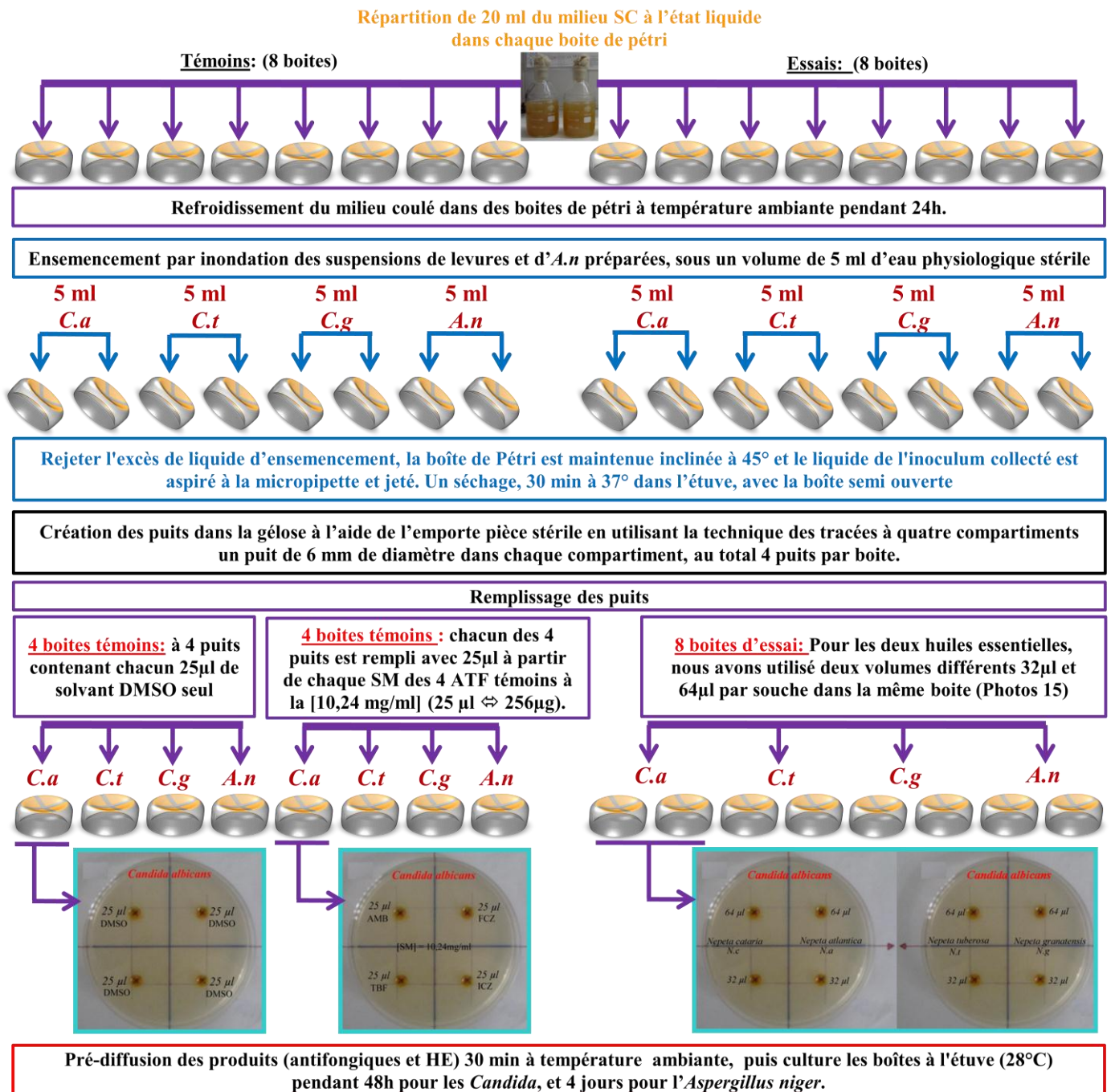


Figure 5 : Schéma explicatif de la méthode des puits dans la gélose de (SC) dans des boîtes de pétri.

II.5.2 Méthode de dilution en milieu solide :

Tableau 11: Dilution (v/v) des huiles essentielles dans le milieu Sabouraud chloramphénicol contenant 2% de Tween 80.

Boîtes de Pétri	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Milieu SC à 2% Tween 80 en (ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Volume de SC à 2% Tween 80 à éliminer de chaque tube en (µl)	0	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320	640	1280
Volume d'H.E ajouté à chaque tube en (µl)	0	1,25	2,5	5	10	20	40	80	160	320	640	1280
Concentration d'H.E chaque boîte de Pétri en (µl/ml)	0	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64

Les HE sont incorporées chacune dans le milieu Sabouraud Chloramphénicol à 2% de Tween 80 (SCT80/2%) (**Figure 6**), en cours de refroidissement afin d'obtenir des dilutions de 64µl/ml à 0,062µl/ml dans un volume final de 20ml dans les boîtes de pétri. Un témoin contenant seulement le milieu (SCT80/2%) sans HE est également réalisé pour mettre en évidence l'absence d'activité antifongique du Tween 80. L'ensemencement et le repiquage sont faits sur des boîtes sèches afin d'éviter toute contamination inter-espèce dans la même boîte. Dans la 1^{ère} série de boîtes (12), on utilise trois isolats de *Candida* (*C.a*, *C.t*, *C.g*) et l'*Aspergillus niger* (*A.n*) dans la même boîte avec un tracé de repiquage à quatre compartiments, le volume d'ensemencement est de **20µl** à partir de chaque suspension qui sera étalé à la surface de chaque compartiment correspondant. Les durées et les températures d'incubation sont de 48h pour les *Candida*, et 4 j pour l'*Aspergillus* à 28°C.

Dans la 2^{ème} série (12), les trois isolats de dermatophytes (*M.c*, *M.g*, *T.r*) sont repiquées dans la même boîte à l'aide d'un tracé de repiquage à trois

compartiments, avec 6 points de repiquage par compartiment, chaque colonie de dermatophytes est découpée en petits fragments, qui seront repiqués au niveau des 6 points de repiquages de chaque compartiment, l'incubation est faite à 28°C pendant 14j.

La concentration minimale inhibitrice (**CMI**) est la plus faible concentration d'huile essentielle en (**µl/ml**) inhibant toute culture visible à l'œil nu après la durée de culture à 28°C précisée pour chaque isolat.

Tableau 12: Méthode de dilution des huiles essentielles pour les deux séries de dilution dans le milieu Sabouraud chloramphénicol contenant Tween 80 à 2%.

Boîtes de Pétri	[C] en µl/ml	Série 1 (C.A, C.T, C.G, AN) Volume de prise/ Volume total de la boîte	Série 2 (M.C, M.G, T.R) Volume de prise/ Volume total de la boîte
T	0	0	0
1	0,062	1,25 µl /20ml	1,25 µl /20ml
2	0,125	2,5 µl /20ml	2,5 µl /20ml
3	0,25	5 µl /20ml	5 µl /20ml
4	0,5	10 µl /20ml	10 µl /20ml
5	1	20 µl /20ml	20 µl /20ml
6	2	40 µl /20ml	40 µl /20ml
7	4	80 µl /20ml	80 µl /20ml
8	8	160 µl /20ml	160 µl /20ml
9	16	320 µl /20ml	320 µl /20ml
10	32	640 µl /20ml	640 µl /20ml
11	64	1280 µl /20ml	1280 µl /20ml

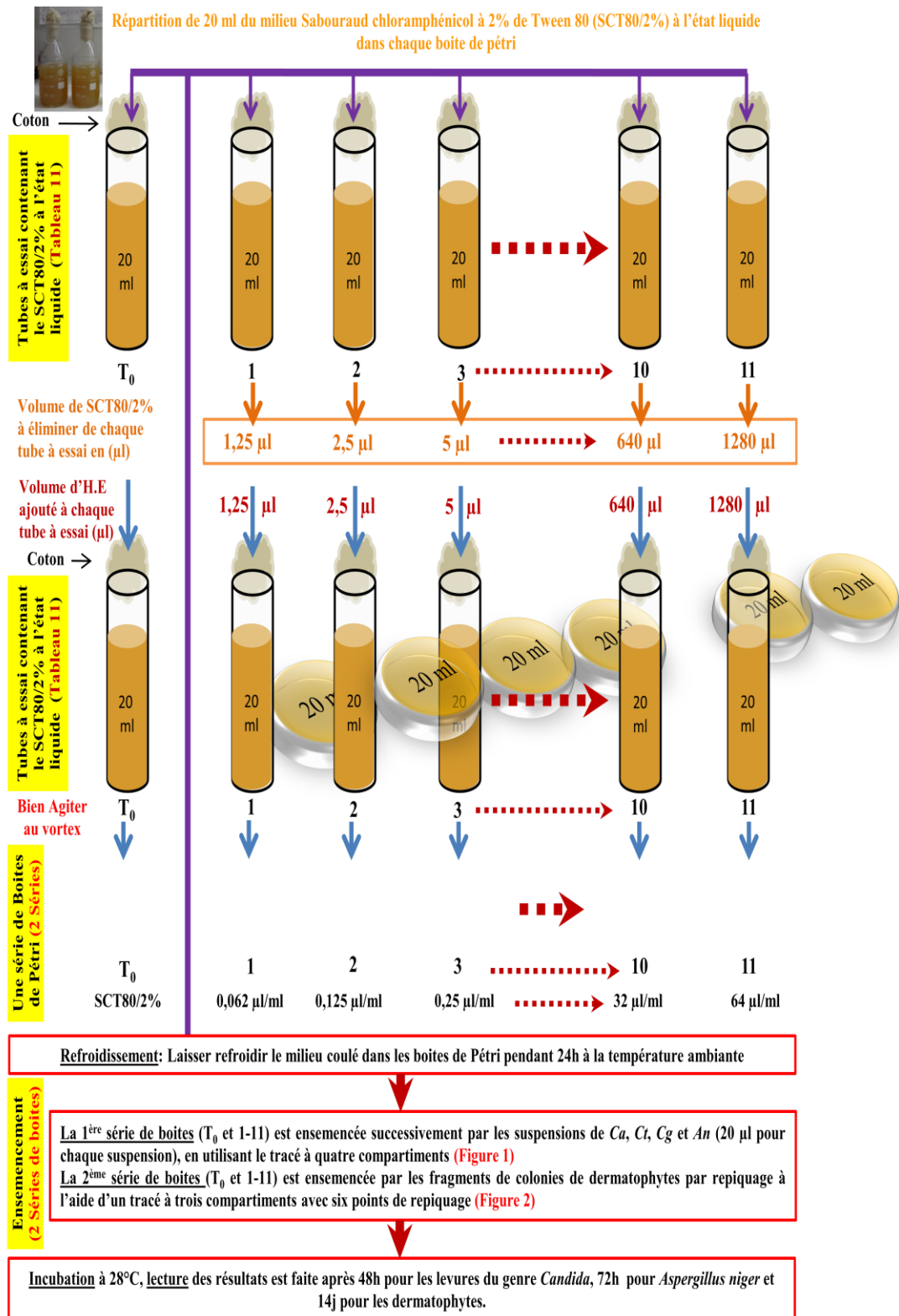


Figure 6: Schéma explicatif de la méthode de dilution des antifongiques (ATF) témoins en milieu Sabouraud liquide dans les tubes à hémolyse.

III. RESULTATS

III.1 Composition chimique des huiles essentielles des quatre espèces du genre *Nepeta*

Tableau 13: Compositions chimiques de différentes huiles essentielles de quatre espèces de genre *Nepeta* du Maroc obtenus par l'entraînement à la vapeur d'eau (EVE).

Temps de rétention Tr (min)	Identification	<i>Nepeta tuberosa</i>	<i>Nepeta atlantica</i>	<i>Nepeta granatensis</i>	<i>Nepeta cataria</i>
6.32	<i>α-pinène</i>	1.26	1.10	6.32	0.41
6.95	<i>β-pinène</i>	0.87	1.11	2.28	0.88
8.36	<i>Camphène</i>	0.29	1.10	1.07	0.92
11.97	<i>Eucalyptol</i>	1.19	1.08	23.98	0.50
12.05	<i>Phellandrène</i>	0.61	1.09	5.79	0.23
17.43	<i>Terpinène</i>	0.89	1.08	0.50	4.23
20.07	<i>Sabinène</i>	0.60	0.21	0.52	0.19
20.74	<i>p-cymène</i>	0.88	0.33	3.79	0.17
23.77	<i>Limonène</i>	0.51	0.23	0.34	4.09
24.21	<i>Menthone</i>	0.37	0.22	0.66	0.19
25.29	<i>Thujone</i>	0.37	0.12	0.59	0.40
27.72	<i>Bornéol</i>	0.60	0.11	0.65	0.28
28.12	<i>Acétate de linalyle</i>	0.43	0.54	1.37	0.16
30.48	<i>Menthol</i>	1.57	0.63	0.36	0.22
32.88	<i>Linalool</i>	0.53	0.57	1.40	0.36
33.87	<i>Pulegone</i>	0.89	0.40	1.56	0.21
34.62	<i>Thymol</i>	0.57	0.77	0.93	1.26
35.06	<i>Terpineol</i>	0.54	0.57	0.47	0.25
36.49	<i>Citronellol</i>	0.59	0.82	0.65	0.16
36.90	<i>4αα, 7α, 7β-nepetalactone</i>	76.87	71.40	39.44	77.43
37.23	<i>Dihydronepetalactone</i>	5.96	3.08	2.80	4.96
38.96	<i>Eugenol methylether</i>	0.77	0.86	0.93	0.14
40.83	<i>isoeugenol methylether</i>	0.63	0.54	0.65	0.36
43.61	<i>Caryophyllène</i>	0.67	8.22	1.53	0.16
46.93	<i>Curcumène</i>	0.72	1.29	0.87	0.56
58.35	<i>Farnésol</i>	0.82	2.50	0.55	0.91

III.2 Structure du composé majoritaire nepetalactone

Par combinaison des méthodes spectroscopiques (IR ; RMN, ^1H , ^{13}C ; SM) et chromatographiques (CCM ; GC/MS) (Annexes 7, 8, 9, 10), nous avons pu établir la structure du constituant principal du genre *Nepeta* comme étant un iridoïde type lactonique sous forme d'un stéréo-isomère à l'état pur : **4a α , 7a, 7a β - nepetalactone (Figure 3).**

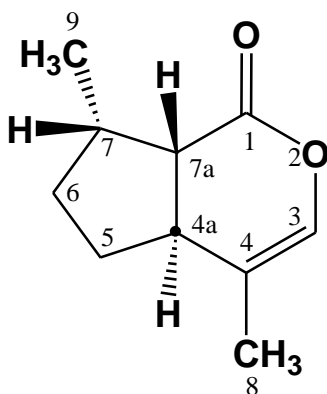


Figure 7 : Structure du constituant principal du genre *Nepeta* **4a α , 7a, 7a β -nepetalactone**

Le stéréo-isomère (**Figure 7**) a montré en spectroscopie **IR**, les bandes suivantes:

- Une bande de vibration à 1765 cm^{-1} , caractéristique d'un carbonyle lactonique.
- Une bande de vibration à 1662 cm^{-1} correspondant à la double liaison.
- Des bandes de vibration caractéristiques de l'entité C-O-C apparaissant entre 1000 cm^{-1} et 1140 cm^{-1} .

La **RMN** du proton du stéréo-isomère (**Figure 7**) fournit un spectre contenant les signaux suivants: (**Annexe 7**)

- Un doublet à 1,10 ppm intégrant 3 protons du méthyle en **C₉**.
- Un singulet à 1,71 ppm caractéristique d'un méthyle éthylénique en **C₈**.

- Le proton éthylénique en C₃ donne un singulet à 6,23 ppm.
- Les protons liés aux carbones saturés cyclopentaniques, résonnent dans la région de 2 ppm à 2,5 ppm.

Les données spectroscopiques de la RMN¹³C (**Annexe 8**) d'une part, et le pouvoir rotatoire d'autre part, apportent plus de renseignements sur la stéréochimie de notre échantillon. En effet, les différentes investigations sur les iridoïdes lactoniques ^[21] montrent que la nepetalactone peut se présenter sous forme de trois stéréo-isomères [A], [B] et [C] (**Figure 8**) grâce aux différentes positions stéréochimiques des hydrogènes situés dans la jonction bicyclique 4a et 7a. Les deux stéréo-isomères [A] et [C] n'ont pas été décelés dans nos échantillons ^[20, 21, 40, 42, 45, 56, 57].

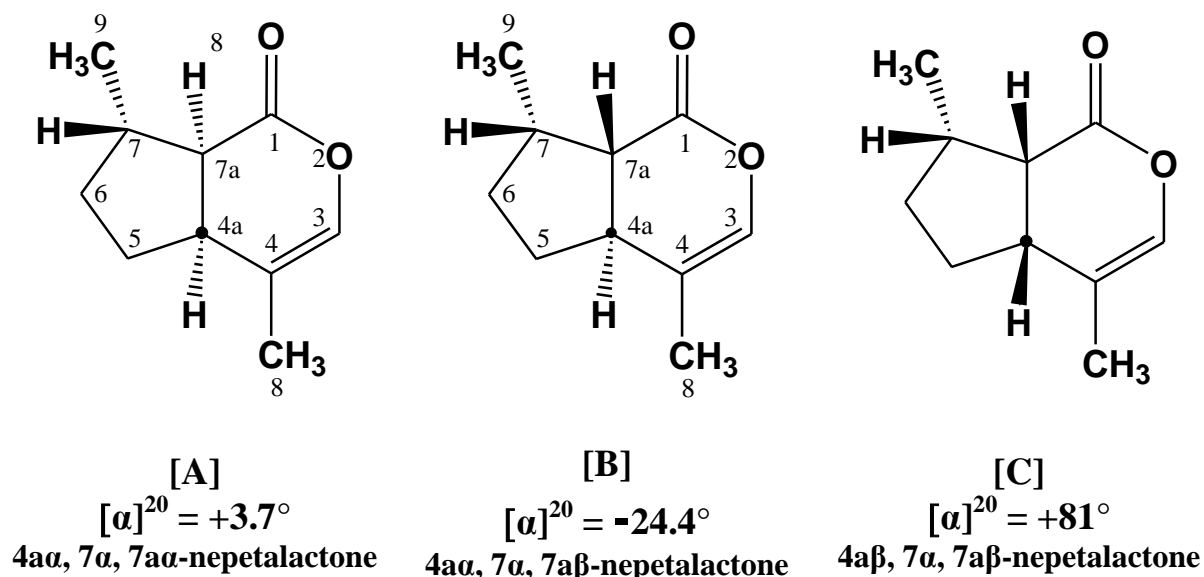


Figure 8 : Structure de trois stéréo-isomères [A], [B] et [C] grâce aux différentes positions stéréochimiques des hydrogènes situés dans la jonction bicyclique 4a et 7a.

Les trois stéréo-isomères sont très différents les uns des autres quand on regarde leurs pouvoirs rotatoires spécifiques.

Pour notre part, nous avons soumis notre échantillon isolé sous l'action d'une lumière polarisée du doublet D du sodium à 20°C dans le chloroforme. Notre échantillon a manifesté un pouvoir rotatoire spécifique de : $[\alpha]_D^{20} = -24.4^\circ$ (C= 6,2 ; CHCl₃). Ce résultat conforte la présence du stéréo-isomère [B] dans notre huile essentielle et absence des stéréo-isomères [A] et [C] dont les pouvoirs rotatoires spécifiques sont respectivement de + 3,7° et + 81°.

Outre le pouvoir rotatoire, le stéréo-isomère [B] a été parfaitement identifié comme tel grâce aux données de la RMN¹³C regroupées ci-dessous (**Annexe 8**) :

C ₁ = 170, 21 ppm	C ₆ = 29, 99 ppm
C ₃ = 135, 88 ppm	C ₇ = 32, 02 ppm
C ₄ = 120, 44 ppm	C _{7a} = 49, 11 ppm
C _{4a} = 37, 33 ppm	C ₈ = 14, 26 ppm
C ₅ = 26, 12 ppm	C ₉ = 17, 66 ppm

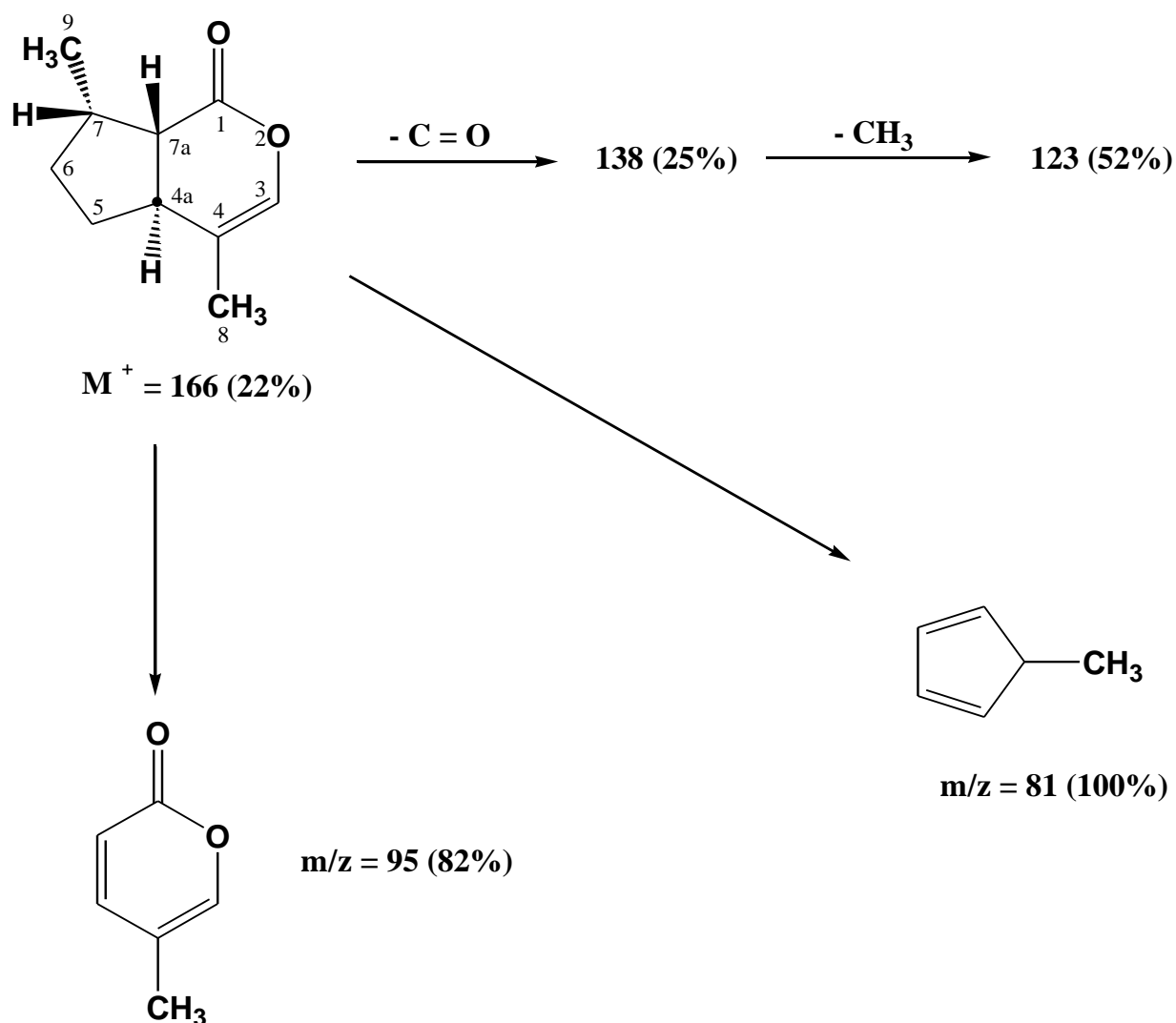
Les différences entre les trois stéréo-isomères en RMN ¹³C se situent surtout au niveau des carbones suivants :

	[A]	[B]	[C]
C ₄	115,1	120	115,4
C _{4a}	40,7	37,3	39,4
C ₅	30,9	26,1	30,4
C ₆	33,0	30,0	32,7
C ₇	39,7	32,1	38,3

On remarque que ces carbones résonnent à des champs forts dans le stéréo-isomère [B] à l'exception de C₄, qui connaît un léger déblindage, par rapport à ceux dans [A] et [C].

Enfin, la spectrométrie de masse (**Annexe : 10**) nous a fourni un spectre montrant la présence du pic moléculaire à M⁺ =166 correspondant à la masse moléculaire de notre iridoïde lactonique. On note aussi un pic parent à m/z = 81

correspondant à la formation d'un cyclopentadiène stable. Le pic à $m/z = 95$, correspond au fragment lactonique dans un cycle à 6 chaînons entièrement conjugué, stable, ce qui prouve son abondance à 82 %. L'ensemble des fragmentations observées est regroupé dans le schéma suivant.



III.3 Mise au point du protocole d'étude de l'activité in vitro des antifongiques témoins

Effet du DMSO sur les différents isolats fongiques testés : Après la durée d'incubation qui correspond à chaque isolat fongique la lecture des résultats est réalisée :

→+++ : Pas d'inhibition (pousse de colonies sur milieu solide ou trouble pour le milieu liquide).

→ ++- ou +±- ou +- - : inhibition partielle selon leur intensité.

→- - - : inhibition totale.

Résultat du DMSO en milieu solide

Tableau 14: Evaluation de l'effet inhibiteur de DMSO en (%) dans le milieu solide sur les différents isolats fongiques

N° des Tubes à essai	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
% de DMSO	0	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10	12,5	15	17,5	20
<i>Candida albicans</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+-	---	---	---	---	---
<i>Candida tropicalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+-	---	---	---	---
<i>Candida glabrata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+-	---	---	---	---
<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+-	+-	---	---	---	---
<i>Microsporum canis</i>	+++	+++	+++	+++	+-	+-	+-	---	---	---	---	---	---
<i>Microsporum gypseum</i>	+++	+++	+++	+-	+-	+-	---	---	---	---	---	---	---
<i>Trichophyton rubrum</i>	+++	+++	+++	+-	+-	---	---	---	---	---	---	---	---

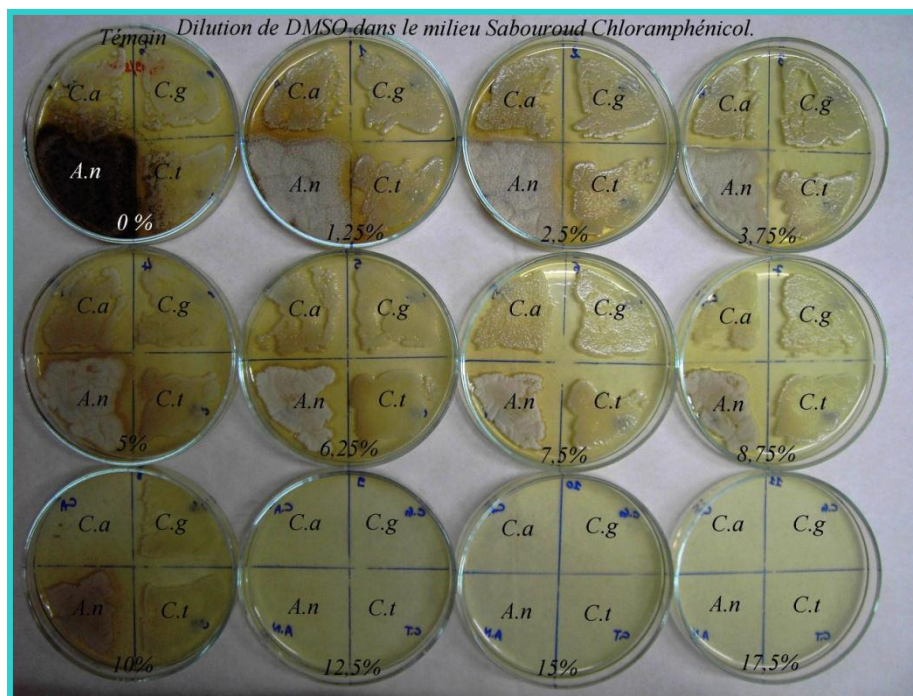


Photo 18: Effet de DMSO sur les isolats fongiques de (*C.a* ; *C.t*; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide (SC).

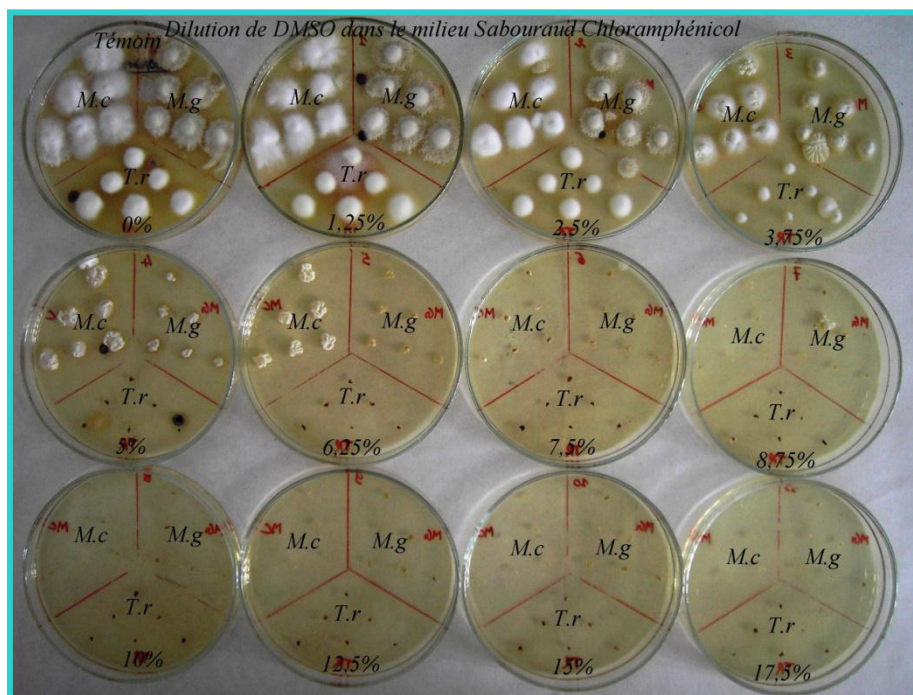


Photo 19: Effet de DMSO sur les isolats fongiques de (*M.c*; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide (SC).

Résultat de DMSO en milieu liquide

Tableau 15: Evaluation de l'effet inhibiteur de DMSO en (%) dans le milieu liquide sur les différents isolats fongiques

N° des Tubes à hémolyse	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
% de DMSO	0	0	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10	12,5	15	17,5	20
<i>Candida albicans</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+-	---	---	---	---	---
<i>Candida tropicalis</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+-	---	---	---	---
<i>Candida glabrata</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+-	---	---	---	---
<i>Aspergillus niger</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+-	+-	---	---	---	---
<i>Microsporum canis</i>	-	+++	+++	+++	+++	++	+-	+-	---	---	---	---	---	---
<i>Microsporum gypseum</i>	-	+++	+++	+++	+++	++	+-	---	---	---	---	---	---	---
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	+++	+++	+++	++	++	---	---	---	---	---	---	---	---

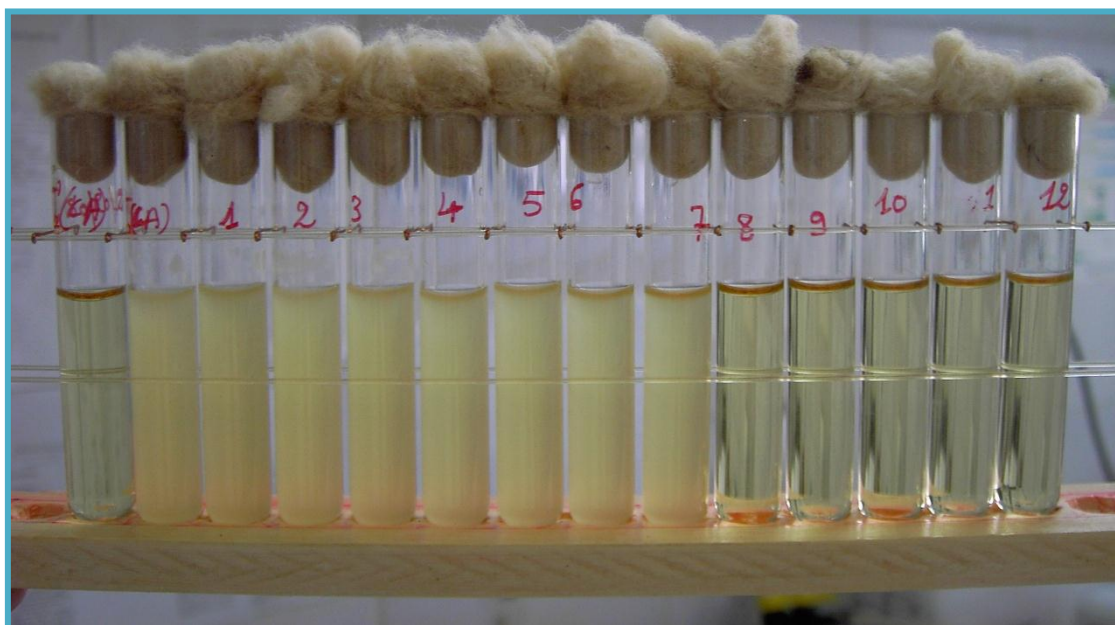


Photo 20 : Effet de DMSO sur le *Candida albicans* par la méthode de dilution en milieu liquide.



Photo 21: Effet de DMSO sur *Aspergillus niger* par la méthode de dilution en milieu liquide.



Photo 22: Effet de DMSO sur le *Microsporium canis* par la méthode de dilution en milieu liquide.

L'étude de l'effet du DMSO sur les différents isolats fongiques nous a permis de d'une part de vérifier que ce solvant est dénué de toute activité antifongique et d'autre part de choisir le pourcentage de solvant à incorporer au milieu de culture sans qu'il y ait une inhibition de la pousse des champignons. Ce pourcentage dans notre étude a été fixé à **2,5%** DMSO (tableau 13 et 14, tube N° 2). Ce pourcentage correspond à un volume de prélèvement de 0,5 ml à partir de chaque dilution de la solution mère pour la méthode de dilution en milieu solide, et de 0,1 ml pour la méthode de dilution en milieu liquide.

Etude de la solubilité des différents antifongiques témoins :

Calcul de la concentration de la solution mère à préparer :

Méthode en milieu solide

C_f : Concentration finale dans la boîte de Pétri la plus concentrée = **256 $\mu\text{g/ml}$** .

V_f : Volume final dans chaque boîte de Pétri = **20ml**.

V_p : Volume à prélever à partir de la solution mère = **0,5 ml**

C_i : Concentration initiale de la solution mère à préparer = ?

$$C_i \times V_p = C_f \times V_f \Rightarrow C_i = 256 \times 20 / 0,5 = 10240 \mu\text{g/ml}$$

$$C_i = 10,24 \text{ mg/ml}$$

Méthode de milieu liquide

C_f : Concentration finale dans le tube à hémolyse le plus concentré = **256 $\mu\text{g/ml}$** .

V_f' : Volume final dans chaque tube à hémolyse = **4ml**.

V_p' : Volume à prélever à partir de la solution mère = **0,1 ml**.

C_i : Concentration initiale de la solution mère à préparer = ?

$$C_i \times V_p' = C_f \times V_f' \Rightarrow C_i = 256 \times 4 / 0,1 = 10240 \mu\text{g/ml}$$

$$C_i = 10,24 \text{ mg/ml}$$

Calcul de la masse totale de l'antifongique pour réaliser la solution mère à utiliser pour les 7 isolats

→ 0,5 ml pour une série des boites en milieu solide contenant trois candidas et l'*aspergillus niger*.

→ 0,5 ml pour une série des boites en milieu solide contenant trois dermatophytes.

→ 0,1 ml x 7 isolats en milieu liquide.

→ On ajoute en excès 1,3 ml.

Nous avons besoin donc de 3 ml pour réaliser la dilution verticale et 3 ml pour réaliser la dilution horizontale, au total 6 ml de solution mère.

La concentration initiale dans la solution mère = 10,24 mg/ml.

La masse d'antifongique à solubiliser dans un volume final de 6 ml de solvant est :

10,24 mg -----> 1 ml

X mg -----> 6 ml

$X = 10,24 \times 6 / 1 = 61,44 \text{ mg} \quad ==> X = 61,44 \text{ mg}$
--

=> Pour préparer une solution mère à une concentration de 10,24 mg/ml, dans un volume final de 6 ml de solvant, il faut donc peser une quantité de produit égale à 61,44 mg et la solubiliser dans 6ml de DMSO.

III.4 Activité in vitro des antifongiques témoins

Après la durée de culture définie pour chaque isolat fongique, on a réalisé la lecture des résultats pour les deux méthodes d'étude :

- **Lecture en milieu solide** : la boîte de Pétri où il y a absence totale de pousse des colonies des *Candida*, d'*Aspergillus*, ou des dermatophytes après la durée de culture indiquée, correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

- **Lecture en milieu liquide** :

* le tube à hémolyse où il y a absence totale de culot de *Candida* après 48h d'incubation, correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

* le tube à hémolyse où il y a absence totale de filaments de moisissures après la durée 4 jours d'incubation, correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

* le tube à hémolyse où il y a absence de filamentation des fragments des dermatophytes sur le milieu liquide après 14 jours d'incubation, correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI),

Les résultats sont notés comme suit :

Présence de pousse notée : +

Absence de pousse notée : -

III.4.1 Sur milieu solide

Amphotéricine B (AMB)

Tableau 16 : CMI en $\mu\text{g/ml}$ d'Amphotéricine en milieu solide SC sur les différents isolats fongiques

Boîtes de Pétri	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Amphotéricine B en ($\mu\text{g/ml}$)	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium canis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microsporium gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

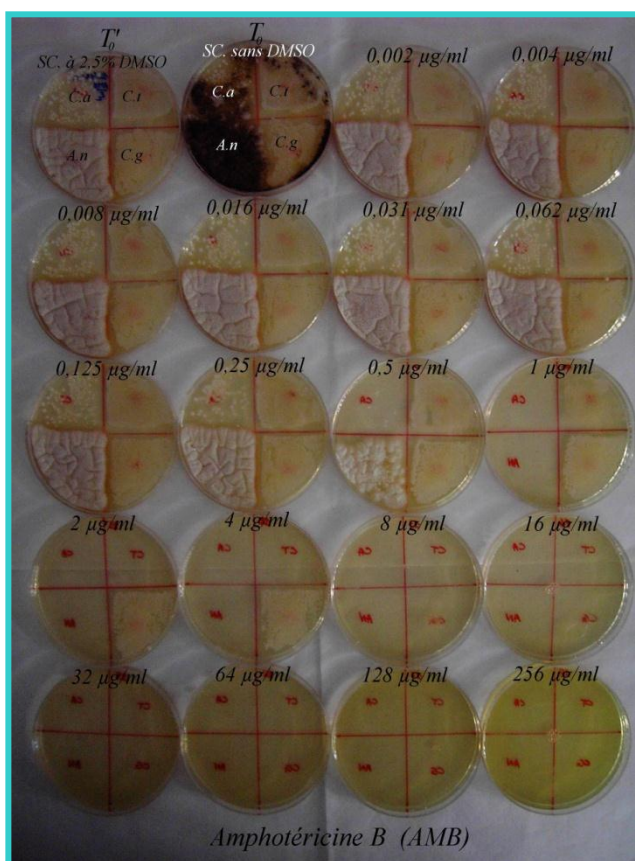


Photo 23: CMI de l'amphotéricine B sur les isolats fongiques de (*C.a* ; *C.t* ; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.



Photo 24 : CMI de l'amphotéricine B sur les isolats fongiques de (*M.c*; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Fluconazole (FCZ)

Tableau 17 : CMI en µg/ml de Fluconazole en milieu solide SC sur les différents isolats fongiques

Boîtes de Pétri	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Fluconazole en (µg/ml)	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Microsporium canis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Microsporium gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+



Photo 25 : CMI de Fluconazole sur les isolats fongiques de (*C.a* ; *C.t*; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

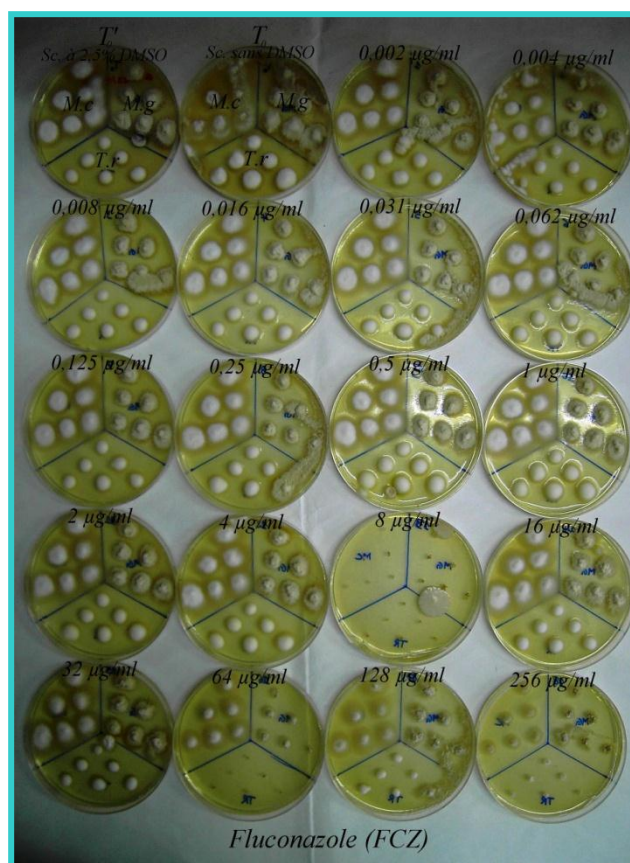


Photo 26 : CMI de Fluconazole sur les isolats fongiques de (*M.c*; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Nitrate d'Isoconazole (ICZ)

Tableau 18 : CMI en µg/ml de nitrate d'isoconazole en milieu solide SC sur les différents isolats fongiques

Boîtes de Pétri	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Nitrate d'Isoconazole en (µg/ml)	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium canis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

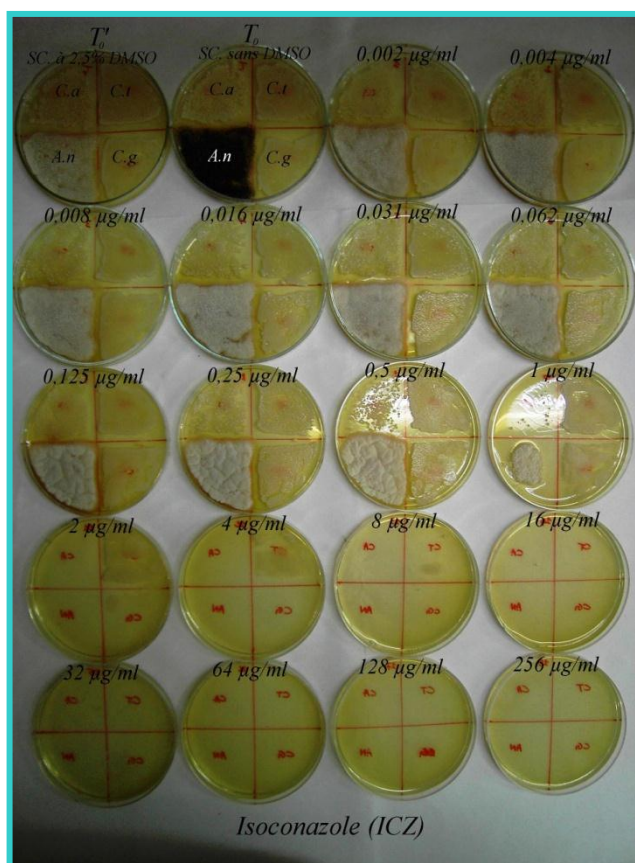


Photo 27 : CMI de nitrate d'isoconazole sur les isolats fongiques de (*C.a* ; *C.t* ; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

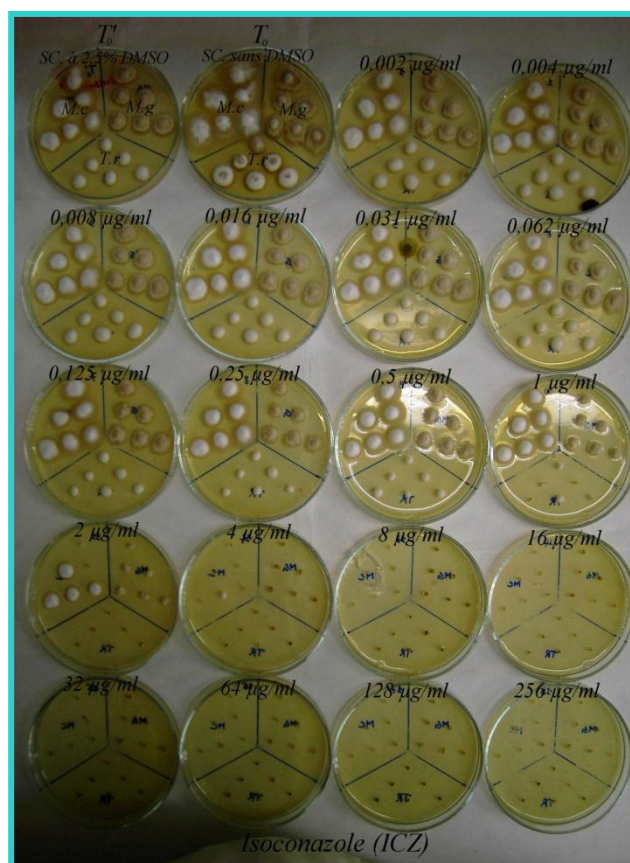


Photo 28 : CMI de nitrate d'isoconazole sur les isolats fongiques de (*M.c* ; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Terbinafine (TBF)

Tableau 19 : CMI en µg/ml de Terbinafine en milieu solide SC sur les différents isolats fongiques

Boîtes de Pétri	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Terbinafine en (µg/ml)	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium canis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

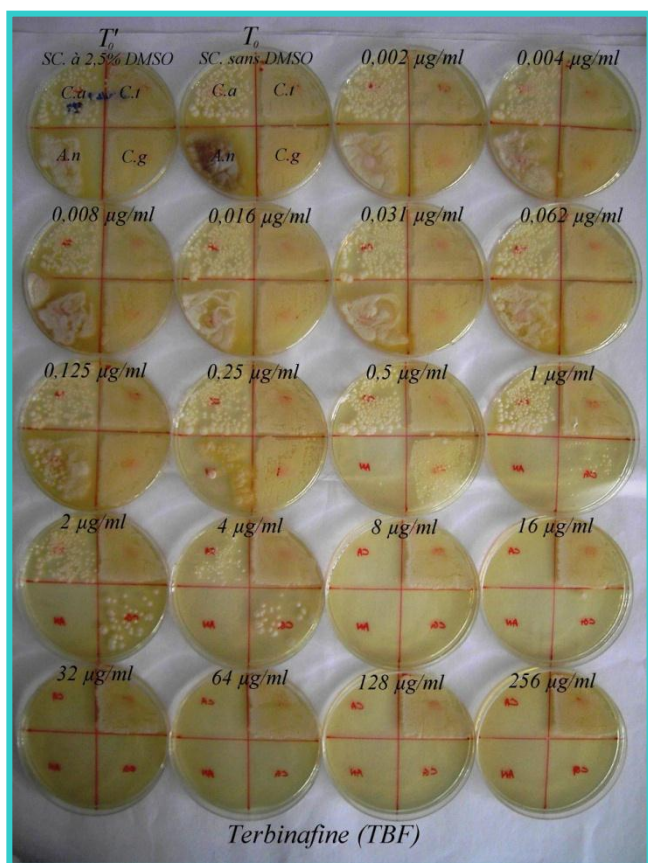


Photo 29 : CMI de terbinafine sur les isolats fongiques de (*C.a* ; *C.t* ; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

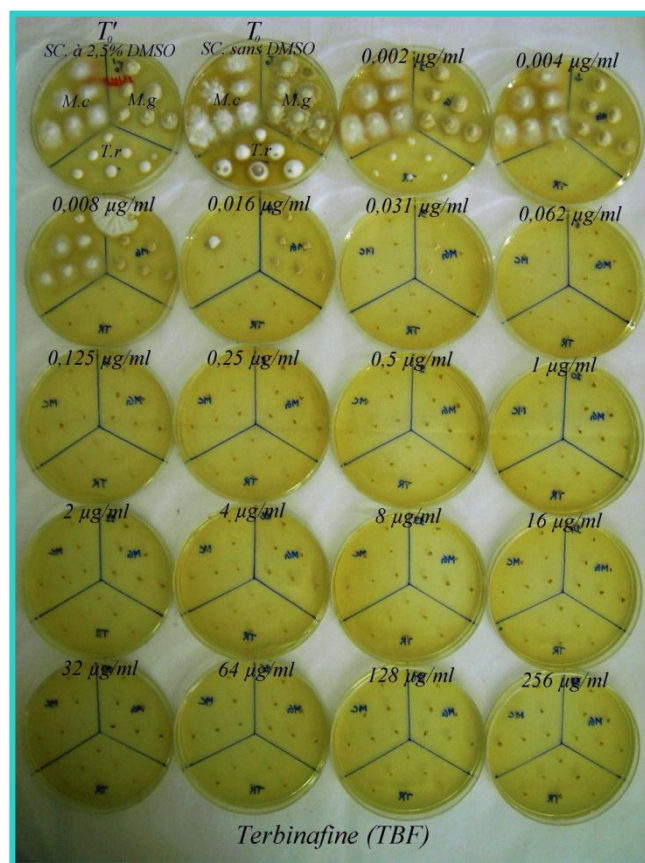


Photo 30 : CMI de terbinafine sur les isolats fongiques de (*M.c* ; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

III.4.2 Sur milieu liquide

Amphotéricine B (AMB)

Tableau 20 : CMI en µg/ml d'Amphotéricine sur les différents isolats fongiques en milieu Sabouraud liquide

Tubes à hémolyse	T ₀ '	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Amphotéricine B en (µg/ml)	0	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microsporum gypseum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Photo 31 : CMI en µg/m d'Amphotéricine sur le *Candida albicans* en milieu Sabouraud liquide

Fluconazole (FCZ)

Tableau 21 : CMI en µg/ml de Fluconazole sur les différents isolats fongiques en milieu Sabouraud liquide

Tubes à hémolyse	T ₀ '	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Fluconazole en (µg/ml)	0	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microsporium canis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microsporium gypseum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

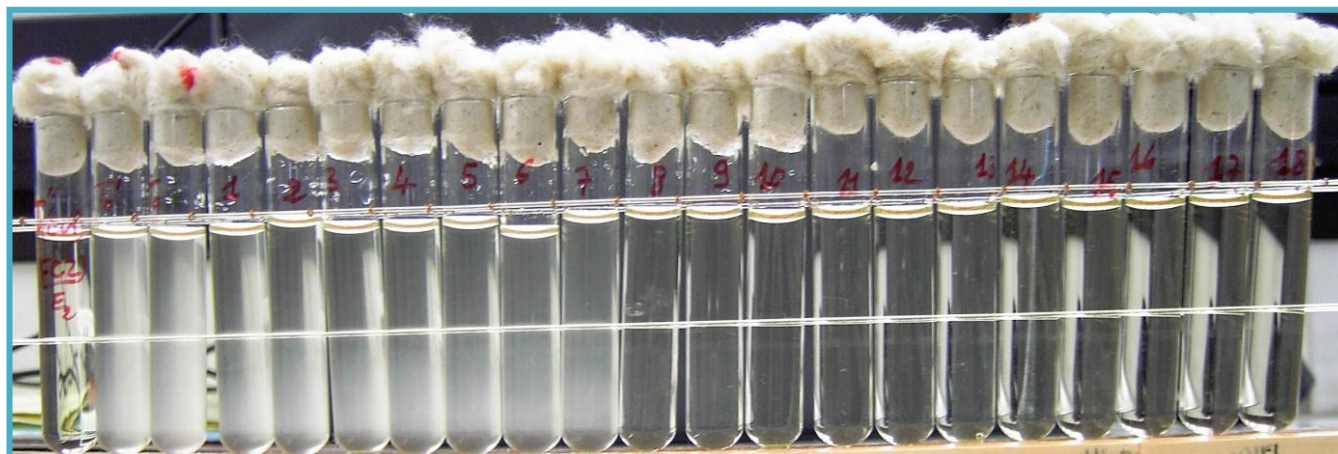


Photo 32 : CMI en µg/ml de fluconazole sur le *Candida glabrata* en milieu Sabouraud liquide

Nitrate d'Isoconazole (ICZ)

Tableau 22 : CMI en µg/ml de Nitrate d'isoconazole sur les différents isolats fongiques en milieu Sabouraud liquide

Tubes à hémolyse	T ₀ '	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Nitrate d'Isoconazole en (µg/ml)	0	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporum gypseum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

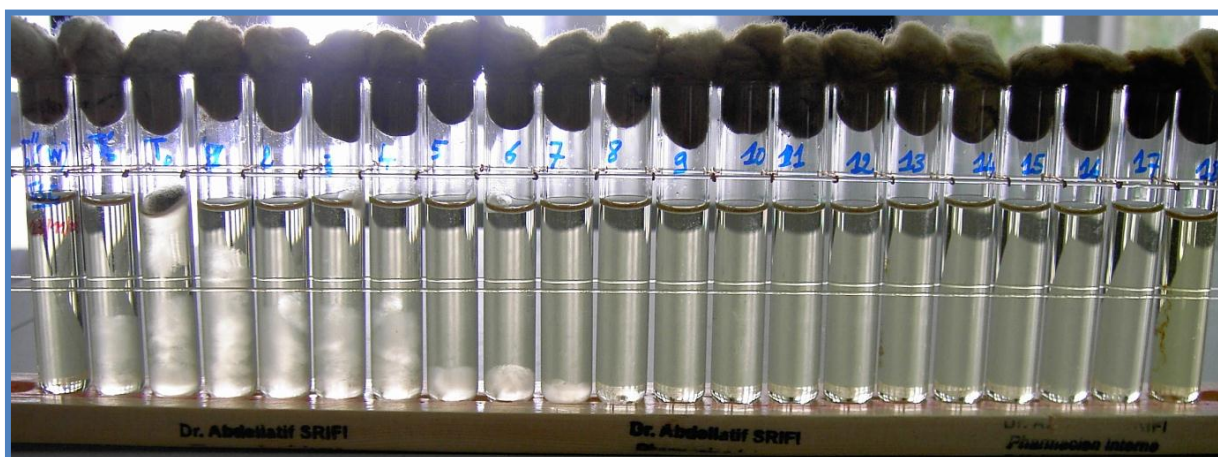


Photo 33 : CMI en µg/ml de nitrate d'isoconazole sur l'*Aspergillus niger* en milieu Sabouraud liquide

Terbinafine (TBF)

Tableau 23 : CMI en µg/ml de Terbinafine sur les différents isolats fongiques en milieu Sabouraud liquide

Tubes à hémolyse	T ₀ '	T ₀ '	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Terbinafine en (µg/ml)	0	0	0	0,002	0,004	0,008	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microsporium canis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium gypseum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Photo 34 : CMI en µg/ml de terbinafine sur le *Microsporium canis* en milieu Sabouraud liquide

III.4.3 Tableau récapitulatif des résultats des antifongiques témoins

Tableau 24 : Récapitulatif des CMI des produits témoins antifongiques sur les différents isolats fongiques, par deux méthodes en milieu solide (SC) et liquide (S.L).

	Produits témoins antifongiques							
	AMB CMI (µg/ml)		FCZ CMI (µg/ml)		ICZ CMI (µg/ml)		TBF CMI (µg/ml)	
Isolats fongiques	SC	SL	SC	SL	SC	SL	SC	SL
<i>Candida albicans</i>	0,25	0,062	> 256	> 256	1	1	4	1
<i>Candida tropicalis</i>	1	0,5	> 256	> 256	16	8	> 256	128
<i>Candida glabrata</i>	2	1	8	2	4	0,25	0,25	0,125
<i>Aspergillus niger</i>	1	0,5	64	16	4	1	1	0,25
<i>Microsporum canis</i>	> 256	> 256	> 256	> 256	8	2	0,031	0,016
<i>Microsporum gypseum</i>	> 256	> 256	> 256	> 256	4	2	0,062	0,016
<i>Trichophyton rubrum</i>	> 256	> 256	> 256	64	2	0,5	0,008	0,004

III.5 Activité antifongique in vitro des huiles essentielles

III.5.1 Méthode des puits dans la gélose

Tableau 25 : Diamètres d'inhibition en (mm) des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* et des produits antifongiques sur les différents isolats fongiques, par la méthode des puits dans la gélose.

	Charge des puits	Produits	Diamètre d'inhibition des isolats fongiques en (mm)			
			<i>C.a</i>	<i>C.t</i>	<i>C.g</i>	<i>A.n</i>
<i>Solvant</i>	<i>25µl</i>	DMSO	0	0	0	0
<i>Antifongiques</i>	<i>256µg (25µl)</i>	AMB	28	22	25	29
		FCZ	R	R	R	33
		ICZ	22	R	R	17
		TBF	R	R	24	17
<i>Huiles essentielles</i>	<i>64µl</i>	<i>N.c</i>	16	14	16	20
		<i>N.a</i>	18	16	18	20
		<i>N.t</i>	15	14	15	18
		<i>N.g</i>	11	12	12	14
	<i>32µl</i>	<i>N.c</i>	13	11	13	13
		<i>N.a</i>	14	12	14	14
		<i>N.t</i>	12	11	12	13
		<i>N.g</i>	9	9	9	9

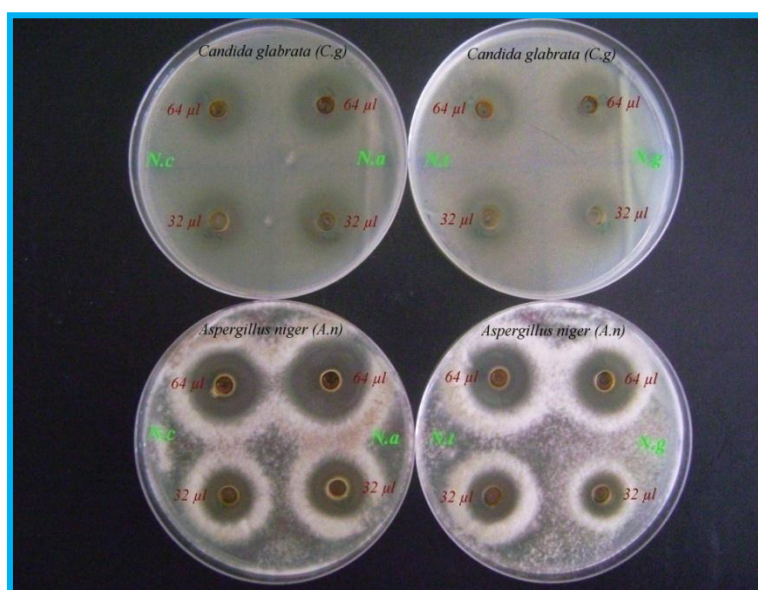


Photo 35 : Effet inhibiteur des HE de 4 espèces du genre *Nepeta* sur les isolats fongiques (*C.g* et *A.n*) par la méthode des puits à deux charges différentes (32µl et 64µl) dans la gélose

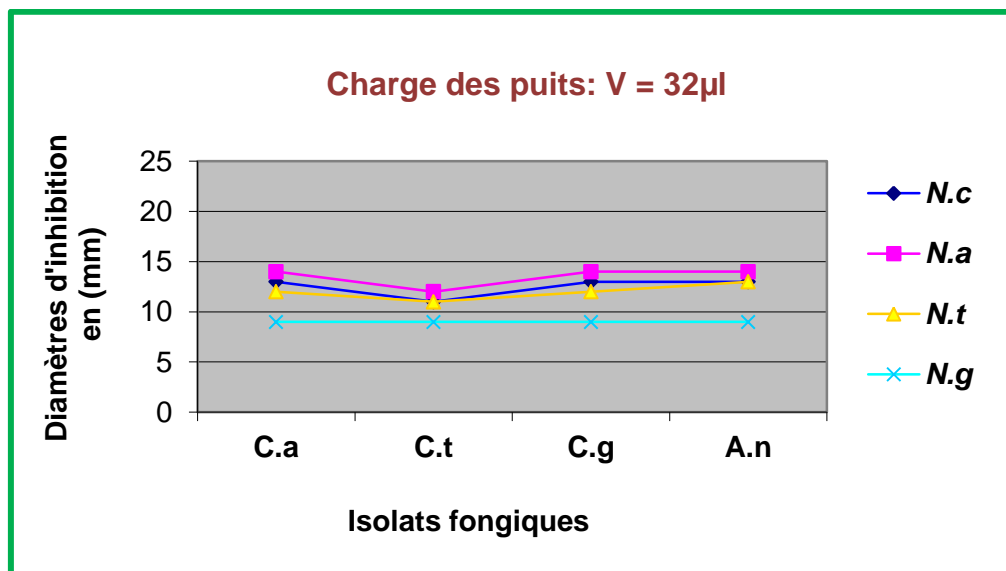


Figure 9 : Diamètres d'inhibition des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc sur les différents isolats fongiques, par la méthode des puits dans la gélose, à une charge des puits de V= 32µl.

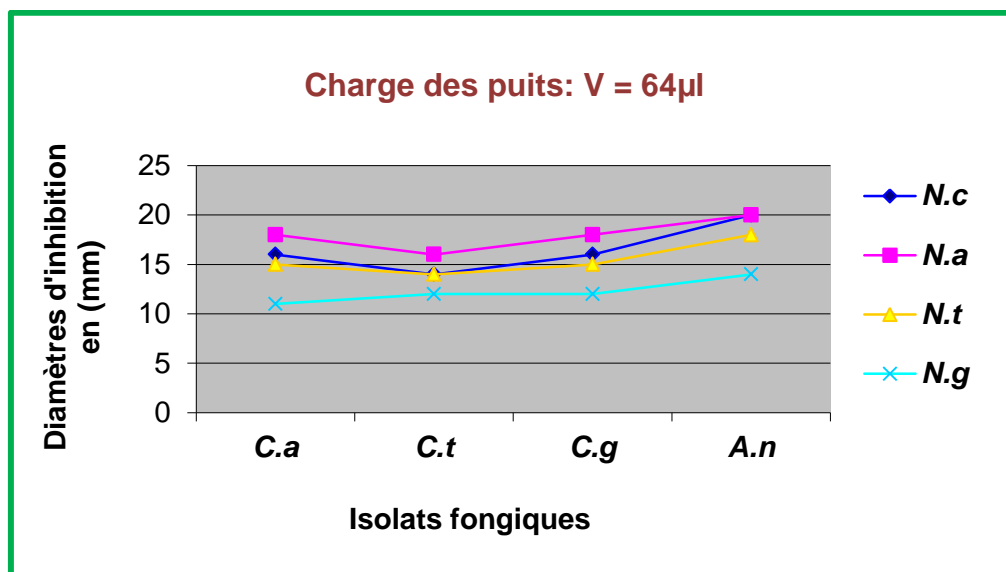


Figure 10 : Diamètres d'inhibition des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc sur les différents isolats fongiques, par la méthode des puits dans la gélose, à une charge des puits de V= 64µl.

III.5.2 Méthode de dilution des huiles essentielles dans la gélose

Tableau 26 : CMI en $\mu\text{l/ml}$ d'Huile essentielle de *N. cataria* sur les différents isolats fongiques, en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Boîtes de Pétri	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration d'H.E: (<i>N. cataria</i>) Dans le milieu (SC) à 2% de Tween 80 en ($\mu\text{l/ml}$)	2% Tween 80	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporum gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

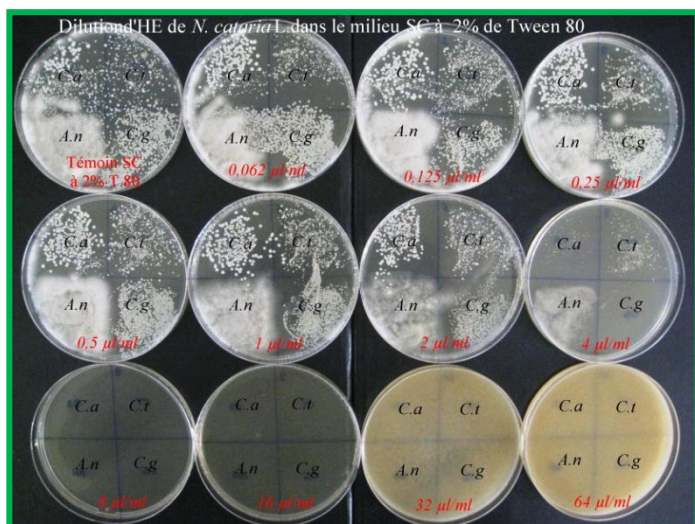


Photo 36 : CMI d'H.E de *Nepeta cataria* sur des isolats fongiques de (*C.a.*; *C.t.*; *C.g.* et *A.n.*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

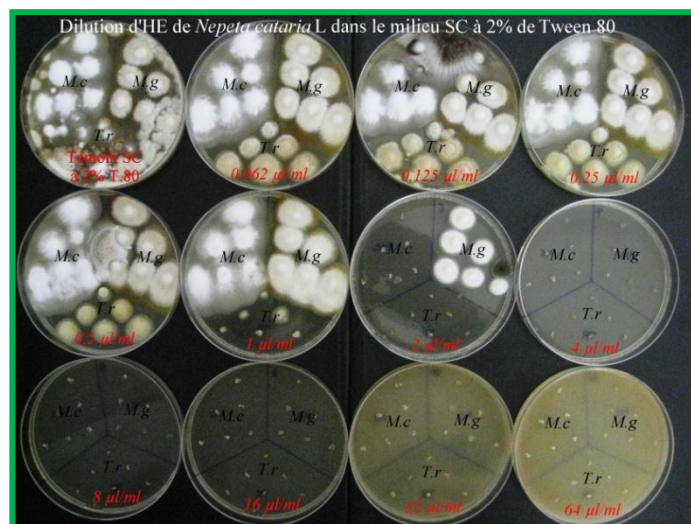


Photo 37 : CMI d' H.E de *Nepeta cataria* sur des isolats fongiques de (*M.c.*; *M.g.* et *T.r.*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

Tableau 27 : CMI en µl/ml d'Huile essentielle de *N. atlantica* sur les différents isolats fongiques, en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Boîtes de Pétri	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration d'H.E: (<i>N. atlantica</i>) Dans le milieu (SC) à 2% de Tween 80 en (µl/ml)	2% Tween 80	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Microsporium canis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

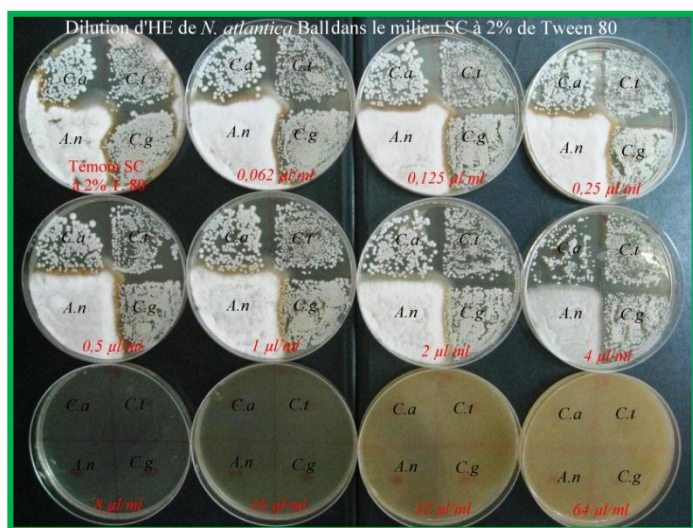


Photo 38 : CMI d'H.E de *Nepeta atlantica* sur des isolats fongiques de (*C.a*; *C.t*; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

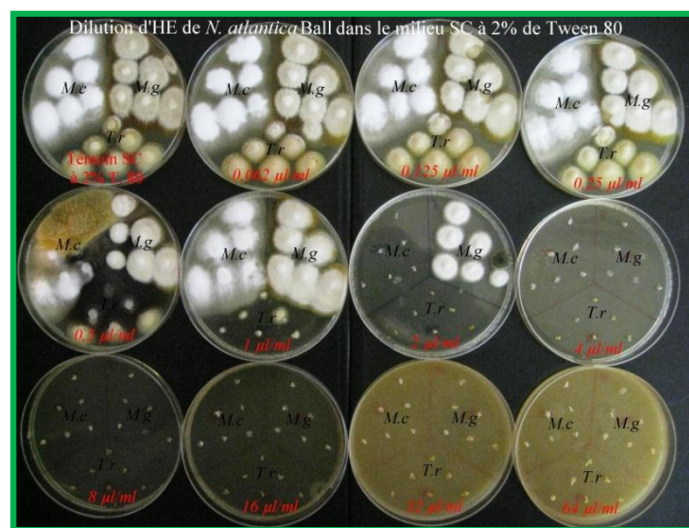


Photo 39 : CMI d' H.E de *Nepeta atlantica* sur des isolats fongiques de (*M.c*; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

Tableau 28 : CMI en $\mu\text{l/ml}$ d'Huile essentielle de *N. tuberosa* sur les différents isolats fongiques, en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Boîtes de Pétri	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration d'H.E: (<i>N. tuberosa</i>) Dans le milieu (SC) à 2% de Tween 80 en ($\mu\text{l/ml}$)	2% Tween 80	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Microsporum canis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporum gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

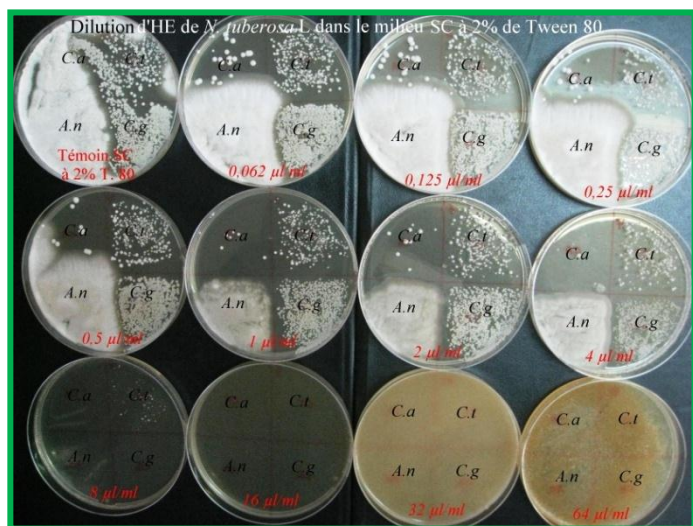


Photo 40 : CMI d'H.E de *Nepeta tuberosa* sur des isolats fongiques de (*C.a*; *C.t*; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

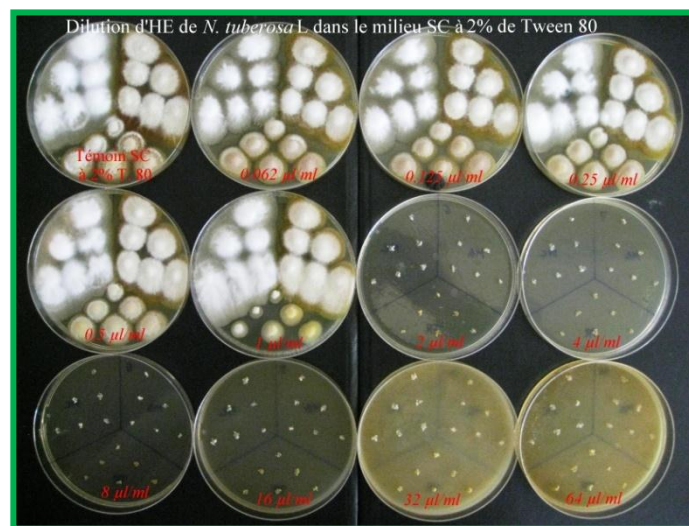


Photo 41 : CMI d' H.E de *Nepeta tuberosa* sur des isolats fongiques de (*M.c*; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

Tableau 29 : CMI en µl/ml d'Huile essentielle de *N. granatensis* sur les différents isolats fongiques, en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol.

Boîtes de Pétri	T ₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration d'H.E: (<i>N. granatensis</i>) Dans le milieu (SC) à 2% de Tween 80 en (µl/ml)	2% Tween 80	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Microsporum canis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Microsporum gypseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

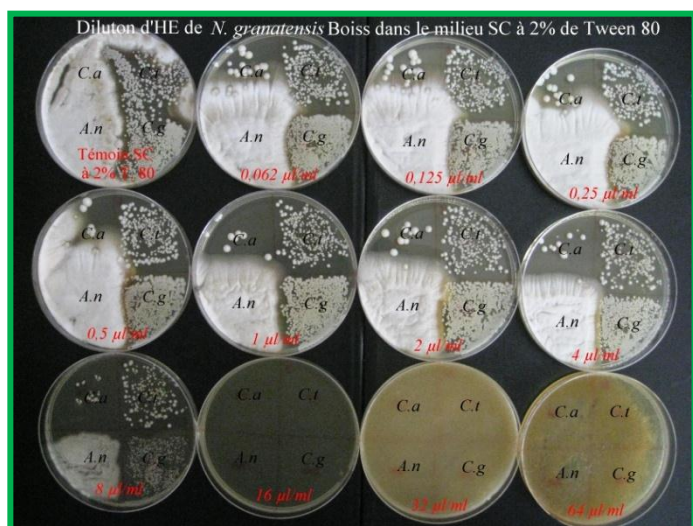


Photo 42 : CMI d'H.E de *Nepeta granatensis* sur des isolats fongiques de (*C.a*; *C.t*; *C.g* et *A.n*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.



Photo 43 : CMI d' H.E de *Nepeta granatensis* sur des isolats fongiques de (*M.c*; *M.g* et *T.r*), par la méthode de dilution en milieu solide SC.

Tableau 30 : Récapitulatif des CMI des HE et des produits témoins antifongiques sur les différents isolats fongiques, par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol (SC)

	Témoin	Huiles essentielles CMI en $\mu\text{l/ml}$				Témoin	Produits témoins antifongiques CMI en $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 24)			
	Tween 80 à 2%	<i>N.c</i>	<i>N.a</i>	<i>N. t</i>	<i>N.g</i>	DMSO à 2,5%	AMB	FCZ	ICZ	TBF
<i>Candida albicans</i>	+	8	8	4	16	+	0,25	>256	1	4
<i>Candida tropicalis</i>	+	8	8	8	16	+	1	>256	16	>256
<i>Candida glabrata</i>	+	4	8	8	16	+	2	8	4	0,25
<i>Aspergillus niger</i>	+	8	8	8	16	+	1	64	4	1
<i>Microsporium canis</i>	+	2	2	2	4	+	>256	>256	8	0,031
<i>Microsporium gypseum</i>	+	4	4	2	4	+	>256	>256	4	0,062
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	2	1	2	4	+	>256	>256	2	0,008

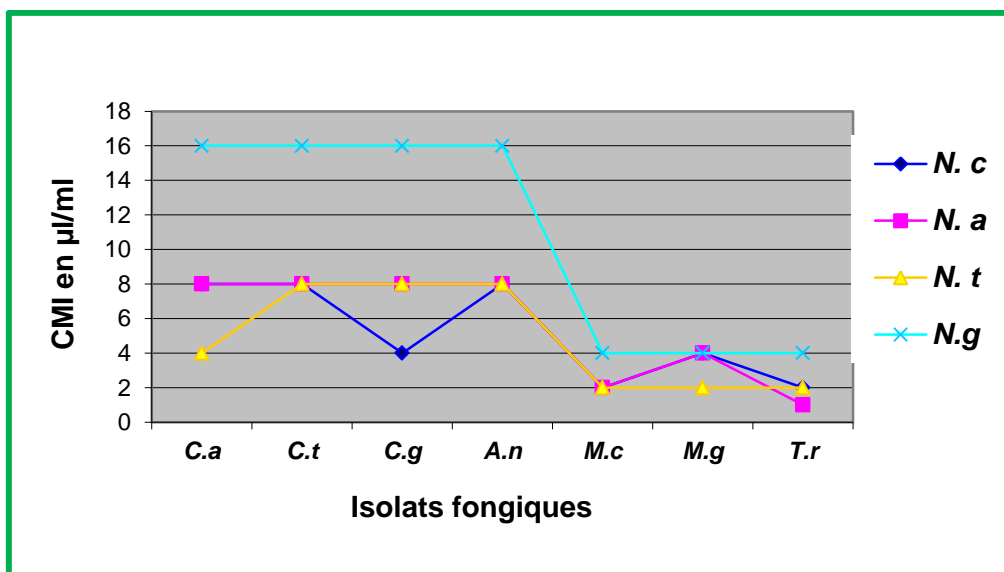


Figure 11: CMI des Huiles Essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc sur les différents isolats fongiques par la méthode de dilution en milieu solide Sabouraud Chloramphénicol (SC)

IV. DISCUSSION

IV.1 Mise au point du protocole d'étude de l'activité in vitro des antifongiques témoins

Le milieu SC a été choisi pour réaliser l'étude de l'activité antifongique, le chloramphénicol a pour rôle d'inhiber la pousse des bactéries dans ce milieu lors d'une contamination. L'Actidione inhibe la pousse de certaines moisissures pour cela le milieu Sabouraud Chloramphénicol Actidione (**SCA**) n'a pas été utilisé pour l'étude de l'activité antifongique, *Aspergillus niger* une moisissure ayant été utilisé dans notre étude.

Le DMSO a été utilisé comme solvant capable de solubiliser les produits témoins antifongiques, il est miscible à l'eau et à la plupart des liquides organiques ^[28], et par conséquent n'entraîne pas de problème de séparation de phase avec le milieu de culture.

La compatibilité du DMSO avec le milieu SC a été étudiée à différentes proportions : 2,5% ; 5% ; 10% ; 15% ; 20% et 25%, ceci nous a permis de conclure que le solvant DMSO est compatible avec le milieu de culture SC, ce dernier a gardé son pouvoir gélifiant avec absence de fissuration dans ce milieu en comparaison avec le témoin.

L'effet de DMSO sur les isolats fongiques dans le milieu solide (**SC**) ou liquide (**SL**) a montré que les dermatophytes sont plus sensibles au DMSO que les *Candida* et *Aspergillus niger*. Pour notre travail un pourcentage de DMSO utilisé et commun pour les différents isolats étudiés, quelque soit la méthode en milieu solide ou liquide, a été déterminé à **2,5%** dans le milieu de culture, ce pourcentage n'entraîne aucune inhibition de la croissance de tous les isolats fongiques au cours de l'étude de l'activité fongique.

L'étude de la solubilité des différents produits témoins antifongiques, nous a permis de mettre le point sur leur solubilité, afin d'éviter leur saturation et aussi de soulever le problème de recristallisation dans le milieu de culture au cours de la dilution, ce qui a une influence sur la concentration finale de chaque produit.

La mise en place d'une nouvelle technique de repiquage à l'aide de tracés, nous a permis de bien maîtriser et exploiter cette technique dans l'étude de l'activité antifongique.

A travers ces essais, nous avons mis en place des protocoles d'étude de l'activité in vitro des produits antifongiques témoins sur 7 isolats fongiques par deux méthodes : en milieu solide (SC) et en milieu liquide (SL). Nous avons également mis en place le protocole d'étude de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles par la méthode des puits dans la gélose et la méthode de dilution en milieu solide SC à 2% de Tween 80.

IV.2 Etude phytochimique ^[15]

Le dépouillement des chromatogrammes après l'analyse des huiles essentielles montre la présence d'au moins 26 constituants différents représentant la composition chimique du genre *Nepeta*. Nous avons pu constater que les huiles essentielles des quatre espèces analysées ont des compositions chimiques similaires, ne différant qu'au niveau des constituants minoritaires, **25** constituants ont été identifiés et répartis en sesquiterpènes (**10 %**), monoterpènes hydrocarbonés (**10 %**), monoterpènes oxygénés (**80 %**), dont un constituant majoritaire, l'iridoïde lactonique de type nepetalactone, présent à des taux de **71,40 %** à **77,43 %** dans les trois espèces de *Nepeta* (*atlantica*, *tuberosa* et *cataria*) et à un taux de **39,44%** chez l'espèce *Nepeta granatensis*. Cette perte au niveau de cette espèce en constituant majoritaire, est compensée

par une forte présence d'eucalyptol soit **23,98 %** dans l'huile obtenue par l'entraînement à la vapeur d'eau.

La composition chimique de l'huile essentielle du genre *Nepeta*, dans son ensemble, est conforme à celle d'une plante aromatique «ordinaire», car on note qu'il y a coexistence des trois catégories de terpénoïdes : les monoterpènes hydrocarbonés, les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes. Cependant la particularité réside dans l'existence des monoterpènes oxygénés du type iridoïdique en stéréo-isomère pur : **la 4 $\alpha\alpha$, 7 α , 7 $\alpha\beta$ -nepetalactone**. Ce dernier constituant est toujours accompagné de son homologue hydrogéné: la dihydronepetalactone qui varie de **2,80%** à **5,96 %** à travers les différentes espèces. Le taux du dihydronepetalactone varie en fonction du taux de son homologue la nepetalactone. Ceci est bien visible dans l'espèce *granatensis* où la dihydronepetalactone atteint le plus faible taux (**2,80%**) puisque son précurseur la nepetalactone n'affiche que **39,44 %**.

Les données spectroscopiques de la RMN¹³C d'une part, et le pouvoir rotatoire d'autre part, apportent plus de renseignements sur la stéréochimie de notre échantillon, En effet, les différentes investigations sur les iridoïdes lactoniques ^[21] montrent que la nepetalactone peut se présenter sous forme de trois stéréo-isomères [A], [B] et [C] grâce aux différentes positions stéréochimiques des hydrogènes situés dans la jonction bicyclique 4a et 7a.

Nous avons isolés et identifiés cet iridoïde comme étant le **4 $\alpha\alpha$, 7 α , 7 $\alpha\beta$ -nepetalactone (Figure 7 et 8[B])**, grâce surtout à son pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]^{20} = -24,4^\circ$, mais aussi à ses données caractéristiques en RMN¹³C : C₄ (120 ppm) et C₇ (32 ppm). Les autres stéréo-isomères **4 $\alpha\alpha$, 7 α , 7 α α -nepetalactone** ($[\alpha]^{20} = +3,7^\circ$) (Figure 8[A]), et **4 $\alpha\beta$, 7 α , 7 $\alpha\beta$ -nepetalactone** ($[\alpha]^{20} = +81^\circ$) (Figure 8[C]) n'ont pas été décelés dans nos échantillons.

IV.3 Activité antifongique in vitro

Nous avons choisi les isolats fongiques les plus fréquemment isolés dans les prélèvements cliniques. Selon une étude réalisée par Kalkanci A, et al. il a montré que le *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida glabrata* sont les plus fréquents [35]. En plus que l'*Aspergillus niger* et les dermatophytes tel que *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* sont aussi les plus fréquemment isolés dans les prélèvements auriculaires pour le premier et dans les prélèvements cutanés et des phanères pour les trois autres.

L'évaluation de la sensibilité de sept isolats fongiques aux quatre produits antifongiques témoins [Tableau 24], par deux méthodes en milieu solide et liquide a montré des différences entre les deux méthodes d'essai appliquées. Les CMI obtenues par la première méthode sont plus élevées par rapport à celle de dilution en milieu liquide (SL). Les études réalisées par Ouraïni D et al [48], et Niewerth M, et al [45] ont révélés que les CMI obtenues par la méthode de microdilution sur bouillon sont inférieures aux CMI obtenues avec la méthode de macrodilution sur milieu solide.

La différence entre nos deux résultats peut être expliquée par le fait qu'en milieu liquide la surface de contact entre le microorganisme et la substance active est grande.

En absence de normes internationales sur les phénotypes de sensibilité, nous ne parlerons pas dans notre étude de souches sensibles, intermédiaires et résistantes mais nous allons raisonner en terme de CMI basses ou élevées.

L'AMB a montré des CMI basses sur les *Candida* (*C.a* = 0,25µg/ml ; *C.t* = 1µg/ml ; *C.g* = 2µg/ml) et l'*A.n* = 1µg/ml, ceci est conforme à une autre étude

qui a montré que l'AMB est un agent thérapeutique principal pour les souches de *Candida* résistantes aux azolés [35]

Le FCZ a révélé des CMI hautes, supérieures à 256µg/ml pour les isolats de *C.a* et *C.t*, par contre des CMI intermédiaires chez le *C.g* et l'*A.n*.

L'AMB et le FCZ ont montrés des CMI hautes, supérieures à 256µg/ml sur les dermatophytes.

L'ICZ a montré également des CMI basses sur tous les isolats fongiques à l'exception de *C.t* ou il a révélé une CMI intermédiaire égale à 16µg/ml.

La terbinafine a donné les CMI les plus basses sur les dermatophytes de l'ordre de 0,004 à 0,016µg/ml et de 0,25µg/ml sur l'*A.n*. Chez le *C.a* et le *C.g*, la CMI est de 1µg/ml et 0,125µg/ml. Par contre nous avons noté une CMI haute à 128µg/ml chez le *C.t*.

La catégorisation de nos résultats reste difficile, mais à travers ces données, nous avons une idée sur la sensibilité de nos isolats fongique. Ils ont présenté une sensibilité variable d'un produit à l'autre et d'un isolat à l'autre.

De nombreuses études qui ont été fait sur les huiles essentielles concernant l'activité antimicrobienne [2, 16, 39] ne montrent pas de particularité dans leur composition chimique, comme celle des huiles essentielles de genre *Nepeta*, par la présence d'un composé majoritaire le nepetalactone.

L'activité antifongique des produits témoins testés sur des isolats de la mycothèque du laboratoire de parasitologie de l'HMIM V, à une charge de puits de **256µg/ml** pour chaque produit antifongique, est variable d'un produit à l'autre en fonction de la sensibilité de chaque isolat.

Le DMSO seul ne donne aucune inhibition pour une charge de puits de **25µl**, et l'incorporation du DMSO à **2,5%** dans les boites témoins en milieu solide ne donne aucune inhibition en comparant avec le témoin sans DMSO.

Toutes les HE à une charge de **32µl** pour chaque puits ont montré un effet inhibiteur sur les isolats des *Candida* et *d'Aspergillus niger*, et que les HE de *N.c*, *N.a*, *N.t*, donnent des diamètres d'inhibition plus grands que l'HE de *N.g*. (**Tableau 25; Figure 9**).

Ce résultat a été confirmé en augmentant la charge des puits en HE à **64µl**, par l'augmentation de l'effet inhibiteur des HE d'une manière proportionnelle de chaque HE vis-à-vis de chaque isolat fongique. (**Tableau 25; Figure 10**).

Les HE de *N. cataria*, *N. atlantica*, *N. tuberosa*, ont montré une activité (CMI) de l'ordre de **8µl/ml** sur les *Candida* et *l'Aspergillus niger*, par contre celle de l'HE de *N. granatensis* est de **16µl/ml** (**Tableau 30; Figure 11**).

Ces HE sont plus efficaces sur les dermatophytes que les *Candida* et *l'Aspergillus*, avec une CMI de l'ordre de **2µl/ml** pour les HE de *N. cataria*, *N. atlantica*, *N. tuberosa*, et de **4µl/ml** pour l'HE de *N. granatensis*

D'après l'interprétation des tests de sensibilité en aromathérapie "CMI < **50µl/ml**" Excellent pouvoir inhibiteur ^[39], les HE de quatre espèces du genre *Nepeta* ont un excellent pouvoir inhibiteur contre les champignons testés.

Cette différence au niveau de l'activité antifongique entre les HE des espèces de genre *Nepeta*; peut être probablement due à la différence de composition concernant le constituant majoritaire, le **4αα, 7α, 7αβ-nepetalactone**.

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure ^[19, 31]. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures ^[31, 38].

A travers cette étude, vu les résistances des champignons étudiés notamment les levures du genre *Candida* aux 4 antifongiques témoins testés, l'utilisation d'huiles essentielles du genre *Nepeta* ouvre de nouveaux horizons dans la découverte de nouvelles molécules à activité antifongique.

Au total, les résultats de notre étude nous permette de dire que :

- ✓ L'amphotéricine B reste un agent thérapeutique principal pour les isolats de *Candida* résistants aux azolés,
- ✓ Le nitrate d'isoconazole a montrée une activité importante sur tous les isolats fongiques testés.
- ✓ La terbinafine a montré une très bonne activité in vitro sur les *Candida* (Sauf *C. tropicalis*) et sur les dermatophytes, cette propriété peut être mise à profit par les laboratoires cliniques et les praticiens pour faire un choix pertinent de l'antifongique à utiliser et pour la prise en charge du patient.
- ✓ Le DMSO est un solvant pouvant entrainer une action antifongique, s'il est incorporé dans le milieu de culture à un pourcentage supérieur à 2,5%.

Par ailleurs, nous avons mis en place des protocoles détaillés d'étude de l'activité antifongique in vitro, des nouveaux produits solide ou des huiles essentielles, par la méthode de dilution en milieu solide ou liquide, ils servent à la recherche et développement scientifique des nouvelles molécules pour palier le problème de résistances thérapeutiques.

Enfin, la standardisation des normes international de phénotype de sensibilité ou la catégorisation des souches en sensibles (S), intermédiaire (I) et résistantes (R), nécessite des études multicentriques de la sensibilité aux antifongiques dans des laboratoires de biologie des hôpitaux selon les indications et les techniques habituellement utilisées dans ces laboratoires, commercialisées ou non, permettant de réaliser un antifongigramme.

Les huiles essentielles de *Nepeta cataria* coutent selon le vendeur français Labomicronature : (www.labimicronature.com) **23,30 €** pour **5 ml** d'huile essentielle (équivalent à **52331,8 DH** pour **un litre** d'huile essentielle), elles peuvent constituer une retombé socioéconomique importante, ceci nous incite à encourager les agriculteurs de créer des coopératives d'agriculture des plantes aromatiques médicinales et essentiellement celles du genre *Nepeta*.

PERSPECTIVES

Projets d'étude en cours, concerne :

- ✓ L'isolement de la nepetalactone selon la technique décrite précédemment.
- ✓ L'étude toxicologique de la nepetalactone chez une espèce de mammifère pour but d'établir les limites de toxicité de ce produit.
- ✓ Etude de l'activité antifongique et antibactérienne in vitro de la nepetalactone à l'état pur.
- ✓ Formulation galénique de la nepetalactone la plus adaptée.
- ✓ Etude de l'activité antifongique et antibactérienne in vivo de la nepetalactone chez les animaux de laboratoire.
- ✓ Viser d'autres activités biologiques de la nepetalactone essentiellement anticancéreuse, anti VIH, antiechinococcique, antileishmanienne.
- ✓ La réactivité de ce constituant majoritaire avec divers dipôles, qui a été obtenu par Bouidida et al, par une réaction de cycloaddition dipolaire-1,3, nous a permis d'entamer les activités biologiques des autres dérivés hétérocycliques semi synthétiques type isoxazonilique à partir de la nepetalactone.

V. CONCLUSION

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation, par le biais d'un apport scientifique, du potentiel aromatique et médicinal des plantes marocaines. Les compositions chimiques des huiles essentielles montrent sans ambiguïté une forte richesse en monoterpènes oxygénés dont le constituant principal est le 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone.

L'activité antifongique des HE de *N. atlantica*, *N. cataria*, *N. tuberosa*, est plus intéressante que l'HE de *N. granatensis*, qui est probablement due à un taux élevé de nepetalactone. Le 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone est probablement le produit responsable de l'activité antifongique,

Ces travaux restent à compléter par l'étude de l'activité antifongique de nepetalactone à l'état pur.

Travaux communiqués aux congrès de la Société Marocaine de Chimie Clinique (SMCC)

Première communication :

Mise en place d'une nouvelle technique de repiquage des dermatophytes sur milieu solide dans les boîtes de Pétri à l'aide des tracés de repiquage sur papier ; 9^{èmes} JOURNEES NATIONALES DE BIOLOGIE CLINIQUE ; Hyatt Regency, Casablanca, 27 - 28 Mars 2009. [Le 1^{er} Prix du Poster]

Deuxième communication :

Etude phytochimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de 4 espèces du genre *Nepeta* du Maroc ; 10^{èmes} JOURNEES NATIONALES DE BIOLOGIE CLINIQUE ; Palais des Congrès, Marrakech, 6 - 8 Mai 2010.



Mise en place d'une nouvelle technique de repiquage des dermatophytes sur milieu solide dans les boîtes de Pétri à l'aide des tracés de repiquage sur papier



P- 87

RÉSUMÉ

Srifi A, Enneffah W, Zouiten L, El Mellouki W, Lmimouni B
Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V- Rabat

Introduction : L'étude de l'activité antifongique des nouveaux produits de synthèse ou naturels, sur milieu solide nécessite la mise en place d'une technique de repiquage des dermatophytes à l'aide de tracés sur papier.

Matériels et méthodes : Nous avons utilisé pour cette étude les souches de dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton violaceum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*...) isolées dans notre laboratoire. Toutes les souches ont été repiquées sur milieu Sabouraud Chloramphénicol, Sabouraud Chloramphénicol Actidione et milieu PDA selon la technique habituelle (de façon arbitraire) et selon cette nouvelle technique du tracé sur papier. La lecture est faite après incubation à 28°C pendant 30 jours.

Résultats et discussion : Tous nos résultats sont présentés sous forme de photos de cultures réalisées selon la méthode des tracés que nous proposons et des cultures réalisées de façon arbitraires. Nous allons discuter l'intérêt et la pertinence de cette nouvelle technique de repiquage.

Conclusion : Cette technique de repiquage est simple et facile à réaliser. Elle permet :

- L'amélioration de la visibilité avec répartition homogène des colonies dans une même boîte.
- L'économie des boîtes et des produits à tester par la possibilité de tester plusieurs souches par boîte, le choix du tracé étant fonction de la nature de l'étude à effectuer.
- L'isolement des colonies en donnant un aspect macroscopique plus caractéristique

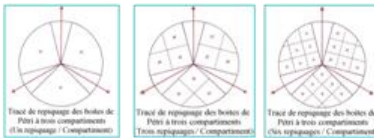
INTRODUCTION

L'étude de l'activité antifongique des nouveaux produits de synthèse ou naturels, sur milieu solide, nécessite une préparation des champignons en suspension, ce qui est difficile à obtenir avec les dermatophytes. La seule technique valable est le repiquage, dans ce sens nous avons mis en place pour la première fois une technique utilisant des tracés de repiquage sur papier.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Préparation de milieu de culture Sabouraud Chloramphénicol selon la technique usuelle.
- Préparation des différents types de tracés de repiquage (Schémas des tracés),

Tracés de repiquage à trois compartiments



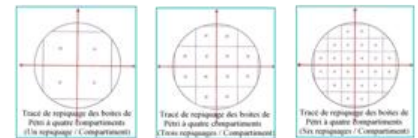
- Préparation des colonies de dermatophytes à repiquer



=> Petits fragments de filament, fins et homogènes.



Tracés de repiquage à quatre compartiments



- Repiquage des dermatophytes en utilisant les différents tracés.
- => Repiquage des petits fragments à la surface de la gélose au niveau des points de repiquage de chaque tracé.

RÉSULTATS

<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	Repiquage arbitraire			<i>Microsporum gypseum</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton violaceum</i>	<i>Trichophyton violaceum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	
<p>Activité in vitro du nitrate d'Isoconazole sur : <i>M. canis</i> (CMI = 8µg/ml) <i>M. gypseum</i> (CMI = 4µg/ml) <i>T. rubrum</i> (CMI = 2µg/ml)</p>				
<p><i>M.c:</i> <i>Microsporum canis</i> <i>M.g:</i> <i>Microsporum gypseum</i> <i>Tr:</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Tv:</i> <i>Trichophyton violaceum</i></p>				

DISCUSSION

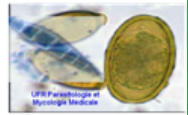
- Le repiquage arbitraire entraîne habituellement le chevauchement des colonies.
- L'utilisation de tracé de repiquage donne une répartition homogène avec des colonies bien isolées dans chaque boîte de Pétri et dans chaque compartiment.
- Augmenter le nombre de compartiment dans chaque boîte => Étude de l'activité antifongique de plusieurs espèces => Économie du produit à tester et du milieu de culture.
- Pour chaque type de tracé à trois ou à quatre compartiments, plus on augmente le nombre de repiquage par compartiment plus la taille des colonies est petite.
- Le choix du tracé de repiquage est fait en fonction du type d'étude :
 - Étude de l'activité antifongique in vitro d'un produit de synthèse ou naturel : tracés à trois ou à quatre compartiments avec plusieurs points de repiquage par compartiment (car dans ce cas on s'intéresse à la présence ou à l'absence de pousse, donc à l'inhibition de la pousse des dermatophytes).
 - Étude des caractères macroscopiques des souches des dermatophytes sur milieu de fructification comme PDA, on utilise les tracés de repiquage à trois ou à quatre compartiments avec un seul point de repiquage par compartiment, ce qui nous permet d'obtenir des colonies de grande taille, avec un aspect plus caractéristique.

CONCLUSION

- Cette nouvelle technique de repiquage est simple et facile à réaliser. elle permet :
- L'amélioration de la visibilité avec répartition homogène des colonies dans une même boîte.
 - L'économie des boîtes et des produits à tester par la possibilité de tester plusieurs souches par boîte.
 - Le choix du tracé étant fonction de la nature de l'étude à effectuer.
 - L'isolement des colonies en donnant un aspect macroscopique plus caractéristique.



Etude phytochimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc



Srifi A¹, Boudida EL H^{2,3}, Alaoui K³, Cherrah Y³, El Mellouki W¹, Lmimouni B¹

¹Service de Parasitologie Mycologie, Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.

²Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, Direction du Médicament et de la Pharmacie de Rabat.

³Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Equipe de Recherche de Toxicologie-Pharmacodynamie (ERTP), Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

INTRODUCTION

Le genre *Nepeta* appartient à la famille des lamiacées. Notre choix s'est porté sur *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf) Maire (*N.r.*), *Nepeta granatensis* Boiss (*N.g.*), *Nepeta cataria* L. (*N.c.*) et le *Nepeta atlantica* Ball (*N.a.*); cette dernière espèce est endémique au Maroc. Dans notre étude, nous avons entamé l'étude phytochimique de ces espèces marocaines et leur activité antifongique sur des champignons pathogènes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Techniques d'analyse & Identification

Nous avons adopté pour l'analyse des huiles essentielles (HE) la technique la plus utilisée dans ce domaine à savoir la chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'identification des constituants se fait dans un premier temps par les mesures des temps de rétention et par comparaison avec des témoins authentiques. L'achèvement des identifications se fait par couplage de la spectrométrie de masse avec la CPG (CPG-SM).

Nous avons particulièrement utilisé la méthode de cristallisation pour isoler le nepetalactone pur à partir de l'HE, qui est identifié par les méthodes physico-chimiques habituelles à la chimie organique (RMN ¹H, RMN ¹³C, IR, SM... etc).

Isolats fongiques

L'activité antifongique a été réalisée sur les isolats de *Candida albicans* (*C.a.*), *Candida tropicalis* (*C.t.*), *Candida glabrata* (*C.g.*), *Aspergillus niger* (*A.n.*) *Microsporium canis* (*M.c.*), *Microsporium gypseum* (*M.g.*) et le *Trichophyton rubrum* (*Tr.*).

Substances antifongiques témoins

Les antifongiques utilisés sont l'Amphotéricine B (AMB), Terbinafine (TBF), Fluconazole (FCZ) et la Nitrate d'Isoconazole (ICZ), qui ont été solubilisés dans le DMSO.

Méthode des puits dans la gélose: (qualitative)

L'ensemencement par inondation des isolats dans le milieu Sabouroud chloramphénicol (SC), Remplir chacun des 4 puits par un volume de 25µl à partir de chaque solution mère témoin à 4 puits contenant chacun 25µl de DMSO. Essai de deux HE à deux volumes différents 32µl et 64µl par isolat dans la même boîte, la culture est faite à l'étuve (28°C) pendant 48h pour les *Candida*, et 4 jours pour *Aspergillus niger* et la lecture par mesure du diamètre d'inhibition.

Méthode d'incorporation des HE dans le milieu solide (quantitative)

On incorpore les produits témoins dans le milieu SC pour avoir des concentrations allant de 0,002µg/ml jusqu'à 256µg/ml avec un volume finale 20ml dans toute les boîtes de pétri, et deux milieux témoins sans et avec DMSO à 2,5% doivent être réalisés.

Les HE sont incorporés dans le milieu SC à 2% de Tween 80, afin d'obtenir des dilutions de 0,062µl/ml à 64µl/ml dans un volume final de 20ml dans les boîtes de pétri, un témoins sans HE doit être réalisé.

Le volume d'ensemencement par étallement est de 20µl par ¼ de boîte à partir de chaque suspension de *Candida* (*C.a.*, *C.t.*, *C.g.*) et d'*Aspergillus niger* (*A.n.*). La durée et la température d'incubation ont été de 48h à 28°C pour les *Candidas*, et 4j à 28°C pour l'*Aspergillus*.

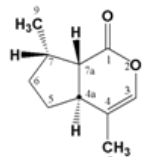
Les trois isolats de dermatophytes (*M.c.*, *M.g.*, *Tr.*) sont repiqués à l'aide d'un tracé de repiquage à trois compartiments, les fragments de chaque dermatophytes seront repiqués au niveau des 6 points de repiquages à chaque compartiment, l'incubation doit être faite à 28°C pendant 14j.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'antifongique en (µg/ml) ou d'huile essentielle en (µl/ml) inhibant toute culture visible à l'œil nu après la durée de culture.

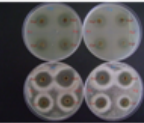
RÉSULTATS

Les compositions chimiques de différentes huiles essentielles de quatre espèces de genre *Nepeta* par l'entraînement à la vapeur d'eau.

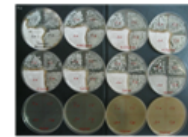
Temps de rétention T _R (min)	Identification	<i>Nepeta tuberosa</i> EVE (%)	<i>Nepeta atlantica</i> EVE (%)	<i>Nepeta granatensis</i> EVE (%)	<i>Nepeta cataria</i> EVE (%)
6.92	α-pinène	1.26	3.58	6.32	6.61
6.93	β-pinène	6.87	3.15	2.28	6.88
8.36	Camphène	6.29	5.58	1.67	6.92
11.57	Eucalyptol	3.19	3.68	23.98	6.96
12.03	Phellandrien	6.62	3.69	5.79	6.23
17.43	Sépénène	6.89	2.88	6.56	4.23
20.67	Sabinène	6.88	6.23	6.52	6.19
20.74	protonène	6.88	6.33	3.79	6.17
23.77	Limonène	6.93	6.23	6.24	4.99
24.13	Menthène	6.97	6.23	6.66	6.97
25.29	Thiénone	6.97	6.32	6.59	6.40
27.72	Bornane	6.88	6.33	6.65	6.28
28.12	Acétate de bornyle	6.63	6.54	3.27	6.36
30.88	Méthyle	3.97	6.63	6.26	6.23
32.88	Zéarène	6.53	6.57	1.68	6.26
33.67	Paléone	6.89	6.49	1.76	6.21
34.62	Théone	6.97	6.77	6.93	3.26
35.66	Sépénène	6.54	6.67	6.67	6.25
36.49	Caryophyllène	6.96	6.63	6.65	6.46
36.50	4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone	76.87	71.40	39.44	77.43
37.23	Dihydronaphtalène	3.76	3.64	2.66	4.76
38.96	Époxynaphtalène	6.77	6.86	6.93	6.14
40.63	Isométhylindolène	6.63	6.54	6.65	6.36
43.61	Caryophyllène	6.67	6.22	3.63	6.16
46.03	Caryophyllène	6.72	3.29	6.67	6.26
50.35	Furène	6.82	2.58	6.55	6.93



4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone



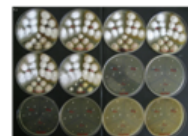
Effet inhibiteur des HE de 4 espèces du genre *Nepeta* sur les isolats fongiques par la méthode des puits dans la gélose



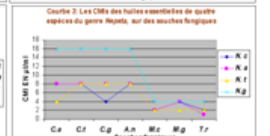
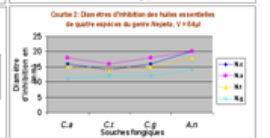
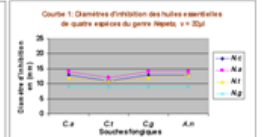
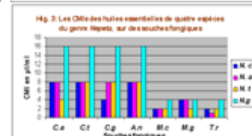
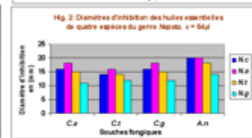
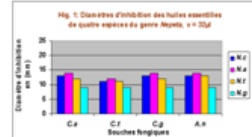
Les CMI de *Nepeta atlantica* sur les isolats fongiques de (*C.a.*, *C.t.*, *C.g.* et *A.n.*)



Les CMI de *Nepeta granatensis* sur les isolats fongiques de (*M.c.*, *M.g.* et *Tr.*)



Les CMI de *Nepeta tuberosa* sur les isolats fongiques de (*M.c.*, *M.g.* et *Tr.*)



DISCUSSION

Le dépeuplement des chromatogrammes après l'analyse des huiles essentielles montre la présence d'au moins 26 constituants différents représentant la composition chimique du genre *Nepeta*, nous avons pu constater que les HE des quatre espèces analysées ont des compositions chimiques similaires, ne différant qu'au niveau des constituants minoritaires, 25 constituants ont été identifiés et répartis en sesquiterpènes (10 %), monoterpènes hydrocarbonés (10 %) et monoterpènes oxygénés (80 %) dont un iridoïde lactonique de type nepetalactone, présent à des taux de 71 à 78 % dans les trois espèces de *Nepeta* (*atlantica*, *tuberosa* et *cataria*) et à un taux d'environ de 40 % chez l'espèce *N. granatensis*. Nous avons identifiés cet iridoïde comme étant le 4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone, grâce surtout à son pouvoir rotatoire spécifique [α]_D²⁰ = -24,4°, mais aussi à ses données caractéristiques en RMN¹³C : C₁ (120 ppm) et C₂ (32 ppm).

Les HE testés ont une particularité intéressante dans leur composition, par la présence d'un composé majoritaire, dans ce travail, nous avons mis en évidence l'effet des HE sur l'activité antifongique en tenant en compte leur teneur en 4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone.

L'activité antifongique des produits témoins testés sur des souches de la mycothèque de laboratoire à une charge de puits de 256µg/ml pour chaque produit antifongique, elle est variable d'un produit à l'autre en fonction de la sensibilité de chaque souche fongique. Mais de point de vue thérapeutiques et selon l'interprétation de la sensibilité de l'antifongogramme ce sont des isolats résistants.

Le DMSO sans produit antifongique donne aucune inhibition pour une charge de puits de 25µl de DMSO témoins, et l'incorporation DMSO à 2,5% dans les boîtes témoins en milieu solide ne donne aucune inhibition en comparant avec le témoins sans DMSO.

Toutes les HE à une charge de 32µl pour chaque puits ont montrées un effet inhibiteur sur les isolats des *Candidas* et d'*Aspergillus niger*, et que les HE de *N.c.*, *N.a.*, *N.t.* donnent des diamètres d'inhibition plus grandes que l'HE de *N.g.* (Fig.1; courbe 1).

Ce résultat a été confirmé en augmentant la charge des puits en HE à 64µl, par l'augmentation de l'effet inhibiteur des HE d'une manière proportionnelle de chaque HE vis-à-vis de chaque isolats fongique. (Fig. 2; Courbe 2)

Les HE de *N. cataria*, *N. atlantica*, *N. tuberosa*, ont montrées une activité (CMI) de l'ordre de 8µl/ml sur les *Candidas* et l'*Aspergillus niger*, par contre celle de l'HE de *N. granatensis* est de 16µl/ml. (Fig. 3; Courbe 3). Ces HE sont plus efficaces sur les dermatophytes que les *Candidas* et l'*Aspergillus*, avec une CMI de l'ordre de 2µl/ml pour les HE des *N. cataria*, *N. atlantica*, *N. tuberosa*, et de 4µl/ml pour l'HE de *N. granatensis* D'après l'interprétation des tests de sensibilité en aromathérapie "CMI < 50µl/ml" Excellent pouvoir inhibiteur, donc les HE de quatre espèces du genre *Nepeta* ont un excellent pouvoir inhibiteur contre les champignons pathogènes testés.

Cette différence au niveau d'activité antifongique entre les HE des espèces de genre *Nepeta*; peut être probablement due à la différence de composition concernant le constituant majoritaire, le 4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone.

CONCLUSION

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation, par le biais d'un apport scientifique, du potentiel aromatique et médicamenteux des plantes marocaines. Les compositions chimiques des huiles essentielles montrent sans ambiguïté une forte richesse en monoterpènes oxygénés dont le constituant principal est le 4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone. L'activité antifongique des HE de *N. atlantica*, *N. cataria*, *N. tuberosa*, est intéressante que l'HE de *N. granatensis*, qui est due à un taux élevé de nepetalactone. Probablement, le 4aa, 7a, 7aβ-nepetalactone est le produit responsable de l'activité antifongique.

References bibliographiques:

Boudida EL H, Alaoui K, Cherrah Y, et al. Toxicité aiguë et action analgésique des extraits globaux de *Nepeta atlantica* Ball et *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf) Maire. *Thérapie* 2006; 61 (4): 447 - 452.
Boudida EL H, Alaoui K, Cherrah Y, et al. Action analgésique de différents extraits non-volatils de *Nepeta atlantica* Ball et *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf) Maire. *Thérapie* 2008; 63 (4): 267- 344.
Zemami L, Boudida EL H, Hancali A, et al. The essential oils and antimicrobial activity of four nepeta species from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2(5), May 2008 pp. 111-114

RESUMES

RESUME

Titre : Etude phytochimique et évaluation de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc.

Auteur : Abdellatif SRIFI

Mots-clés : Genre *Nepeta* – Huiles essentielles – nepetalactone – Activité antifongique – In vitro.

Introduction : Le genre *Nepeta* appartient à la famille des lamiacées. Dans ce travail, notre objectif est d'une part l'identification des différents constituants chimiques des huiles essentielles de quatre espèces marocaines du genre *Nepeta* : *Nepeta tuberosa*, *Nepeta granatensis*, *Nepeta cataria* et *Nepeta atlantica*, et d'autre part de tester leur activité antifongique in vitro potentielle sur les champignons pathogènes *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* et *Trichophyton rubrum*.

Matériels et méthodes : Le matériel végétal est soumis à l'entraînement par la vapeur d'eau. L'analyse et l'identification des huiles essentielles est faite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG - SM). L'activité antifongique a été démontrée qualitativement et quantitativement successivement par deux méthodes, la méthode des puits dans la gélose, et la méthode de dilution des huiles essentielles en milieu solide Sabouraud chloramphénicol.

Résultats et discussion : Les huiles essentielles des quatre espèces analysées ont des compositions chimiques similaires, soit 25 constituants minoritaires et un constituant majoritaire de type nepetalactone. Concernant l'activité antifongique in vitro, *N. atlantica*, *N. cataria* et *N. tuberosa* montrent une activité plus importante que *N. granatensis*, ceci nous amène à supposer que l'activité antifongique de ces espèces est corrélée directement à leur teneur en 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone

Conclusion : L'activité antifongique des huiles essentielles de *N. atlantica*, *N. cataria*, *N. tuberosa*, est plus intéressante que celle de l'huile essentielle de *N. granatensis*. Ce résultat implique que le 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone serait le produit responsable de l'activité antifongique.

ملخص

العنوان: دراسة كيميائية النبات وتقييم النشاط المضاد فطري في الزجاج للزيوت الأساسية لأربعة أنواع من النباتات من صنف نبيطا بالمغرب.

الكاتب: عبد اللطيف اسريفي

الكلمات الأساسية: صنف نبيطا – زيوت أساسية – نبيطالاكتون – نشاط مضاد فطري – في الزجاج.

مقدمة: ينتمي الصنف نبيطا الى عائلة لميناصي (laminacées) وهدفنا من هذا العمل من جهة هو تحديد مختلف المكونات الكيميائية للزيوت الأساسية لأربع أنواع من النباتات بالمغرب من صنف نبيطا: نبيطا أطلنتيكا، نبيطا تبيروزا، نبيطا كطاغيا، نبيطا كرناطنسيس، و من جهة أخرى اختبار نشاطها المضاد فطري المحتمل على الفطريات الممرضة، كانديدا ألكانس، كانديدا طروبيكاليس، كانديدا كلابراطا، رشاشيات سوداء، بويغاء كلبية، بويغاء جبسية وحمرة شعروية.

مواد وأساليب: خضعت المادة النباتية للتقطير ببخار الماء، تم تحليل وتحديد الزيوت الأساسية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي ذا الطور الغازي مقرونة بقياس الطيف الكتلي. تم إثبات النشاط المضاد فطري وكيفيا و كميأ على التوالي بطريقتين، طريقة الآبار في الجيلوز، باستعمال حجمين مختلفين لتحميل الآبار، وطريقة تخفيف الزيوت الأساسية في الوسط الصلب صابوروكلورمفينيكول.

نتائج ومناقشة: تتميز الزيوت الأساسية المحللة لأربعة أنواع نباتية، بتركيبات كيميائية متشابهة، حيث شكل 25 مكونا ذا أقلية، ومكون واحد من نوع نبيطالاكتون ذا أغلبية. فيما يخص النشاط المضاد فطري بينت الأنواع الثلاثة: نبيطا أطلنتيكا، نبيطا تبيروزا، نبيطا كطاغيا، نشاطا أكثر أهمية من النوع نبيطا كرناطنسيس، و هذا يقودنا إلى الافتراض بأن النشاط المضاد فطري لهذه الأنواع النباتية مرتبط مباشرة بمحتواها من النبيطالاكتون.

خاتمة: يشكل النشاط الفطري للزيوت الأساسية ل نبيطا أطلنتيكا، نبيطا تبيروزا، نبيطا كطاغيا أكثر أهمية بالمقارنة مع الزيت الأساسي ل نبيطا كرناطنسيس. تدل هذه النتيجة على أن النبيطالاكتون قد يكون هو المادة المسؤولة عن النشاط المضاد فطري.

SUMMARY

Title: Phytochemical study and evaluation of the in vitro antifungal activity of essential oils of four species of the genus *Nepeta* in Morocco.

Author: Abdellatif SRIFI

Keywords: Genus *Nepeta* - Essential oils - nepetalactone - Antifungal activity - In vitro.

Introduction: The genus *Nepeta* belongs to the family Lamiaceae. In this work, our objective on the one hand the identification of different chemical constituents of essential oils of four species of the genus *Nepeta* Moroccan: *Nepeta tuberosa*, *Nepeta granatensis*, *Nepeta cataria* and *Nepeta atlantica*, secondly to test their potential antifungal activity in vitro on pathogenic fungi *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton rubrum*.

Materials and methods: The plant material is extracted by the method of steam distillation of water. The analysis and identification of essential oils is made by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The antifungal activity was demonstrated qualitatively and quantitatively successively by two methods, the method of wells in the agar using two different load volumes from wells, and the method of dilution of essential oils in solid Sabouraud chloramphenicol.

Results and discussion: The essential oils of four species studied have similar chemical compositions, or **25** minor constituents and constituent of type nepetalactone. On the antifungal activity, *N. atlantica*, *N. cataria* and *N. tuberosa* showed greater activity than *N. granatensis*, this leads us to assume that the antifungal activity of these species is directly correlated to their content 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone.

Conclusion: Antifungal activity of *N. atlantica* essential oils, *N. cataria*, *N. tuberosa*, is more interesting than the essential oils of *N. granatensis*. This result implies that the 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone is the product responsible for the antifungal activity.

ANNEXES

**Annexe 1 : Description botanique de *Nepeta tuberosa* L.ssp.*reticulata* (Desf.)
Maire** ^[17, 25, 26, 33, 52]

Classification botanique :

Règne :

végétal

Embranchement :

Angiosperme

Classe :

Dicotylédone

Famille :

Labiées

Genre :

Nepeta

Espèces :

Nepeta tuberosa L. ssp.
reticulata (Desf.) Maire.



Description : Plante à rhizome tubéreux, à tiges dressées, de 25-50cm de haut, simples, pubescentes à laineuses, parfois glutineuses. Feuilles à limbe crénelé, de 3-8 cm de long, les caulinaires dépassant largement les entre-nœuds, ovales lancéolées à oblongues, cordées à la base. Bractées florales de 8-12 x 4-8mm, ovales- lancéolées, toujours entières, membraneuses, réticulées, d'un blanc verdâtre, souvent teintées de rose sur les marges.

Habitat : La plante pousse dans les clairières fraîches des forêts, prairies un peu humides des basses montagnes calcaires et siliceuses, de 800 à 2000m d'altitude.

Floraison : de Mai à Juin.

Aire géographique :

Au Maroc : Rif ; Oriental (Gaada de Debdou) ; Moyen Atlas (Ifrane, Dayat Aoua, Dayat Chiker) ; Grand Atlas (Akka-n-Ouayad).

Dans le monde : Algérie, Péninsule ibérique

Annexe 2 : Description botanique de *Nepeta granatensis* Boiss [17, 25, 26, 33, 52].

Classification botanique :

Règne :

végétal

Embranchement :

Angiosperme

Classe :

Dicotylédone

Famille :

Labiées

Genre :

Nepeta

Espèces :

Nepeta granatensis Boiss.



Description : Plante dressées, de 80-160cm, glutineuse. Feuilles de 4-8cm, ovales cordées aigues, grossièrement côtelées, crénelées, pubescentes, les supérieures sessiles. Inflorescences en épis, rarement rameuses, à verticillastres distants. Bractées de 7-13 x 1-3mm, rougeâtres pourpres au sommet. Calice de 10-13mm, légèrement courbé, à dents subégales, de 4-5mm.

Habitat : Forêts et clairières, prairies humides des basses et moyennes montagnes calcaires et siliceuses, de 1400 à 2800m d'altitude.

Floraison : de Juin à Juillet.

Aire géographique :

Au Maroc : Moyen Atlas (Ras el Ma, Ifrane, Tioumliline, Jebel Hebri, Taffert).

Dans le monde : Espagne méridionale

Annexe 3 : Description botanique de *Nepeta cataria* L ^[17, 25, 26, 33, 52].

Classification botanique :

Règne :

végétal

Embranchement :

Angiosperme

Classe :

Dicotylédone

Famille :

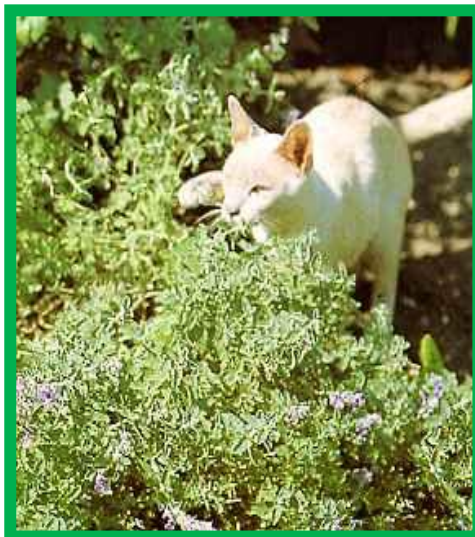
Labiées

Genre :

Nepeta

Espèces :

Nepeta cataria L



Appelée couramment herbe à chat car ces animaux adorent se coucher et se rouler dessus allant jusqu'à la détruire

Description : Plante vivace aromatique et duveteuse, 90-100cm de haut, feuilles vert grisâtre en forme de cœur, à odeur de menthe - Fleurs blanches en verticilles, piquetées de pourpre.

Habitat et Aire géographique : L'herbe aux chats est originaire de l'Europe et de l'Asie. Le nom commun de la plante vient sûrement du fait que les chats adorent cette plante. Si jamais ils en découvrent un plant ils vont se coucher en plein milieu ou encore se rouler dessus. Le nom *Nepeta* vient probablement de la ville de Nepeti où les Romains cultivaient la plante à une époque plus glorieuse. La plante était reconnue comme ayant quelques propriétés médicinales comme celle de guérir la lèpre et comme infusion pour aider à la digestion. Les gens ont longtemps cru que la plante éloignait les rats mais c'est probablement les chats attirés par la plante qui faisait fuir ces rats.

Floraison: Juillet à Septembre

Exigences de culture : Plein soleil ou ombre partielle. Sol normal et bien drainé.

Annexe 4 : Description botanique de *Nepeta atlantica* Ball ^[17, 25, 26, 33 52].

Classification botanique :

Règne :

végétal

Embranchement :

Angiosperme

Classe :

Dicotylédone

Famille :

Labiées

Genre :

Nepeta

Espèces :

Nepeta atlantica Ball.



Description : Plante endémique marocaine, dressée, de 40-80 cm, à tiges simples ou rameuses, mais pouvant être nombreuses et grêles naissant d'une grosse souche ; légèrement pubescente. Feuille lancéolées triangulaires, ou deltoïdes à ovales, dentées - crénelées. Inflorescences en longs épis. Bractées florales petites, de 2-3 mm de long.

Habitat : La plante pousse dans des clairières rocailleuses des forêts, pâturages rocailleux, éboulis, graviers des rivières des basses et moyennes montagnes calcaires et siliceuses.

Floraison : de Juin à Août.

Aire géographique : Plante endémique marocaine. Moyen Atlas (entre Boumia et Tounfit, Sources du Guigou sur rochers basaltiques, vers 1900m d'altitude); Grand Atlas (jebel Ayachi, Tagoudit, Taddert, Demnat, Asni, de 1000 à 2800m d'altitude) et Anti-Atlas (jebel Sargho).

Annexe 5 : Matériels, produits chimiques et milieux de culture.

- Agar bactériologique, type A (Janssen Chimica)
- Alcaline pepton water
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (SOLVACHIM)
- Eau distillée stérile
- Eau physiologique (NaCl à 0,9%)
- Glucose (ISOLAB)
- Extraits d'huiles essentielles
- Isolats fongiques (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* et *Trichophyton rubrum*)
- Milieu de culture Sabouraud Chloramphénicol (Bio-Rad)
- Milieu de culture Sabouraud Chloramphénicol Actidione (Bio-Rad)
- Peptone Bactériologique
- Produits antifongiques (AMB, FCZ, ICZ, TBF)
- Tween 80
- Bec bunsën
- Bain marie
- Lame de bistouri
- Micropipette de 200 et 1000 µl
- Ensementeur (pipette pasteur en râteau)
- Etuve réglée à 28°C, pour l'incubation des cultures
- Parafilm, Portoirs, Coton
- Gant, Marqueur pour le marquage des tubes et les boites de pétri
- Pipettes de 5 et 20 ml
- Autoclave, Poupinel (Four Pasteur)
- Tracé de repiquage
- Tubes à essai en verre de 30ml
- Tubes à hémolyse en verre de 5 ml
- Boîtes de Pétri en verre et en plastique stériles
- Vortex réglable

Annexe 6: Préparation des milieux de culture

La description de préparation des milieux de culture telles qu'elles sont indiquées par le fabricant, selon les formules suivantes:)

1. Milieu Sabouraud Chloramphénicol avec et sans Actidione.

- Formule : Milieu Sabouraud Chloramphénicol,
* Milieu Sabouraud Chloramphénicol.....42,5 g
* Eau distillée.....1000 ml
- Formule : Milieu Sabouraud Chloramphénicol Actidione,
* Milieu Sabouraud Chloramphénicol Actidione.....43g
* Eau distillée.....1000 ml

Chaque masse pesée, doit être versée dans 1 litre d'eau distillée,
Bien mélanger pendant 5min jusqu'à obtention d'une suspension homogène,
Chauffer lentement en agitant fréquemment jusqu'à complète dissolution,
Répartir le volume dans des flacons de 500 ml, bouché à l'aide de coton hydrophile,
Stériliser ces flacons contenant les milieux de culture à l'autoclave à 121°C, 1Bar pendant 20 min.
Conserver les flacons soigneusement fermés dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'au moment de l'utilisation.

2. Milieux de fructification:

2.1. Milieu Potato-Dextrose Agar (PDA).

→ Préparation d'extrait de pomme de terre:

Laver et couper 200 g de pomme de terre non pelées, les mettre dans un litre d'eau distillée, porter à l'ébullition une heure, filtrer sur gaz et compléter à un litre par l'eau distillée.

→ Formule de préparation :

- * Glucose20 g
- * Gélose de Sabouraud20 g
- * Extrait de pomme de terre1000 ml

Stériliser par l'autoclave à 121°C, 1Bar pendant 20 min,

Répartir à l'aide de pipette un volume de 20ml de ce milieu dans des boîtes stériles en plastique pour avoir une épaisseur de 0,5 mm.

Conserver ces boîtes au réfrigérateur à 4°C pendant un mois au maximum.

NB : Parfois on a rencontré un problème de contamination de ce milieu par les moisissures, on a décidé de modifier ce milieu par l'ajout de l'Actidione à raison de 0,5g /1000 ml de milieu, et on a obtenu un milieu modifié appelé PDA-Actidione.

=> Ce milieu sert à la fructification des dermatophytes

2.2. Milieu MALT.

→ Formule de préparation :

- Milieu Extrait de malt (poudre)45 g
- Eau distillée1000 ml

Mettre en suspension 45 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter à l'ébullition lentement en agitant jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C, 1 bar pendant 20 min. et répartir dans les tubes ou les boîtes.

=> Ce milieu sert à la fructification des Moisissures (*Aspergillus niger*).

2.3. Milieu Sabouraud Liquide.

→ Formule de préparation :

- * Glucose20 g
 - * Peptone Chapoteaux10 g
 - * Eau distillée1000 ml
- pH = 6 – 6,2.

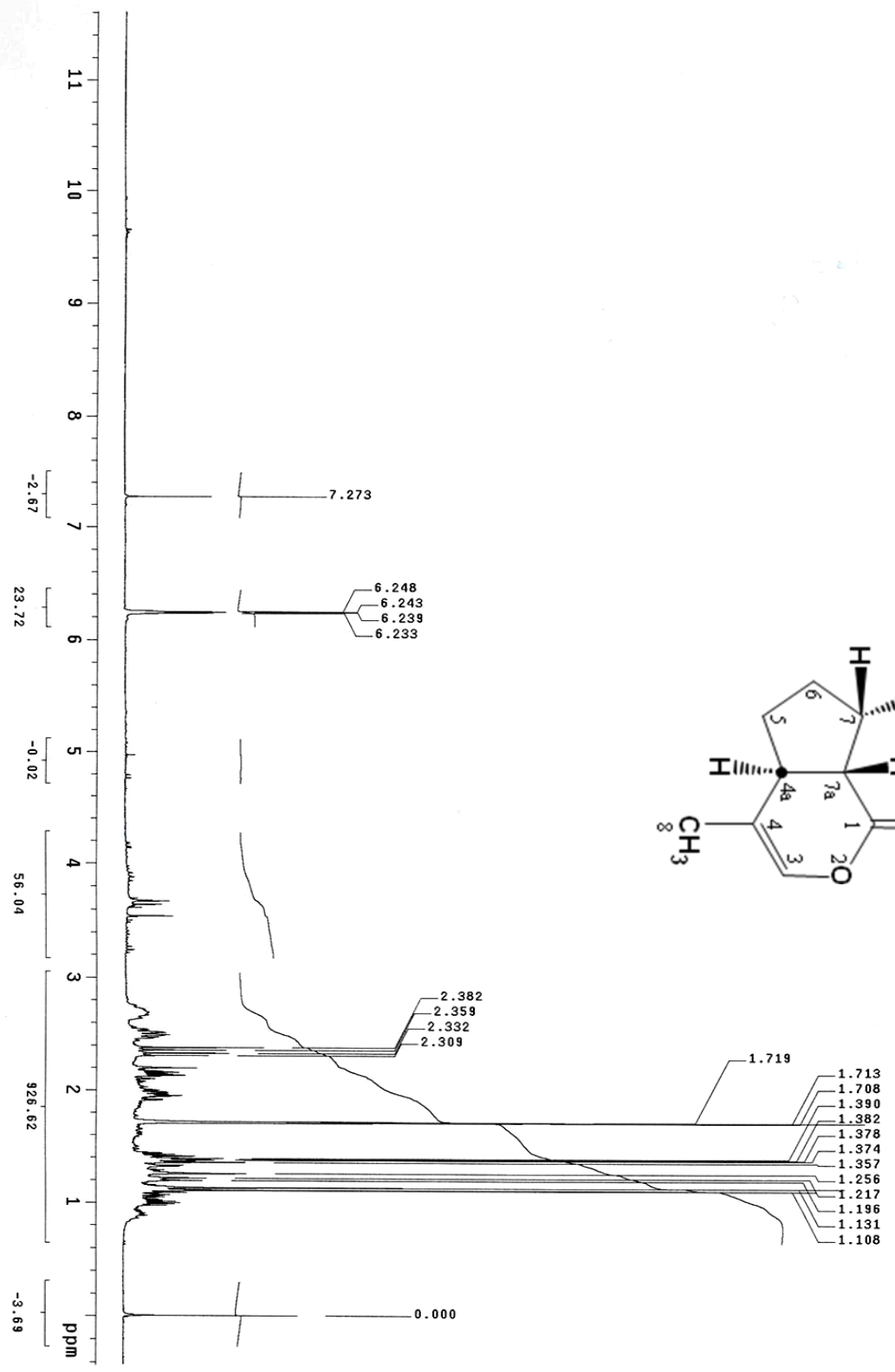
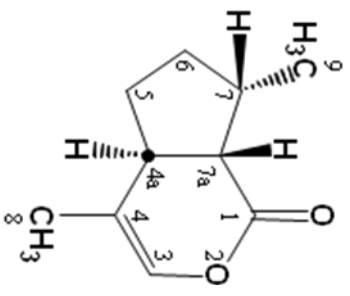
On verse 20 g de glucose et 10 g de peptone chapoteaux dans un litre d'eau distillée, on homogénéise bien jusqu'à obtention d'une suspension homogène, on chauffe lentement en agitant fréquemment jusqu'à complète dissolution, on vérifie le pH, si non on doit l'ajuster, par la soude ou l'acide chlorhydrique au 1/10^{ème}.

On répartit le milieu ainsi préparé dans des erlenmeyers de 500 ml, qu'on bouche hermétiquement avec du coton hydrophile puis on les stérilise à l'autoclave à 121°C, 1Bar pendant 20min.

Conserver ce milieu au réfrigérateur à 4°C.

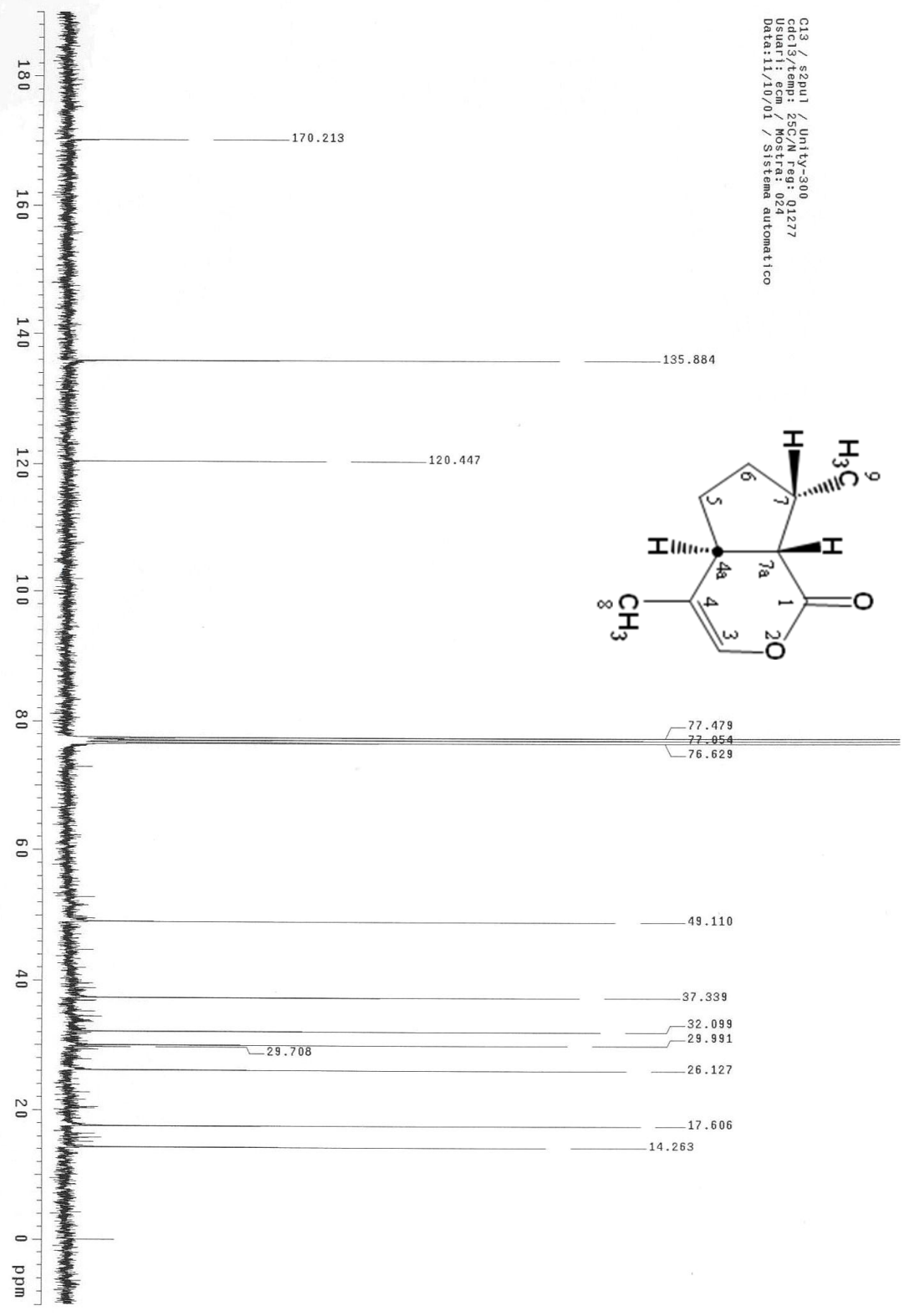
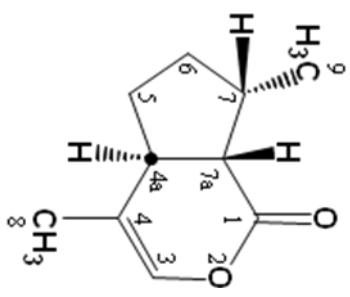
H1 / szpun1 / Unity-300
C0013 / 25C/N reg: 01277
Usuari: ecm / Mostra: 024 / Bochrà
Data: 11/10/01/Ope.: Anna

Annexe 7 : Spectre RMN ¹H de la nepetalactone [15]



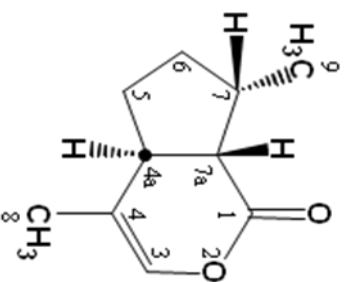
Annexe 8 : Spectre RMN ¹³C de la nepetalactone [15]

C13 / s2pu1 / Unité-300
 4112 / 4epn / 25C
 Usuari: f. mestrera / 9.024
 Data: 11/10/01 / Sistema automàtic

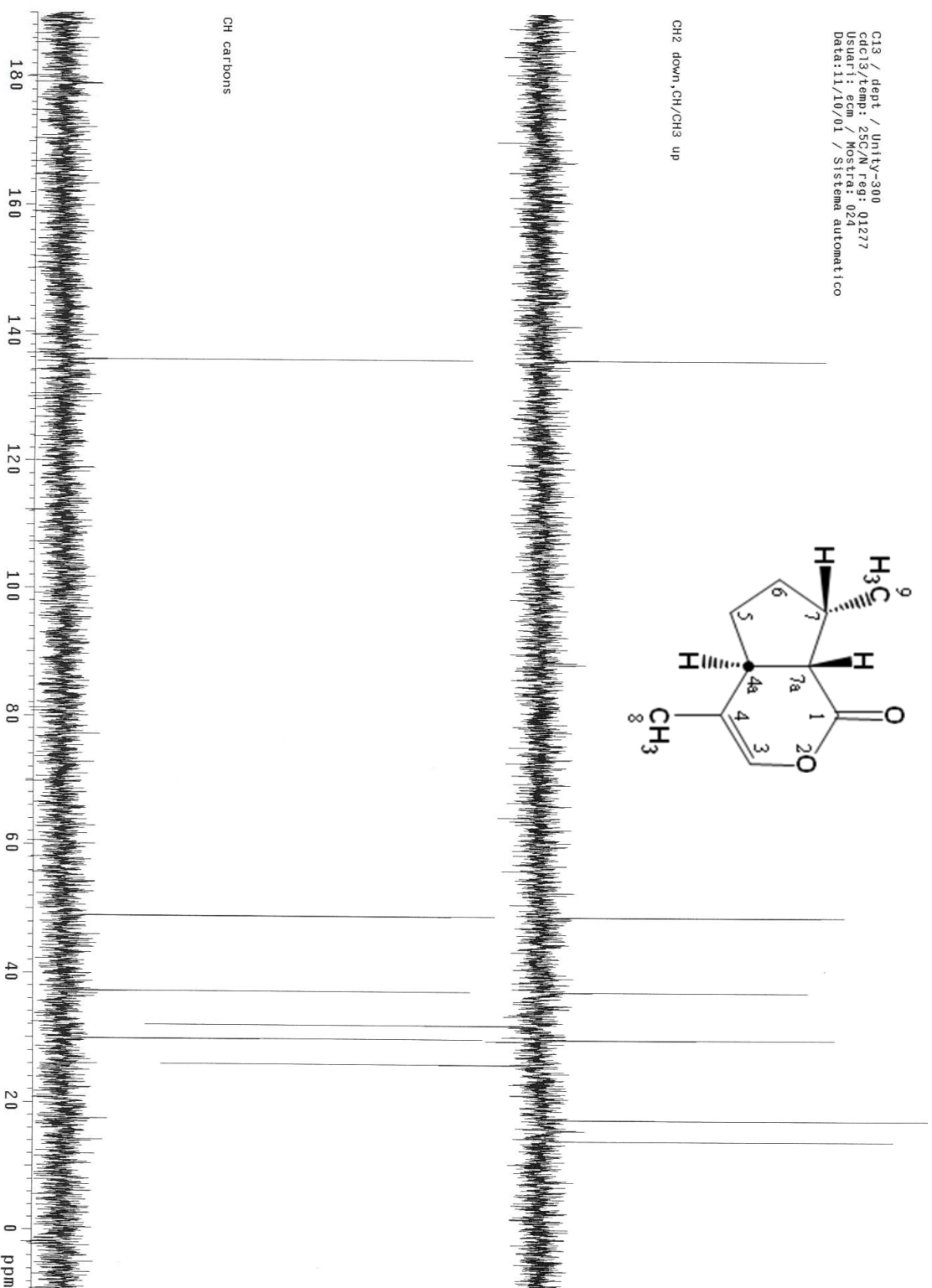


Annexe 9 : Spectre RMN ^{13}C (DEPT) de la nepetalactone [15]

C13 / Dept / Unity-300
C413 / Temp: 250/M temp: 01277
Usuari / Temp: 024 / M temp: 024
Data: 11/10/01 / Sistema automatico



CH2 down, CH/CH3 up

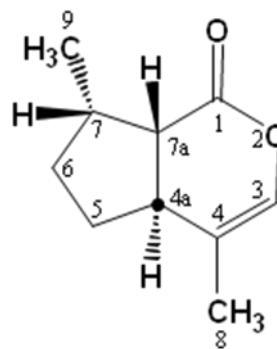
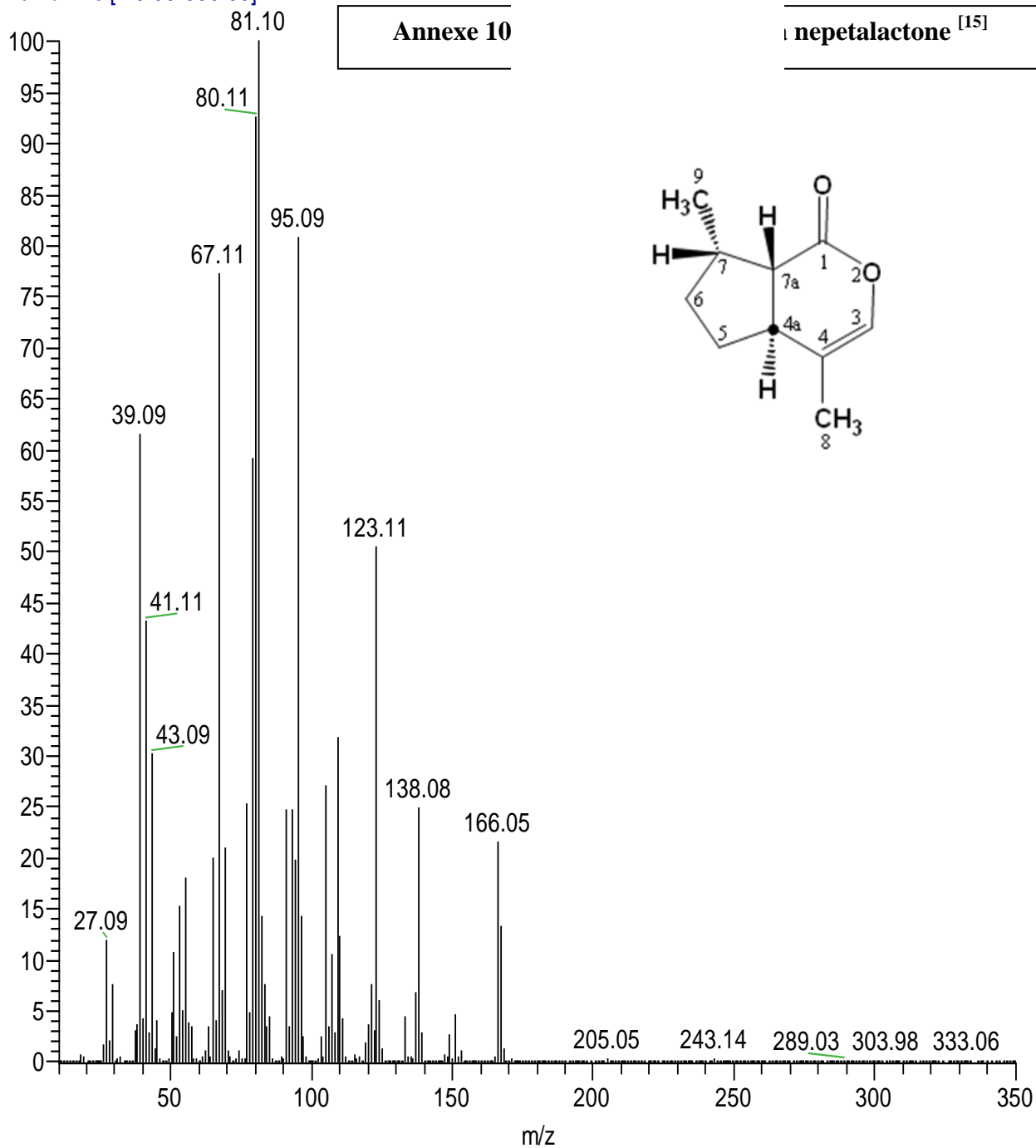


NTA4 #4127-4165 RT: 36.70-36.94 AV: 39 NL: 2.12E5

T: + c Full ms [10.00-350.00]

Annexe 10

nepetalactone^[15]



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Abraham OC, Manavathu EK, Jessica LC, and Pranatharthi HC.**In Vitro Susceptibilities of *Aspergillus* Species to Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* ; **1999** ; 33 : 7 – 11.
- [2] **Amarti F, Satrani B, et al.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicheranus* du Maroc. *Phytothérapie* ; **2008** ; 6: 342 – 347.
- [3] **Aydin S, Beis R, Öztürk Y, Hüsnü K, Baser C.** Nepetalactone: a new Opioid Analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *J Pharm Pharmacol* ; **1998** ; 50: 813 – 817.
- [4] **Aydin S, Dernier T, Öztürk Y, Hüsnü K, Baser C.** Analgesic Activity of *Nepeta italica* L..*Phytother Res* ; **1999** ; 13 : 20 – 23.
- [5] **Baser KHC, Ozek T.** Composition of the essential oil of *Nepeta caesarea* Boiss from Turkey. *Journal of essential oil research (USA)* ; **1994** ; 6 (6) : 645 – 646.
- [6] **Batajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA.** *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* ; **2004**; 48:1197 – 1203.
- [7] **Bellakhdar J.**La Pharmacopée marocaine traditionnelle. **1997** ; *Edition Ibis Press.*
- [8] **Benabid A.** In « Revue Marocaine de Pharmacognosie, d'étude ethnométriques et de botanique appliquée ». *Albiruniya* ; **1989** ; Tome 5 (N°2) : 92 – 97.
- [9] **Benabid A.** In « Flore et écosystèmes du Maroc, évaluation et préservation de la biodiversité ». *Ed. Ibis* ; **2000**. p : 157.

- [10] **Birgit W, Petra A, Alexander M H, Athanasios M, Manfred R, Michael S.** Susceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest®; *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; Mycology* ; **2000** ; 38(N°1) : 11 – 15.
- [11] **Blanc V, Eloy O, Sanchez R, Mallié M et al.** Pratique de l'antifongogramme dans 62 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médiale.* **2005** ; 15 ; 197 – 126.
- [12] **Bouidida EL H, Alaoui K, Cherrah Y, et al.** Action analgésique de différents extraits non-volatiles de *Nepeta atlantica* Ball et *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf.) Maire. *Thérapie* ; **2008**; vol.63 N°4: 267 – 344.
- [13] **Bouidida EL H, Alaoui K, Cherrah Y, et al.** Toxicité aiguë et action analgésique des huiles essentielles de *Nepeta atlantica* Ball et *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf.) Maire. *Phytothérapie* ; **2004**; vol.2 N°4: 120 – 125.
- [14] **Bouidida EL H, Alaoui K, Cherrah Y, et al.** Toxicité aiguë et action analgésique des extraits globaux de *Nepeta atlantica* Ball et *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf.) Maire. *Thérapie* ; **2006**; vol.61 N° 5: 447 – 452.
- [15] **Bouidida EL Houcine.** Contribution à la valorisation du potentiel aromatique et médicamenteux des plantes marocaines : Etude phytochimique, biologique et pharmacologique de quelques espèces du genre *Nepeta*. *Thèse de Doctorat (25 Janvier 2008)* ; N° 547/BOU ; Université Mohammed V - Agdal, Faculté des Sciences, Rabat.

- [16] **Bourkhiss M, et al.** Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science* ; **2007** ; 03 (2) : 232 – 242.
- [17] **Cohen E.** Travaux de l'institut scientifique chérifien. Publié par la société des sciences naturelles et physiques du Maroc avec une subvention du ministère de l'instruction publique des beaux-arts. N° 9 Rabat **1956**.
- [18] **Cotrim HC, Barroso JG, Figueiredo AC, et al.** Composition of essential oil from inflorescences of *Nepeta tuberosa* L. ssp. *Tuberosa* ; *Flavour and fragrance journal* ; **1994** ; 9 : 71 – 73.
- [19] **Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (teatreeoil). *J Appl Microbiol* ; **2000** ; 88: 170 – 175.
- [20] **De Pascual TJ, Urones JG, Sanchez MI, et al.** Diterpenoids from *Nepeta tuberosa* subsp. *reticulata*. *Phytochemistry* ; **1987** ; 26(5) :1481 – 1485.
- [21] **Edmund JE, Clinton EB, Rebeca L, Irvin W.** Structure and stereochemistry of 4 α β , 7 α , 7 α β -nepetalactone from *Nepeta mussini* and Ats Relations chip to the 4 $\alpha\alpha$, 7 α , 7 $\alpha\alpha$ and 4 $\alpha\alpha$, 7 α , 7 α β -nepetalactones from *N. Cataria*. *J. Org. Chem.* ; **1980** ; Vol. 45: 3811 – 3814.
- [22] **Eloy O, Blanc V, Mallié M, Decousser J W, Pina P, Allouch P Y.** Identification et sensibilité aux antifongiques de deux souches de *Candida* dans 95 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* ; **2005** ; 15 : 117 – 126.

- [23] **Eugénia P, Lígia R S, Carlos C, Ana P, Maria J.** In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* ; **2007** ; 26 : 135 – 141.
- [24] **Fan-Havard P, Capano D, Smith SM, et al.** Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* ; **1991** ; 35 : 2302 – 2308.
- [25] **Fennane M, Ibn Tatou M.** catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. **1998** ; *Bocconea* ; 8 : 102 – 103.
- [26] **Fennane. M, Ibn Tattou. M,** Flore vasculaire du Maroc, Inventaire et Chorologie. (*Travaux de l'Institut Scientifique, Série Botanique N° 37*, **2005**, Rabat), Vol : 1. pp : 260 – 261.
- [27] **Garg S, Naidu J, Singh S M, Nawange S R, Jharia N, Saxena M.** In vitro activity of terbinafine against Indian clinical isolates of *Candida albicans* and non-albican using a macrodilution method. *Journal de Mycologie Médicale* ; **2006** ; 16 : 119 – 125.
- [28] **Gaylord Chemical Corporation: (GCC).** Diméthylsulfoxyde (DMSO) Données de solubilités ; **2007** ; Bulletin n° 102B, Juillet.
- [29] **Gayosoa C.W, Lima E.O, Oliveira V.T, Pereira F.O, Souza E.L, Lima I.O, Navarro D.F.** Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia* ; **2005** ; 76 : 247 – 249.

- [30] **Ghannadi A, Aghzari F, Mehrabani M, Mohagheghzader A, Mehregan I.** Quantity and composition of the SDE Prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutic Research*. **2003** ; 103-105.
- [31] **Giordani R, Kaloustian J.** Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie* ; **2006**; 3: 121 – 124.
- [32] **Howard SJ, Webster I, Moore CB, Gardiner RE, Perlin DS, Denning DW.** Resistance d'*Aspergillus fumigatus* à plusieurs dérivés azolés, *Journal de Mycologie Médicale* ; **2007** ; 17 : S11 – S15.
- [33] **Jahandiz E, Maire R.** Catalogue des plantes du Maroc. **1934** ; Tome III ; *Edition Minerva*.
- [34] **Jyoti S, Mathela CS.** Antifungal Activity of New Compounds from *Nepeta leucophylla* and *Nepeta clarkei*. *Applied and Environmental Microbiology* ; **1996** ; Vol. 62 (N°2) : 702 – 704.
- [35] **Kalkanci A, Berk E, Aykan B, Caglar K, Hizel K, Arman D, Kustimur S.** Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from hospitalized patients. *Journal de Mycologie Médicale* ; **2007** ; 17 : 16 – 20.
- [36] **Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M.** Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie* ; **2008** ; 6: 160 – 164.

- [37] **Karaca N, Nedret A K.** In vitro susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods; *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Mycology* ; **2004** ; 48 : 259 – 264.
- [38] **Knobloch K, Pattli A, Iberl B, et al.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Ess Oil Res* ; **1989** ; 1 : 119 – 128.
- [39] **Koba K, et al.** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Ann. Méd. Vét* ; **2004** ; 148 : 202 – 206.
- [40] **Kokdil G, Topcu G, Krawiec M, et al.** Nepetanudone, a dimer from the alpha-pyrone 5,9-dehydronepetalactone. *J chem crystallogr* ; **1998** ; 28 (7) : 517 – 519.
- [41] **Loïc G.** Phytothérapie Moderne de la Tradition à la Science, Guide Familial de la Médecine par les Plantes, *Edition médicales Pierre Fabre Santé*, **1997** : 103-104.
- [42] **Malizia RA, Molli JS, Cardell DA, et al.** Volatile constituents of the essential oil of *Nepeta cataria* L. Grow i cordoba province (Argentina). *Journal of essential oil research (USA)* ; **1996** ; 8 (5) : 565 – 567.
- [43] **Michel P, Michel L,** Au Bonheur des Plantes aussi de recettes pratiques et médicinales concernant notre bien-être, *Edition Michel Lis*, **1999**:106-107.
- [44] **Neeraja LV, Inthumathi B, George JA, Pranatharthi HC, Elias KM.** Novel effect of voriconazole on conidiation of *Aspergillus* species. *International Journal of Antimicrobial Agents* ; **2004** ; 23 : 72 – 79.

- [45] **Niewerth M, Splanemann V, Korting HC, et al.** Antimicrobial susceptibility testing of dermatophytes, comparison of the agar macrodilution and broth microdilution tests. *Chemotherapy* ; **1998** ; 44 (1) : 31– 35.
- [46] **Nynke B, James K, Joanne J, Subramanyam V.** Modification of the fluorescein diacetate assay for screening of antifungal agents against *Candida albicans*: Comparison with the NCCLS methods. *Journal of Microbiological Methods* ; **2006** ; 66 : 234 – 241.
- [47] **Ouraïni D, Agoumi A, Alaoui M Belabbas M-A.I, Alaoui K, Cherrah Y, Benlemlih M, Belabbas M-A.** Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Phytothérapie* ; **2005** ; 1: 3 – 12.
- [48] **Ouraïni D, Agoumi A, Ismaïli-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Alaoui M-A, Belabbas M-A.** Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie* ; **2007** ; 1: 6 – 14.
- [49] **Ouraïni D, Agoumi A, Ismaïli-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M, Belabbas M-A.** Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie* ; **2005** ; 4: 147 – 157.

- [50] **Parisi-Duchêne E, Reibel C, Grawey I, Heller R, Mazurier I, Briel D, Moskovtchenko P.** Rapid antifungal susceptibility testing of fluconazole and amphotericin B by flow cytometry using FUN-1®: a preliminary study *Journal de Mycologie Médicale* ; **2006** ; 16 :126 – 133.
- [51] **Pharmacopée Européenne**, Edition 6.0, Tome 2, 01/**2008**.
- [52] **Quezel P, Santas S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. **1963** ; 11 : 818, *11 Edition du centre national de la recherche scientifique*.
- [53] **Renée G,** Les mycoses humaines: Démarche Diagnostique; collection Option Bio ; p: 346.
- [54] **Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM, et al.** Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis* ; **2002** ; 8 Suppl 2 : 151 – 160.
- [55] **Sanglard D, Odds FC.** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* ; **2002** ; 2: 73 – 85.
- [56] **Urones GJ, BasabeBarcala P, Sanchez Marcos I, et al.** Diterpenoids of *Nepeta tuberosa* subsp. *reticulata*. *Phytochemistry* ; **1988** ; 27 (6) : 1783 – 1787.
- [57] **Urones GJ, Sanchez Marcos I, Fernandez Ferreras J, et al.** Terpenoids from *Nepeta tuberosa* subsp. *Reticulata* (II). *Phytochemistry* ; **1988** ; 27 (2) : 523– 526.
- [58] **Valnet J.** Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. **1980**, *Edition malonique (Paris)*. pp: 282-283.

[59] **Volak J. Stodola J.** Plantes médicinales, *Edition Grund*.**1983** : 204.

[60] **Warris A, Weemaes CM, Verweij PE.** Multidrug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *N Engl J Med* ; 2002 ; 347: 2173 – 2174.

[61] **Zenasni L, Boudida EL H.** The essentials oils and antimicrobial activity of four *nepeta* species from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research* ; **2008** ; Vol. 2 (5) : 111 – 114.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
 - أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
 - أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
 - أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
 - لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

أطروحة رقم: 21

سنة: 2011

دراسة كيميائية النبات وتقييم النشاط المضاد فطري
في الزجاج للزيوت الأساسية لأربعة أنواع من النباتات
من صنف نبيطا بالمغرب

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرف

السيد: عبد اللطيف اسريفي

المزاد في 01 يناير 1975 بسيدي رضوان (وزان)

صيدلي داخلي بالمركز الإستشفائي الجامعي ابن سينا بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: صنف نبيطا - زيوت أساسية - نبيطالاكتون - نشاط مضاد فطري - في الزجاج.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس	السيد: يحيى الشراح أستاذ في علم الصيدلة
مشرف	السيد: بدر الدين لميموني أستاذ في علم الطفيليات
	السيدة: أمينة بنعودة أستاذة في علم الأحياء الدقيقة
أعضاء	السيدة: كاتم علوي أستاذة في علم الصيدلة
	السيد: جمال لمساوري أستاذ مبرز في الكيمياء العلاجية
عضو شرفي	السيد: الحسين بويددي دكتور في الكيمياء النباتية (م.و.م.أ)