

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT D'ÉTAT**

Centre de Recherche : Biotechnologie Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement (BIOBIO)

Structure de Recherche : Botanique et Valorisation des Ressources Végétales et Fongiques (BOVAREF)

Discipline : Biologie

Spécialité : Biotechnologie et Physiologie Végétales

Présentée et soutenue le : 06 / 07 /2022 par

QAMAR LAHLIMI ALAMI

**CONTRIBUTION A LA THERAPEUTIQUE CONTRE LA COVID-19
ET LA CANDIDOSE AU MAROC :**

**Activité antiagrégante de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa* L.
et activité antifongique de *Quercus suber* L.**

JURY

Salwa BENNANI	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Présidente
Lahcen ZIDANE	PES, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra	Rapporteur/Examineur
Hamid TABYAOUI	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Rapporteur/Examineur
Ahmed ELABOUDI	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Rapporteur/Examineur
Abdellah NAYA	PES, Faculté des Sciences Ain Chock, Université Hassan II, Casablanca	Examineur
Amine CHEIKH	Pharmacien, Directeur du Centre de Bioéquivalence de la Fondation Cheikh Zaid	Invité
Rachida HASSIKOU	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat.	Directrice de thèse

Année Universitaire: 2021-2022

DEDICACES

À mes parents,

À ma sœur et mes frères

À mon mari,

À mes fils

À tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse d'état a nécessité non seulement un investissement personnel mais aussi le soutien moral et l'apport scientifique de plusieurs personnes. Il a été réalisé au laboratoire Botanique et Valorisation des Ressources Végétales et Fongiques (*BOVAREF*) sous la direction bienveillante et de grande qualité scientifique et morale de Madame **Rachida HASSIKOU**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également aux éminents scientifiques qui m'ont fait l'honneur de siéger dans le jury de soutenance.

Un grand merci à Madame **Salwa BENNANI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens aussi à remercier Monsieur **Lahcen ZIDANE**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences Ibn Tofail de Kénitra d'avoir accepté d'évaluer ce travail, en tant que rapporteur-examineur.

Un grand merci à Monsieur **Hamid TABYAOU**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir pris sur son temps malgré ses nombreuses occupations et d'avoir accepté d'être rapporteur-examineur de ce travail.

Mes sincères remerciements à Monsieur **Ahmed EL ABOUDI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir accepté d'être rapporteur-examineur de ce travail, pour sa disponibilité et sa grande patience.

Je remercie chaleureusement Monsieur **Abdellah NAYA**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Ain Chock de Casablanca, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci également à Monsieur **Amine CHEIKH**, Directeur du Centre de Bioéquivalence de la Fondation Cheikh Zaid qui nous a honoré de sa présence et qui a bien voulu partager avec nous son savoir.

J'ai une grande reconnaissance pour les personnes et les établissements avec lesquelles j'ai collaboré pour l'aboutissement de ce travail. Je pense particulièrement aux collègues et amis du Centre de recherche de l'Université Internationale des Sciences de la Santé, au Département de Biologie de la Faculté des Sciences Hassan II de Casablanca et l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques.

Certains encouragements m'ont été particulièrement précieux pour mener à terme ce travail. Je pense aux membres de ma famille, particulièrement mon mari et mes fils ainsi qu'à mes amis, mes collègues notamment les BIObel pour leur soutien inlassable, leur gentillesse et leurs encouragements.

Résumé

Les virus et les champignons sont, à côté des bactéries et des parasites, les microorganismes les plus souvent mis en cause dans le cas des infections et des mycoses, et leur traitement par des agents chimiques conduit régulièrement à l'apparition d'effets secondaires et à la sélection de souches résistantes. Cette situation incite les chercheurs à proposer des alternatives accessibles qui garantissent efficacité et innocuité. Le présent travail s'inscrit dans cette dynamique et vise un double objectif. Il s'agit de mettre en lumière les propriétés thérapeutiques de quatre plantes médicinales marocaines communément utilisées en médecine traditionnelle en évaluant l'activité antivirale des extraits de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et de *Curcuma longa* L. sur l'activation plaquettaire des patients COVID-19, l'activité anticandidosique des extraits de l'écorce de *Quercus suber* L. sur la croissance de cinq souches de *Candida albicans* ainsi que la toxicité aiguë des quatre plantes testées. Les résultats ont démontré l'efficacité *in vitro* des extraits éthanoliques de *L. angustifolia*, *R. officinalis* et *C. longa* L. dans l'inhibition de l'hyperactivité plaquettaire lors d'une infection par le SARS-CoV-2 ainsi que l'effet anti-agrégant de *R. officinalis* et *L. angustifolia* inhibant ainsi la phosphorylation de la PKC δ . Concernant l'activité antifongique de l'écorce de *Quercus suber*, nos résultats montrent qu'elle varie selon la technique d'extraction et le solvant utilisés. Le meilleur effet fongicide contre les cinq souches de *Candida* a été enregistré avec l'extrait méthanolique obtenu par Soxhlet. Les essais de toxicité à des fins d'évaluation ont pour objectifs de déterminer les possibles effets indésirables et d'obtenir des informations pour définir le rapport exposition-réponse. Notre travail a donc mis en évidence l'innocuité des extraits de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa* L., *in vitro* alors que l'extrait de l'écorce de *Q. suber* L. s'est avéré modérément toxique, selon la classification admise.

Mots-clés : Activité antivirale – *Rosmarinus officinalis* – *Lavandula angustifolia* – *Curcuma longa* L. – Hyperactivation plaquettaire – COVID-19 – Activité antifongique – *Quercus suber* L. – *Candida albicans* – Toxicité aiguë

Abstract

Viruses and fungi are, as well as bacteria and parasites, the microorganisms most often implicated in the case of infections and mycoses, and their treatment with chemical agents regularly leads to the appearance of side effects and selection of resistant strains. This situation encourages researchers to propose accessible alternatives that guarantee efficacy and safety. The present work is part of this dynamic and has a double objective. It is a question of highlighting the therapeutic, antiviral and antifungal properties of four Moroccan medicinal plants commonly used in traditional medicine by evaluating the antiviral activity of extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* and *Curcuma longa* L. on the platelet activation of COVID-19 patients, the anticandidal activity of extracts from the bark of *Quercus suber* L. on the growth of five strains of *Candida albicans* and the acute toxicity of the four plants tested.

The results demonstrated the *in vitro* efficacy of ethanolic extracts of *L. angustifolia*, *R. officinalis* and *C. longa* L. in inhibiting platelet hyperreactivity during SARS-CoV-2 infection as well as the anti- aggregating effect of *L. angustifolia* and *R. officinalis* thus inhibiting the phosphorylation of PKC δ . Regarding the antifungal activity of the bark of *Quercus suber*, our results show that it varies according to the extraction technique and the solvent used. The best fungicidal effect against the five strains of *Candida albicans* was recorded with the methanolic extract obtained by Soxhlet. Toxicity testing for evaluation purposes aims to determine possible adverse effects and to obtain information to define the exposure-response relationship. Our work has therefore demonstrated the safety of extracts of *R. officinalis*, *L. angustifolia* and *C. longa* L., *in vitro*, while the extract of the bark of *Q. suber* L. has proven to be slightly toxic, according to the accepted toxicity classification.

Keywords : Antiviral activity –*Rosmarinus officinalis* – *Lavandula angustifolia* – *Curcuma longa* L. – COVID-19 – Platelet hyperactivation –Antifungal activity – *Quercus suber* L. – *Candida albicans* – Acute toxicity

ملخص

إلى جانب البكتيريا والطفيليات، تعتبر الفيروسات والفطريات الكائنات الحية الدقيقة الأكثر مساهمة في العدوى وداء الفطريات، وتؤدي معالجتها بالمواد الكيميائية إلى ظهور آثار جانبية وسلالات مقاومة. مما الباحثين على اقتراح بدائل بسيطة وفعالة تضمن السلامة. يعتبر البحث التالي جزءا من هذه الديناميكية وله هدف مزدوج. الأول هو تسليط الضوء على الخصائص العلاجية والفعالية في إبادة الفيروسات والفطريات لأربع نباتات طبية مغربية شائعة الاستخدام في الطب التقليدي، من خلال تقييم قدرتها مستخلصاتها وهي: إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* والخزامى الحقيقية *Lavandula angustifolia* والكرم الطويل *Curcuma longa* L. على تنشيط الصفائح الدموية لمرضى كوفيد COVID-19، ثم تقييم نشاط مستخلصات لحاء بلوط الفلين *Quercus suber* L. على نمو خمس سلالات من *Candida albicans*. أما الهدف الثاني فهو تقييم سمية مستخلصات هذه النباتات الأربعة المختبرة. أظهرت النتائج المخبرية المحصل عليها فعالية المستخلصات الإيثانولية للخزامى *L. angustifolia* وإكليل الجبل *R. angustifolia* لكبح فرط نشاط الصفائح الدموية أثناء العدوى بكوفيد 19 (SARS-CoV-2) بالإضافة إلى التأثير المضاد للتجمع لهاتين النباتيتين الطبيتين وبالتالي كبح فسفرة PKC δ . فيما يتعلق بفعالية مستخلص لحاء بلوط الفلين *Quercus suber* في إبادة الفطريات، تظهر نتائجنا أنها تختلف حسب تقنية الاستخلاص والمذيب المستخدم. وقد تم تسجيل أفضل تأثير لإبادة الفطريات ضد سلالات *Candida albicans* الخمس في حالة استخدام المستخلص الميثانولي الذي تم الحصول عليه بواسطة Soxhlet. أما اختبار السمية بهدف تقييم درجتها، فيرمي إلى تحديد الآثار الضارة المحتملة وتحصيل المعلومات اللازمة لمعرفة علاقة التعرض بالاستجابة. ومنه، فقد أظهرت دراستنا المخبرية سلامة مستخلصات إكليل الجبل *R. officinalis* والخزامى *L. angustifolia* والكرم *C. longa* L. من أي سمية، بينما أثبت سمية خفيفة لدى مستخلص لحاء بلوط الفلين *Q. suber* L. حسب تصنيف درجات السمية المقبولة.

الكلمات المفتاحية: كوفيد-19-COVID-19- فعالية ضد الفيروسات - فرط نشاط الصفائح الدموية -

-Candida albicans -Curcuma longa - Rosmarinus officinalis - Lavandula angustifolia
فعالية ضد الفطريات، بلوط الفلين - السمية

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1^{ERE} PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE I : INFECTIONS VIRALES CAS DU SARS-CoV-2, « COVID-19 »	6
I.1. Bref historique	7
I.2. Classification et caractéristiques du coronavirus COVID-19.....	1
I.3. Plaquettes sanguines : rôle et mécanismes d'activation	3
I.4. Hyperactivation des plaquettes chez les patients COVID-19.....	5
I.5. Propriétés antivirales des plantes médicinales.....	6
I.5.1. Extraits de quelques plantes et leurs propriétés thérapeutiques.....	7
I.5.2. Plantes et molécules naturelles utilisées en prévention ou en traitement de la COVID-19.....	9
I.5.3. Espèces étudiées.....	10
I.5.3.1. Monographie de <i>Rosmarinus officinalis</i>	11
I.5.3.2. Monographie de <i>Lavandula angustifolia</i>	19
CHAPITRE II : INFECTIONS MYCOSIQUES CAS DU <i>CANDIDA ALBICANS</i>	31
II.1. Les candidoses.....	32
II.1.1. <i>Candida albicans</i>	34
II.1.2. Classification et caractéristiques de <i>C. albicans</i>	35
II.1.3. Mode d'action.....	37
II.2. Plantes à activité antifongique.....	39
II.3. Monographie de <i>Quercus suber</i> L.....	40
CHAPITRE III : TOXICITE AIGÛE DE <i>QUERCUS SUBER</i> , <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> , <i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i> ET <i>CURCUMA LONGA</i> L.	47
III.1. Effets indésirables des plantes médicinales	49
III.2. Effets toxiques de certaines plantes	49
III.3. Activité pharmaco-toxicologique.....	51
III.4. Etude de la toxicité.....	52
2^{EME} PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE.....	54
CHAPITRE I : EVALUATION DE L'EFFET DES EXTRAITS DE <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> , <i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i> ET <i>CURCUMA LONGA</i> L. SUR L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE CHEZ LES PATIENTS COVID-19	55
I.1. Matériel et méthodes	57
I.1.1. Matériel	57
I.1.1.1. Profil clinique des patients	57
I.1.1.2. Matériel végétal.....	58
I.1.2. Méthodes.....	58
I.1.2.1. Extraction au Soxhlet	58
I.1.2.2. Isolement des plaquettes.....	59
I.1.2.3. Evaluation de l'activation plaquettaire par microscopie confocale	60
I.1.2.4. Détection de la phosphorylation de la PKC δ	61
I.1.2.5. Test d'agrégation plaquettaire	62
I.1.2.6. Essais de confirmation	63

I.1.2.7. Analyse spectrophotométrique des extraits.....	63
I.1.2.8. Analyses statistiques	63
I.2. Résultats et interprétation	64
I.2.1. Quantification de l'agrégation plaquettaire maximale.....	64
I.2.2. Translocation et phosphorylation de la PKC δ	67
I.2.3. Tests de confirmation : Effets du NaCl, du collagène à forte concentration et du tampon complet.....	69
I.2.4. Teneur en composés phénoliques	71
I.3. Discussion et conclusion	72
CHAPITRE II : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTICANDIDOSIQUE DES EXTRAITS DE L'ECORCE DE <i>QUERCUS SUBER</i> L. SUR 5 SOUCHES DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	75
II.1. Matériel et méthodes	77
II.1.1. Matériel.....	77
II.1.2. Méthodes	78
II.1.2.1. Méthodes d'extraction	78
II.1.2.2. Calcul du rendement des extraits	78
II.1.2.3. Dénombrement des colonies de <i>Candida albicans</i> par la méthode de dilution.....	79
II.1.2.4. Tests anticandidosiques	79
II.1.2.5. Sensibilité au Fungizone	81
II.1.2.6. Analyses statistiques	81
II.2. Résultats et discussion.....	81
II.2.1. Rendement des extraits	81
II.2.2. Détermination du nombre d'unités formant colonie (UFC) des souches fongiques	83
II.2.3. Détermination de l'activité antifongique des extraits de <i>Quercus suber</i> L. sur la croissance de <i>Candida albicans</i>	85
II.2.4. Résistance des souches de <i>C. albicans</i> étudiées au Fungizone	87
II.2.5. Profils Fongicide/Fongistatique.....	87
II.3. Discussion et conclusion	89
CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE AIGÛE DE <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> , <i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i> , <i>CURCUMA LONGA</i> L. ET <i>QUERCUS SUBER</i> L.	93
III.1. Matériel et méthodes.....	95
III.1.1. Matériel	95
III.1.1.1. Matériel végétal	95
III.1.1.2. Matériel animal.....	95
III.1.2. Méthodes	96
III.1.2.1. Extraction par Soxhlet	96
III.1.2.2. Test de la toxicité aiguë des extraits testés	97
III.1.2.3. Analyses statistiques.....	99
III.2. Résultats et interprétation	100
III.2.2. Etude de la toxicité aiguë de <i>Quercus suber</i>	100
III.2.3. Evaluation de la toxicité de <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> et <i>Curcuma longa</i>	103

III.3. Discussion et conclusion.....	108
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
ANNEXES.....	139

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Structure des coronavirus (Eujuanes, 2001)	2
Figure 2 : Réponse à l'infection par le SARS-CoV-2 (Manne et al, 2010).....	3
Figure 3 : Réponse des plaquettes à une blessure vasculaire (Gachet, 2013)	3
Figure 4 : Mécanismes d'activation plaquettaire (Barrett et al, 2021)	4
Figure 5 : Schéma de <i>Rosmarinus officinalis</i>	13
Figure 6 : Répartition du romarin spontané au Maroc (Haut-commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte contre la Désertification, 2017)	14
Figure 7 : Evénements de la réponse immunitaire face à la COVID-19 (Satoh et al, 2022) ...	18
Figure 8 : Schéma de <i>L. angustifolia</i>	21
Figure 9 : Aire de répartition des espèces de lavandes dans le monde (Guitton, 2012)	22
Figure 10 : Aire de répartition des lavandes au Maroc (Bachiri et al, 2015)	23
Figure 11 : Schéma de <i>Curcuma longa</i>	27
Figure 12 : Sites d'infection de <i>C. albicans</i> et facteurs aggravant des candidoses (d'Enfert et al, 2020).....	34
Figure 13 : Schéma des différentes étapes d'interaction <i>C. albicans</i> - cellules épithéliales (Zhu et Filler, 2010)	36
Figure 14 : Formation du microfilm de <i>C. albicans</i> (Kojic et Darouiche, 2004).....	38
Figure 15 : : Répartition spatiale des chênes sclérophylles dans le bassin méditerranéen.....	41
Figure 16 : Quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités (ou non) avec les extraits éthanoliques des plantes testées, en réponse à une dose faible de collagène.....	64
Figure 17 : Evaluation de l'agrégation des plaquettes des patients COVID-19 non traitées et celles traitées par les extraits de plantes.....	65
Figure 18 : Quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités (ou non) avec les extraits éthanoliques des plantes testées, en réponse à une dose élevée de collagène.....	66
Figure 19 : Image par microscopie confocale de plaquettes de patients COVID-19, en réponse à une faible dose de collagène (Gr: 63x).....	67
Figure 20 : Analyse des lysats plaquettaires par SDS-PAGE pour P-PKCdelta Tyr311 (Immunoblot supérieur, représentatif de 5 donneurs)	68
Figure 21 : Quantification de l'agrégation des plaquettes incubées dans NaCl (n=5)	70
Figure 22 : Quantification de l'agrégation des plaquettes incubées dans le tampon complet (n=5)	70

Figure 23 : Unités formant des colonies des souches de <i>C. albicans</i> isolées à partir d'ongles de doigts (L2 et L5), d'un prélèvement buccal (L13), d'un cathéter ombilical (L12) et d'un ongle d'orteil (L14).....	83
Figure 24 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de <i>Q. suber</i> L. testés sur cinq souches de <i>C. albicans</i> (L2: souche prélevée sur l'ongle; L13: souche du prélèvement buccal; L2 et L5: souches d'ongles de doigts; L12: souche du cathéter ombilical	84
Figure 25 : Evolution du poids après injection par voie IP de l'extrait de Soxhlet de <i>Q. suber</i>	101
Figure 26 : Evolution du poids après injection de l'extrait méthanolique de <i>Q. suber</i>	102
Figure 27 : Courbe de toxicité aiguë de l'extrait de <i>Q. suber</i>	102
Figure 28 : Variation du poids des souris du lot témoin (en grammes)	104
Figure 29 : Variation du poids des souris du lot traité par l'extrait de <i>R. officinalis</i> (en grammes)	105
Figure 30 : Variation du poids des souris du lot traité par l'extrait de <i>L. angustifolia</i> (en grammes).....	106
Figure 31 : Variation du poids des souris du lot traité par l'extrait de <i>C. longa</i> (en grammes)	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés thérapeutiques de <i>Rosmarinus officinalis</i>	16
Tableau 2 : Propriétés thérapeutiques de <i>Curcuma longa</i>	29
Tableau 3 : Produits antifongiques de synthèse généralement prescrits	39
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques des patients	57
Tableau 5 : Composés phénoliques des extraits méthanoliques des plantes utilisées.....	71
Tableau 6 : Substrat d'origine des cinq souches de <i>C. albicans</i> étudiées.....	77
Tableau 7 : Rendement des extraits de l'écorce de <i>Q. suber</i> L. des trois méthodes d'extraction (%).....	82
Tableau 8 : Effet fongicide du Fungizone sur la croissance des souches de <i>C. albicans</i>	87
Tableau 9 : Effet fongicide (MFC) et fongistatique (CFS) des extraits d'écorce de <i>Q. suber</i> sur les 5 souches de <i>C. albicans</i>	87
Tableau 10 : Signes cliniques observés chez les souris après administration intra-péritonéale de l'extrait de <i>Q. suber</i>	100
Tableau 11 : Evaluation du comportement des souris et symptômes relevés durant 14 jours après administration des extraits de plantes.....	103

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Vue au microscope électronique du virus SARS-CoV2	2
Photo 2 : : Fleurs de <i>Romarinus officinalis</i>	13
Photo 3 : Fleurs de <i>L. angustifolia</i>	21
Photo 4 et Photo 5 : fleur et rhizome.....	27
Photo 6 : <i>Quercus suber</i> de la Maamora	43
Photo 7 : Glands de <i>Quercus suber</i>	43
Photo 8 et Photo 9 : Appareil de Soxhlet et Rotavapeur du Laboratoire de Botanique de la FSR	59
Photo 10 : Agrégomètre optique à 8 canaux (Hôpital Universitaire International Cheikh Zaid)	62
Photo 11 et Photo 12 : Souris de l'animalerie de la FSR	96
Photo 13 : Administration de l'extrait aqueux par voie orale (gavage)	98
Photo 14 : Organes prélevés chez une souris témoin	107
Photo 15 : Organes prélevés chez une souris traitée	108

LISTE DES ABREVIATIONS

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ANPMA : Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques

NDF : Neutral Detergent Fiber

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

vWF : Facteur von Willebrand

PKC : Protein Kinase

RACK1 : Receptor for Activated Protein Kinase C-1

SCA : Syndrome Coronarien Aigu

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

ER : Réticulum endoplasmique

CAPM : Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

ALAT : Alanine Aminotransférase

ASAT : Aspartate Aminotransférase

LDH : Lactate déshydrogénase

CCMM : Collections Coordonnées Marocaines de Micro-organismes

LMBM : Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire

CNRST : Centre National de la Recherche Scientifique et Technique

PBS : solution saline tamponnée au phosphate

BCA : Bicinchoninic Acid

PBS : Phosphate Buffered Saline

TXA₂ : Thromboxane A₂

GACVS : The Global Advisory Committee on Vaccine Safety

INTRODUCTION

En mai 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié un document résumant sa position concernant l'utilisation des plantes médicinales. Intitulé « l'OMS soutient une médecine traditionnelle reposant sur des éléments scientifiques probants », ce texte apporte une nouvelle caution à l'utilisation des plantes médicinales. Il évoque cependant la nécessité de recourir à une démarche scientifique pour prouver l'effet thérapeutique de ces plantes.

Depuis des décennies, on assiste à l'apparition et à la propagation d'affections pour lesquelles les traitements prescrits sont peu ou pas efficaces et peuvent comporter des effets secondaires indésirables. Les champignons sont souvent responsables d'infections et de mycoses et l'apparition de souches résistantes est une conséquence inévitable de nombreux traitements antifongiques couramment prescrits (Carvalho *et al*, 2007).

Cette situation incite les chercheurs à proposer des alternatives accessibles qui garantissent efficacité et innocuité. D'ailleurs et malgré le progrès de la pharmacologie et la chimie organique de synthèse, les plantes sont toujours largement utilisées et même recommandées par les thérapeutes et les organisations publiques de santé comme l'Organisation Mondiale de la Santé (Kamou, 2017). En effet, plusieurs travaux scientifiques ont prouvé l'effet thérapeutique des remèdes traditionnels à partir de produits naturels qui pourraient remplacer les médicaments comportant des effets secondaires.

Le Maroc, riche de plus de 4.800 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires, constitue un véritable réservoir phytogénétique (Fennane et Rejdali, 2012). Parmi ces plantes, 940 taxons sont endémiques (Fennane *et al*, 2022) et 978 sont des plantes aromatiques et médicinales (Fakchich et Elachouri, 2021).

De ce fait, le Maroc se trouve en position idéale de par cette richesse, de la connaissance et de la pratique ancestrale de sa population ainsi que de la vitalité de sa recherche scientifique menée par des équipes pluridisciplinaires.

A l'heure actuelle, les plantes sont de plus en plus utilisées pour soigner. En effet, grâce aux études scientifiques basées sur l'observation, l'expérimentation et une multitude d'analyses, les prescriptions empiriques des plantes médicinales gagnent de plus en plus de crédibilité (Fournier, 1999).

Des médicaments à base de plantes sont ainsi commercialisés et utilisés pour leurs multiples actions : antalgique, anti inflammatoire, antibactérienne, antivirale, antifongique, ... Ainsi, plus

de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés proviennent directement ou indirectement des plantes (Chowdhary et *al*, 2017).

Ces phytomédicaments jouissent d'une popularité grandissante et bénéficient d'une autorisation de mise en marché qui donne au consommateur des garanties de qualité et d'efficacité (Lalami et *al*, 2013), leur activité ayant été prouvée par différentes études (Arakawa et *al*, 2009), (Da Silva, 2014) et (Sun et *al*, 2020).

En 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé a alerté le monde sur l'émergence d'une pneumonie virale d'une grande ampleur causée par un nouveau coronavirus zoonotique ; il s'agit du SRAS-CoV-2, « COVID-19 ». Le taux de mortalité rapporté dans diverses études est estimé à environ 6,9% des cas confirmés (Zhu et *al*, 2020).

Au Maroc, à la date du 06 juin 2022, le Ministère de la Santé a publié les chiffres d'environ 1.170.427 cas cumulés et 16.080 décès.

Le contexte actuel créé par cette pandémie souligne l'absence de médicaments spécifiques. En effet, à l'heure actuelle et cela depuis plus de deux ans, le vaccin reste le seul moyen disponible pour freiner la pandémie. Cependant et comme pour tout vaccin, les vaccins anti-COVID-19 disponibles peuvent provoquer des effets indésirables plus ou moins graves (GACVS 2021, OMS 2021).

De plus, en raison de facteurs mettant à l'épreuve l'efficacité du bouclier vaccinal, notamment la fréquence de mutations et la capacité d'adaptation de ce virus, la vigilance scientifique reste de mise et la recherche de nouveaux médicaments est essentielle, surtout pour les personnes qui ne peuvent être vaccinées en raison d'antécédents médicaux (Escalón 2021).

Un autre problème de santé publique, et non de moindre importance, se pose avec de plus en plus d'acuité aux niveaux national et international. Il s'agit d'un constat d'échec, récurrent au demeurant, de l'efficacité des médicaments anti-infectieux. En effet, durant ces dernières années, on constate que malgré tous les efforts déployés par la médecine, les maladies infectieuses connaissent une forte recrudescence. Les candidoses, par exemple, constituent des affections opportunistes très fréquentes (Dhanani et *al*, 2017) qui sont actuellement reconnues comme étant la cause de maladies graves (Burlacu et *al*, 2020).

De plus, on constate que la sensibilité vis-à-vis des produits antifongiques diminue chez certaines souches de *Candida* du fait de la pression médicamenteuse, des phénomènes de mutations et de la forte progression des infections opportunistes (Scherrer et *al*, 2005). Parmi

toutes les levures isolées en clinique, *Candida albicans* est la levure la plus fréquemment isolée (66,5%) suivi de *Candida tropicalis* (4,2%) (Goncalves et al, 2016). Ainsi les candidoses sont actuellement classées parmi les infections graves pouvant engendrer un taux élevé de mortalité et de morbidité chez les immunodéprimés et les malades souffrant du diabète (Burlacu et al, 2020). *Candida albicans* est la cause dans 70 à 80% des cas de candidoses humaines. C'est l'agent des mycoses cutanées, digestives intestinales, génitales, broncho-pulmonaires, etc... (Khan et al, 2019).

La recherche de solutions alternatives aux médicaments conventionnels ayant montré leurs limites devient donc une nécessité impérieuse.

Le présent travail s'inscrit dans cette dynamique et vise un double objectif. Il a pour but de mettre en exergue les propriétés thérapeutiques, antivirales et antifongiques, de quatre plantes médicinales marocaines communément utilisées en médecine traditionnelle.

Ainsi, cette étude s'articule autour de trois axes :

- Evaluation de l'activité antivirale des extraits de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et de *Curcuma longa* L. sur l'activation plaquettaire des patients infectés par la COVID-19 ;
- Evaluation de l'activité anticandidosique des extraits de l'écorce de *Quercus suber* L. sur la croissance de cinq souches de *Candida albicans* ;
- Evaluation de la toxicité aigüe des plantes testées : *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Curcuma longa* L. et de *Quercus suber* L.

1^{ère} partie :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Infections virales

Cas du SARS-CoV-2, « COVID-19 »

I.1. Bref historique

En 2020, une pneumonie virale d'une grande ampleur causée par un virus jusque-là inconnu a émergé en Chine. L'OMS a attribué le nom de SARS-CoV-2 à ce coronavirus car il est très proche du SARS-Cov-1 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus) apparu il y a deux décennies en Chine, également. Ce nom, pour lequel a opté le Comité International de la Taxonomie des Virus, doit faciliter la communication entre scientifiques, explique l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Pour ce qui est du nom de la pathologie, c'est différent : il doit permettre de faciliter la communication auprès du grand public afin d'organiser la riposte grâce à la prévention de la propagation. C'est l'OMS qui organise cette riposte, et c'est donc cette organisation qui a décidé du nom dans le cadre de la classification internationale des maladies.

« We now have a name for the #2019nCoV disease : COVID-19. I'll spell it : C-O-V-I-D hyphen one nine – COVID-19 » a déclaré le directeur général de l'OMS, Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus, dans un Tweet, le 11 février 2020.

Ce nouveau coronavirus est responsable d'une maladie infectieuse respiratoire aiguë contagieuse apparue en décembre 2019 à Wuhan, dans la province du Hubei, en Chine (Zhu et *al*, 2020). En mars 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé a déclaré dans son rapport

« Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 » que le SARS-CoV-2 est un problème international de santé publique et qu'il s'agit d'une pandémie, en regard de sa transmission alarmante et rapide à un grand nombre de pays à travers le monde et le niveau élevé de morbidité et de mortalité (Hui et *al*, 2020).

A la date du 2 novembre 2020, le nombre total d'infections confirmées à la COVID-19 dans le monde est estimé à plus de 46 millions, et le nombre de décès à plus d'un million de personnes. Ces chiffres ne cessent d'augmenter sans aucun signe de répit ([OMS Coronavirus Disease, 2020](#)). Les Etats-Unis ont ainsi franchi le seuil de 1 million de morts en mai 2022. En outre, l'OMS a annoncé que la maladie a entraîné des perturbations dans les services médicaux, y compris de nombreux hôpitaux et cliniques dans le monde entier (OMS, 17 avril 2020).

Le pourcentage de mortalité du SARS-CoV-2 a été rapporté dans diverses études et est estimé à environ 6,9% des cas confirmés, mais il peut varier considérablement (Zhu et *al*, 2020), par exemple ~0,1% à Singapour et ~15,4% en Belgique (Université Johns Hopkins). Les résultats accumulés ont révélé que le taux de mortalité du SARS-CoV-2 est inférieur à celui du SARS-

CoV ou du MERS-CoV, avec des taux de 10 % et 37,1 % respectivement, mais que le SARS-CoV-2 est dix fois plus contagieux que les autres infections virales (Lescure et *al*, 2020). Les méthodes statistiques ont déterminé que le taux infectieux du SARS-CoV-2, qui est présenté comme R_0 , se situe approximativement entre 1,3 et 6,5, avec une moyenne de 3,3 (Sen-Crowe et *al*, 2021).

Au Maroc, le Ministère de la santé, sur son site officiel, rapporte les chiffres suivants : 1 169 920 de cas cumulés et 16 079 décès cumulés à la date du 5 juin 2022.

De nombreux rapports indiquent que le SARS-CoV-2 a une période d'incubation de 2 à 14 jours avec une capacité de transmission asymptomatique élevée, et cette caractéristique pourrait bien être un facteur contribuant à la propagation rapide du virus (Ahn et *al*, 2020). Le schéma de l'épidémie montre que toutes les races et tous les âges sont sensibles à l'infection. Cependant, les taux de maladies graves et de mortalité sont plus fréquents chez les personnes âgées et celles présentant des comorbidités telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et l'hypertension artérielle (Chen et *al*, 2020).

I.2. Classification et caractéristiques du coronavirus COVID-19

La dernière classification divise la famille des *Coronaviridae* en deux sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Letovirinae*. Il existe quatre genres dans la sous-famille des *Coronavirinae* : Alpha, Beta, Gamma et Delta-coronavirus. Plusieurs coronavirus pathogènes humains ont été identifiés, avec les NL63 et 229E dans le genre Alpha, et OC43, HKU1, SARS, MERS et SARS-CoV-2 appartenant au genre Beta (Wang et *al*, 2019).

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN linéaire simple brin, d'environ 30kb et de polarité positive et peut donc être directement traduit en protéine. Il code pour 7 à 10 protéines (Rensen et *al*, 2022). Les deux tiers du génome viral, à l'extrémité 5', code pour les polyprotéines pp1ab et pp1a, fracturées en 15 protéines non structurales.

Du côté opposé (extrémité 3'), le génome du virus porte l'information génétique codant pour quatre protéines structurales, dont le pic de surface (S), la matrice (M), l'enveloppe (E), la nucléocapside (N) et huit protéines accessoires (Figure 1 et Photo 1).

Les protéines structurales et accessoires participent à la morphogénèse virale et à l'interférence avec le système immunitaire de l'organisme infecté, tandis que les protéines non structurales sont impliquées dans la réplication du virus. La glycoprotéine de pointe est nécessaire à la fixation aux récepteurs de la cellule hôte et détermine le tropisme tissulaire (Zhang *et al.*, 2020).

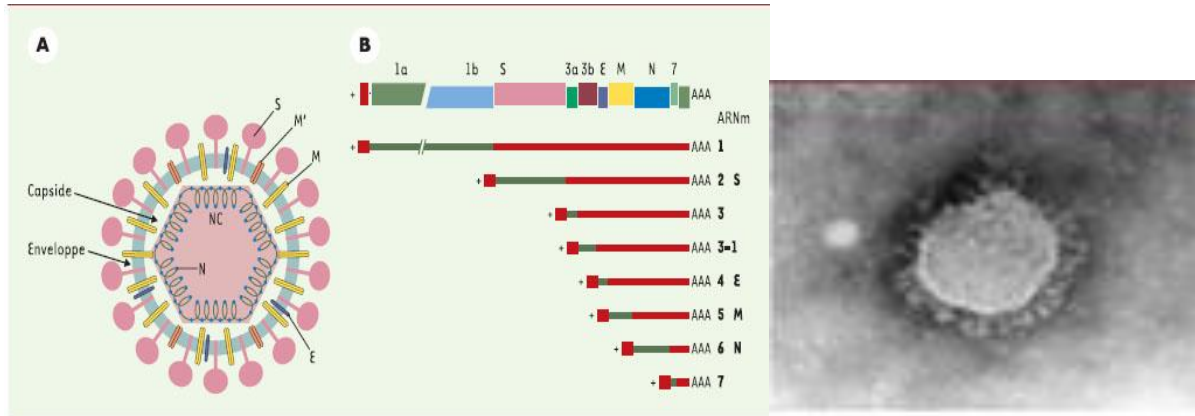


Figure 1 : Structure des coronavirus
(Eujanés, 2001)

Photo 1 : Vue au microscope électronique
(Pierre Lebon)

L'un des symptômes caractéristiques de la COVID-19 est le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Chez 20 à 30 % des patients contaminés, l'infection provoque une défaillance multiviscérale et une thrombose accompagnée de pathologies cliniques, dont diverses coagulopathies pouvant être associées à une hypercoagulation et une hyperactivation plaquettaire (figure 2), (Connors, 2020).

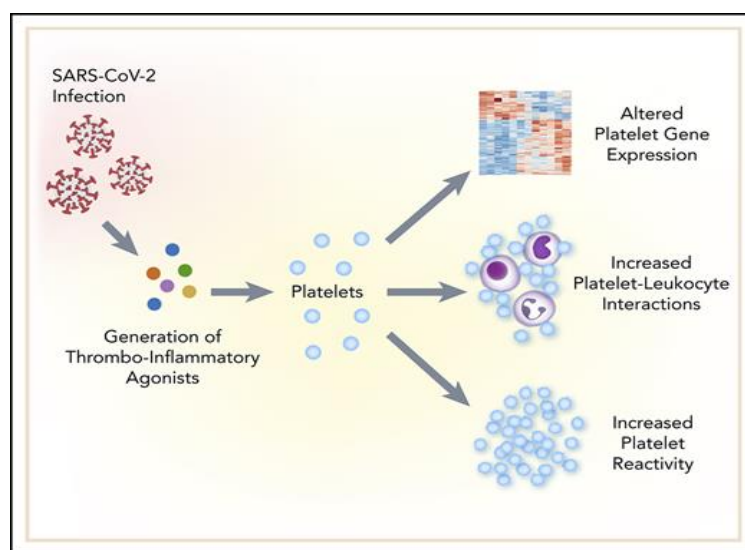


Figure 2 : Réponse à l'infection par le SARS-CoV-2 (Manne et al, 2010)

I.3. Plaquettes sanguines : rôle et mécanismes d'activation

Le rôle principal des plaquettes, cellules sanguines anucléées, est primordial dans les mécanismes d'hémostase primaire et de coagulation (Figure 3). En effet, en cas de lésion vasculaire, un thrombus se met en place afin d'obturer la brèche. Ce thrombus résulte d'un ensemble de réactions permettant l'activation et l'agrégation des plaquettes (Zine El Alaoui, 2020). Les plaquettes sont donc impliquées également dans la formation des thromboses artérielles qui compliquent l'athérosclérose, créant ainsi un risque d'occlusion des artères du cœur, du cerveau et des membres inférieurs pouvant déboucher sur un infarctus.

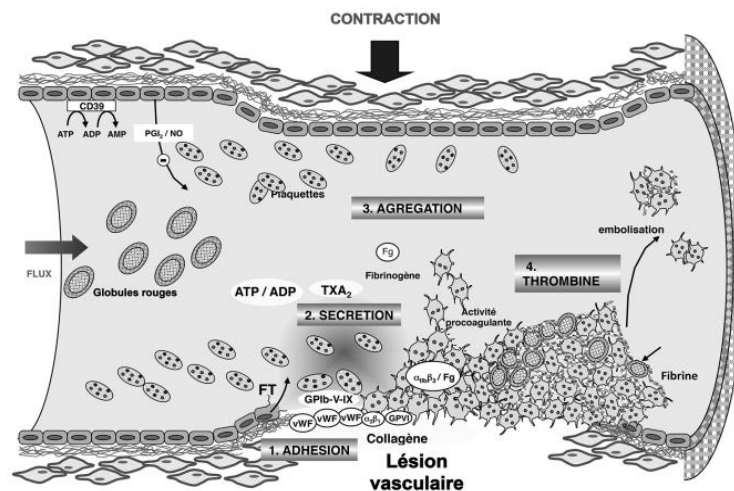


Figure 3 : Réponse des plaquettes à une blessure vasculaire (Gachet, 2013)

Au contact d'une paroi vasculaire lésée, les plaquettes s'activent rapidement, changent de forme, s'étalent sur la surface et sécrètent le contenu de leurs granules denses. Elles recrutent ensuite des plaquettes circulantes pour former un clou hémostatique qui est composé majoritairement de plaquettes et de fibrine produite au contact des plaquettes activées par la thrombine générée localement (Gachet, 2013).

En plus de l'hémostase et la coagulation, de nombreux mécanismes font intervenir les plaquettes tels que la dissémination métastatique des cellules cancéreuses, les processus inflammatoires, immunitaires, les septicémies, les phénomènes de détresse respiratoire et certains syndromes de défaillance viscérale (Zufferey et al, 2017 ; Guo et Rondina, 2019).

Le premier évènement qui se déclenche pour enclencher l'hémostase, en cas de brèche vasculaire est l'activation plaquettaire au niveau de la circulation sanguine en réponse à l'exposition du collagène sous-endothélial, normalement protégé par l'endothélium. Le collagène ainsi exposé entraîne l'adhérence des plaquettes en interagissant avec de nombreux récepteurs exprimés par ces cellules (Figure 4), (Manne, 2020).

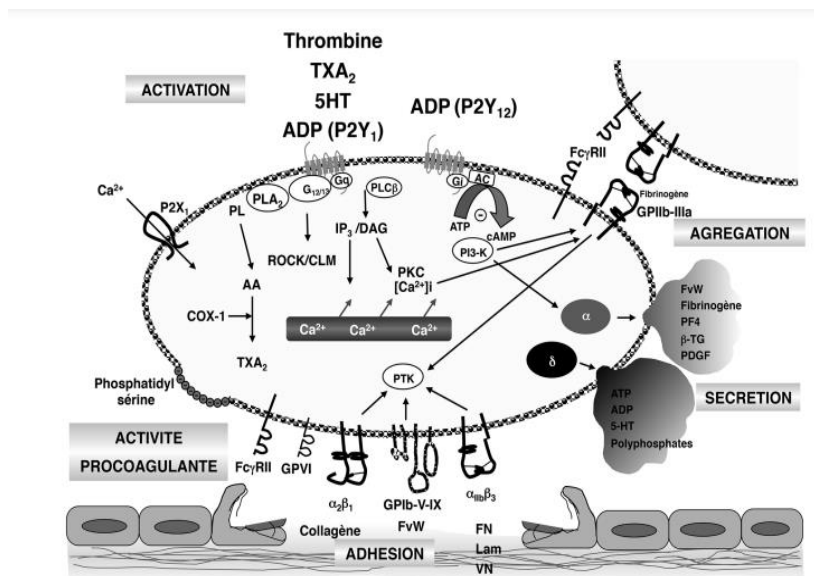


Figure 4 : Mécanismes d'activation plaquettaire (Barrett et al, 2021)

Le collagène, la fibronectine, le facteur de Willebrand, les laminines et le fibrinogène sont des protéines adhésives qui assurent le rôle de ligands de glycoprotéines membranaires qui empruntent différentes voies de signalisation et permettent ainsi les phénomènes d'adhérence. Celle-ci aboutit à l'activation de la phospholipase $PLC\beta$, la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium et l'activation des PKCs.

La classe des PKCs qui comprend les isoformes α , $\beta I/II$ et γ , est caractérisée par un domaine C1 qui lie le diacylglycérol (DAG), et un domaine C2 qui lie le calcium. Elle est donc activée à la fois par le DAG et le calcium (Nalefski and Newton, 2001).

Les PKCs sont localisées dans le cytosol des plaquettes et sont inactives à l'état basal. Pour être activées, elles nécessitent d'être phosphorylées sur trois sites. Une fois activées, elles reçoivent un signal en aval des récepteurs membranaires puis subissent une translocation du cytosol vers la membrane plasmique. Elles interagissent alors avec des protéines spécifiques, ce qui leur permet d'assurer leurs fonctions (Harper and Poole, 2010).

La translocation des PKCs du cytosol vers la membrane cellulaire agit sur le cytosquelette qui se réorganise ce qui provoque le changement de forme des plaquettes. Ceci a pour conséquence la croissance et la stabilisation du thrombus (Zine El Alaoui et al, 2020). Ces mécanismes sont sous le contrôle de voies signalétiques faisant intervenir des récepteurs membranaires, tels que le GPVI, le complexe GPIb-IX-V et les PARs (Zaid, 2016).

I.4. Hyperactivation des plaquettes chez les patients COVID-19

Les patients atteints de COVID-19 sévère présentent des anomalies hémostatiques qui imitent une coagulopathie intravasculaire disséminée associée à une septicémie due à l'hypercoagulation et l'hyperactivation plaquettaire. La principale différence étant un risque accru de thrombose plutôt que de saignement ce qui peut entraîner un risque d'infarctus du myocarde et un accident vasculaire cérébral ischémique.

De plus, les patients présentant des facteurs cardiovasculaires aggravants tels que l'obésité, le diabète et l'hypertension courent un risque accru de développer ces complications thrombotiques (Poissy et *al*, 2020).

Le séquençage de l'ARN a démontré des changements distincts dans le profil d'expression génique des plaquettes chez les patients COVID-19. Il a ainsi révélé des changements différentiels d'expression génique dans les voies associées à l'ubiquitination des protéines, à la présentation de l'antigène et au dysfonctionnement mitochondrial (Lax et *al*, 2021).

Les plaquettes des patients COVID-19 augmentent l'expression de récepteurs glycoprotéiques tels que la P-sélectine lors de l'activation. Les plaquettes circulantes neutrophiles, monocytes et les agrégats de lymphocytes T sont tous significativement élevés chez les patients COVID-19 par rapport aux personnes saines. De plus, les plaquettes des patients COVID-19 s'agrègent plus rapidement et montrent une propagation accrue à la fois sur le fibrinogène et le collagène.

L'augmentation de l'activation et de l'agrégation plaquettaires pourrait être partiellement attribuée à l'augmentation de l'activation de voies telles que la voie MAPK et à la génération de thromboxane. Cela montre bien que l'infection SARS-CoV-2 est étroitement liée à l'hyperactivité des plaquettes (Zine El Alaoui et *al*, 2020).

I.5. Propriétés antivirales des plantes médicinales

La nature fournit une immense bibliothèque de produits à explorer pour le développement de médicaments pour traiter diverses affections, y compris les maladies virales (Sener, 2020).

L'échec de nombreux médicaments conventionnels contre les infections virales combiné à l'apparition d'une résistance virale spécifique a conduit à un intérêt croissant pour les plantes en tant qu'agents antiviraux prometteurs (Lin et *al.*, 2014).

Étant donné que les composés naturels, y compris les acides phénoliques, les terpènes, les flavonoïdes, les coumarines, les lignanes, les alcaloïdes et les protéines jouent un rôle important dans l'inhibition des virus (Denaro, 2019), ils pourraient donc constituer des thérapies alternatives potentielles. De nombreux travaux de recherche ont démontré l'efficacité de ces produits contre les virus et dans le traitement de certaines infections à coronavirus (Adem et *al*, 2020).

I.5.1. Extraits de quelques plantes et leurs propriétés thérapeutiques

Les plantes médicinales constituent un patrimoine commun précieux pour l'humanité. D'autant plus que pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement, l'absence d'un système de santé efficient, les soins par les produits naturels constituent la seule alternative possible (Tabuti et *al*, 2003).

Ainsi, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, pour faire face aux problèmes de santé, pour plus de 80% des populations africaines puiser dans la pharmacopée locale et se soigner grâce à la médecine traditionnelle est la seule alternative.

Dans le cas du continent africain, par exemple, notamment dans les pays tropicaux d'Afrique 200.000 espèces végétales sont représentées sur les 300.000 espèces végétales recensées sur la planète, et elles posséderaient des vertus médicinales (Sofowora, 2010).

D'après les bases de données scientifiques, les activités antivirales, antifongiques, antibactériennes, antivirales et anthelminthiques des plantes médicinales ont fait l'objet d'un grand nombre d'articles de recherche (Joshi et *al*, 2020 ; Zambounis et *al*, 2020).

Des plantes possédant une activité antivirale telles que *Sambucus nigra*, *Withania somnifera*, *Sylibum marianum* et *Moringa oleifera* ont ainsi été utilisées contre des virus humains tels que le virus de l'herpès simplex de type1 (HSV-1) (Lipipun et *al*, 2003), le virus de l'hépatite C (Ferenci et *al*, 2008), le virus de la grippe (Ataee et *al*, 2016) et le VIH ou virus de l'immunodéficience humaine (Salehi et *al*, 2018).

Il a été aussi rapporté que les terpénoïdes, les alcaloïdes, les stilbènes et les flavonoïdes d'origine végétale sont les principaux composants des médicaments antiviraux de synthèse (Ghildiyal, 2020).

Ainsi, certains produits naturels tels que la quercétine extraite de l'argousier *Hippophaë rhamnoides* (Guliyev et *al*, 2004), l'hispiduline extraite de *Baccharis trimera* (Dos Reis Livero et *al*, 2016), la rutine extraite du sarrasin, *Fagopyrum esculentum* Moench (Gullon et *al*, 2017) le xanthoangelol extrait à partir de *Angelica keiskei* Koidzumi (Mizar et *al*, 2018), ont montré des activités antivirales contre différents virus respiratoires *in vitro* et *in vivo*. Ces composés

peuvent donc être recommandés en tant que candidats potentiels contre les virus respiratoires (Aanouz et *al*, 2021).

Ils peuvent être considérés comme des médicaments et pourraient donc être prescrits seuls ou bien associés à un traitement antiviral conventionnel (Aanouz et *al*, 2021).

I.5.2. Plantes et molécules naturelles utilisées en prévention ou en traitement de la COVID-19

Les infections respiratoires virales (IRV) continuent de figurer parmi les maladies humaines les plus courantes. Les médicaments à base de plantes ont été utilisés pour traiter les virus respiratoires syncytial humains (hRSV) (Shin et al., 2013), la grippe virale causée par le virus de la grippe (Choi et al., 2019), et les précédentes épidémies de ce siècle notamment les deux épidémies de coronavirus (SARS-CoV en 2002 et MERS-CoV en 2012) (Khan et Gilani, 2019).

Différentes études ont par ailleurs étudié une variété de plantes pour leurs puissantes activités antivirales, y compris celle d'Ogbole et al (2018) qui ont étudié vingt-sept plantes médicinales du sud du Nigéria pour leur activité contre les virus à ARN à brin positif tels que les entérovirus. Leur étude a conclu que des extraits de *Macaranga barteri* montraient une très forte activité contre les échovirus. De même, des études sont disponibles qui ont passé en revue des centaines de plantes médicinales à fort potentiel antiviral (Akram et al, 2018). De telles études indiquent que ces plantes antivirales, après des tests minutieux, pourraient être utilisées pour atténuer les symptômes de la COVID-19 (Khan et al, 2021).

Il existe ainsi toute une liste de plantes évaluées pour leur activité contre les virus du SRAS-CoV. Les plus notables d'entre elles sont *Lycoris radiata* (Li et al, 2014), *Artemisia annua*, *Lindera aggregat*, *Isatis indigotica* (Lin et al, 2005), *Torreya nucifera* (Ryu et al, 2010), *Houttuynia cordata* (Lau et al, 2008), *Pelargonium sidoides* (Whitehead et al, 2019) et *Glychirrhiza spp.* (Fiore et al, 2008).

En Chine, un produit appelé « Qing Fei Pai Du Tang » et contenant des plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise (*Scutellaria baikalensis*, *Prunus armeniaca*, *Cinnamomum cassia*, *Zingiber officinalis*, *Dioscorea opposita*, *Poria cocos* et *Citrus reticulata*) a permis de soulager considérablement la fièvre et la toux, principaux symptômes de la COVID-19, et a permis une récupération plus rapide (Yang et al, 2020).

A Madagascar, le Ministère de la Santé malgache a puisé dans les ressources de la pharmacopée locale et mis au point un mélange d'huiles essentielles d'armoïse (*Artemisia annua*), mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans*), ravintsara (*Cinnamomum camphora*), rambiazina

(*Helichrysum gymnocephalum*), kinimpotsy (*Eucalyptus globulus*), niaouli (*Melaleuca quinquenervia*). Cette préparation, sous l'appellation CVO (Covid-Organics) a été commercialisé en tant que remède anticoronavirus SARS-CoV-2 (OMS, Juillet 2021).

L'Inde a également exploré sa médecine traditionnelle ayurvédique et mis au point un remède à base de plantes telles que : *Plectranthus ambonicus*, *Sida acuta*, *Tinospora cordifolia*, *Adhatoda vasica*, *Andrographis paniculata* et *Costus speciosus*. Ce « médicament », agréé par le « Ministry of Ayurveda, Yoga and Naturopathy, Unani, Siddha and Homoeopathy of the Government of India » est prescrit en traitement contre la COVID-19 (Gangarapu et al, 2020).

I.5.3. Espèces étudiées

La situation géographique du Maroc lui confère une large gamme de bioclimats méditerranéens qui permet l'épanouissement d'une flore riche et variée, marquée par un endémisme important (Benabid, 2000). Sa flore endémique est sans doute la plus variée de tous les pays du sud de la Méditerranée (Fennane, 1998), et c'est en particulier vrai en ce qui concerne les plantes aromatiques et médicinales (PAM) qui représentent ainsi une grande valeur socio-économique (Ghanmi, 2009).

Le Maroc est riche de plus de 4.800 espèces, parmi lesquelles 905 plantes possèdent des propriétés aromatiques et médicinales (Fakchich et Elachouri, 2021). L'utilisation des plantes a ainsi toujours fait partie de l'arsenal de médication (Rejdali, 1996).

Il est le 12^{ème} exportateur mondial et ses exportations de PAM ont augmenté de 100% au cours de période 2004-2009. Il est le fournisseur exclusif de plusieurs huiles essentielles comme l'armoise et la camomille sauvage. Plusieurs produits sont connus sur le marché international comme étant des produits typiquement marocains. Cela signifie que l'exploitation des PAM au Maroc a réussi à se positionner sur le marché mondial par le biais de plusieurs produits (Neffati et Sghaier, 2014).

Il est donc logique de puiser dans ce patrimoine important et disponible dans le but de mettre au point des traitements efficaces pour soigner ou au moins soulager les symptômes de la COVID-19.

Les plantes sélectionnées dans le cadre de notre travail sont : le romarin, la lavande et le curcuma.

- *Rosmarinus Officinalis* L. ‘‘Azir’’ est une espèce largement connue pour ses usages médicaux. Ses feuilles ont un potentiel thérapeutique important contre un large éventail de maladies telles que les troubles de l'estomac, les maladies respiratoires et inflammatoires (Bendif, 2017). En médecine traditionnelle, le romarin est utilisé pour la prévention et le traitement du diabète et des maladies cardiovasculaires (Ribeiro-Santos et al, 2015).

- *Lavandula angustifolia* ‘‘Khouzama’’, une plante présente dans de nombreux pays, est connue pour ses qualités antifongiques, antimicrobiennes et antiprotistes (Moon et al, 2006).

- *Curcuma longa* L., nommé « Kharkoum » au Maroc, a une longue histoire d'utilisation médicale dans toutes les médecines traditionnelles (Ayati et al, 2019) et est devenu le premier choix pour la médecine alternative en raison de ses propriétés anti-inflammatoires et effets antioxydants (Kocaadam et Sanlier, 2017).

À notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'effet des extraits de ces plantes médicinales sur la fonction plaquettaire chez les patients COVID-19. Aussi, dans le cadre de ce travail, nous nous proposons de tester l'éventuelle activité anti-agrégation plaquettaire de ces 3 plantes communément utilisées au Maroc.

I.5.3.1. Monographie de *Rosmarinus officinalis*

La monographie de *Rosmarinus officinalis* est tirée du 4^{ème} volume de « Monographs on Selected Medicinal Plants ».

➤ Bref historique

Récemment, un intérêt scientifique notable s'est porté sur les propriétés thérapeutiques bénéfiques de différents types d'extraits de *R. officinalis* et de ses principaux constituants, tels que l'acide rosmarinique, l'acide carnosique et le carnosol.

Un grand nombre d'études sur des modèles animaux ou des cellules cultivées indiquent la large gamme de propriétés médicinales de cette plante en tant qu'anti-inflammatoire, neuroprotecteur (Sanchez-Camargo et Herrero, 2017), antidiabétique et hépato-protecteur (Park et Mun, 2013).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L) est originaire des zones sèches et rocheuses de la Méditerranée. Le nom de genre *Rosmarinus* dérive des mots latins ros et marinus qui, ensemble, sont traduits par la "rosée de la mer". Le romarin est utilisé depuis l'époque des premiers Grecs et Romains comme une plante médicinale importante, une épice et un agent aromatisant couramment utilisés. Les érudits grecs portaient souvent une guirlande de *Rosmarinus officinalis* sur la tête pour stimuler leur mémoire (Escuder, 2007).

➤ Classification

Classe : *Equisetopsidae*

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Sous-famille : *Nepetoideae*

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis*

Noms vernaculaires : Azir, biberine, common rosemary, Romarin, garden rosemary, gusmarino, encensier, hasalban, hatsa louban, hhassâ lubân, ikilil, ikilil el jabal, ikilil kuhi (Bedevian, 1994)

➤ Description botanique

La famille des lamiacées regroupe 7200 espèces. Elles sont généralement aromatiques, formées de tiges quadrangulaires aériennes glabres ou poilues. Les feuilles sont simples et toujours opposées. Cette famille se distingue par l'odeur qui se dégage des feuilles ou inflorescences par simple attouchement. Cela est dû à la présence des huiles essentielles (Dupont et Guignard, 2012).

R. officinalis, plante aromatique touffue de la famille des labiées, mesure de 50cm jusqu'à 2m de haut. Elle est toujours verte et ramifiée. Les feuilles sont généralement sessiles, opposées, lancéolées et coriaces, avec des bords fortement réfléchis. Les tiges sont ligneuses avec une écorce de couleur brun foncé et les racines sont ramifiées (Figure 5) (Leplat, 2017).

Les fleurs sont de couleur bleu blanchâtre disposées en grappes à l'aisselle des feuilles (Photo 2). Elles présentent un calice et une corolle bilabiés.

L'androcée porte 2 étamines et le gynécée présente un style possédant un seul stigmate et un disque nectarifère. L'ovaire est supère et divisé en deux loges, chacune portant 2 ovules. Le fruit, tétrakène globuleux, lisse et de couleur brun foncé, mesure 2mm de long. Chaque partie du tétrakène renferme un embryon sans albumen (Leplat, 2017).

Les feuilles et le calice portent des poils sécréteurs glanduleux et élaborent une huile essentielle qui dégage une odeur rappelant l'encens, d'où l'origine de l'un des noms vernaculaires : «encensier».



Figure 5 : Schéma de *Rosmarinus officinalis*

Photo 2 : : Fleurs de romarin

(Pictures from history, consulté le 5/4/2022)

➤ Répartition géographique

Le romarin est originaire du sud-ouest de l'Asie ainsi que des pays du bassin méditerranéen. Il est répandu dans les pays européens, en Espagne, France, Italie, le Portugal, la Grèce... ainsi que dans les pays d'Afrique du nord : Maroc, Tunisie, Algérie ... il est cultivé principalement pour l'extraction des huiles essentielles (Hoeffel, 1994).

Au Maroc, il se développe dans plusieurs régions notamment les montagnes du Gueb-er-Rahal et du Bou-Iblane, Taouarirt, Tamokrant, près de Boulmane, dans la vallée de l'Oued Atchane. Il est répandu dans le Haut-Atlas dans sa partie orientale. Il est fréquent à partir de Jbel Ayachi, Titahoune et Tizi n'teleghme. Il s'étend également dans la forêt de Debdou et la région de Midelt. Il est présent sur les hauts plateaux alors qu'il est rare dans le niveau occidental.

Il s'étale dans l'étage aride à subhumide chaud et subhumide frais, dans le méso et thermo méditerranéen (Figure 6), (Khia et *al*, 2014).

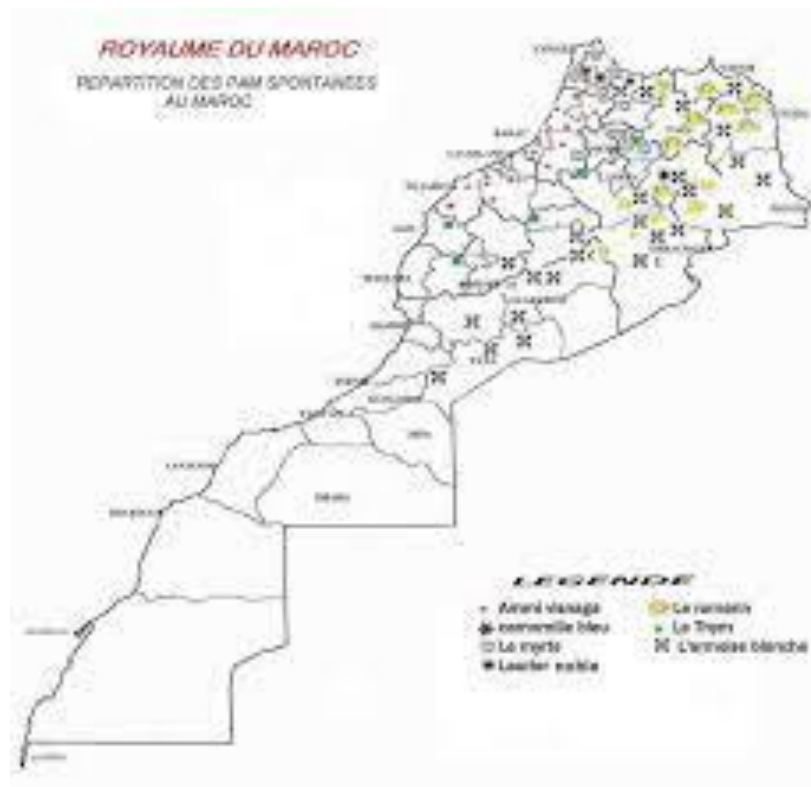


Figure 6 : Répartition du romarin spontané au Maroc (Haut-commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte contre la Désertification, 2017)

Le Maroc cultive presque un million d'hectares de *R. officinalis* qui donne un rendement annuel de l'ordre de 60 tonnes d'huile essentielle destinée à l'exploitation (Khia et al, 2014).

Le romarin est cultivé par semis ou boutures. En automne, le marcottage peut être également utilisé. Il consiste à faire plier un rameau long vers le sol et ensuite enterrer une petite partie de ce rameau. Après un arrosage régulier, l'enracinement se produit et ensuite la tige doit être coupée du pied mère. Au printemps qui suit, la plante peut être placée dans un pot ou plantée au champ (Polese, 2006).

➤ Utilisations culinaires et médicinales

Dans la gastronomie mondiale, les feuilles et les sommités sont utilisées dans l'aromatisation des viandes, des marinades, les bouquets garnis, ainsi dans la préparation du riz, des soupes et des salades... mais c'est surtout dans la cuisine méditerranéenne traditionnelle qu'il occupe une place de choix. Le miel de romarin, appelé également miel de Narbonne, est très prisé.

Le romarin entre dans la fabrication du vinaigre à cause de ses propriétés antiseptiques qui lui confère un effet bactéricide (Hoeftler, 1994).

En médecine traditionnelle, l'huile essentielle du romarin est utilisée comme stimulant de la circulation du sang et pour soulager les douleurs musculaires. Elle est préconisée dans le traitement de l'inflammation des voies respiratoires et soulage les maux de tête et les problèmes gastriques mineurs (Bousbia, 2011). Elle est préconisée aussi dans le traitement de la dépression, la perte du mémoire et les troubles d'origine nerveuse notamment dans la maladie d'Alzheimer (Leplat, 2017).

L'hydrolysate obtenu à partir de la fleur de romarin est utilisé comme lotion pour les yeux.

Dans le domaine de la recherche médicale, une multitude d'études rapportent de nombreuses propriétés thérapeutiques de *R. officinalis* qui intéressent un large éventail de pathologies (Tableau 1):

Tableau 1 : Propriétés thérapeutiques de *Rosmarinus officinalis*

Indications	Références
Effet myorelaxant et traitement des allergies cutanées	Al-Hader, 1994
Effet antiviral	Nolkemper, 2006
Réduction de la glycémie	Del Baño, 2006
Asthme, athérosclérose, cataracte, coliques néphrétiques, hépatotoxicité, ulcère peptique, maladies inflammatoires, cardiopathies ischémiques	Hsieh, 2007
Réduction de la peroxydation lipidique dans le cœur et le cerveau	Posadas, 2009
Capacités hépato protectrices	Bernardes, 2010
Prévention des problèmes liés à l'athérosclérose	Sinkovic, 2011
Réduction de la pression artérielle myocardique par l'acide rosmarinique	Karthik, 2011
Effets anti-angiogéniques et neuroprotecteurs de l'acide carnosique	Kayashima, 2012
Effets anticancéreux et antiprolifératifs	Kontogianni, 2013
Action anti-ulcéreuse	Amaral et al, 2013
Propriétés néphroprotectrices	Ramadan, 2013
Contrôle de l'hypercholestérolémie et du stress oxydatif et soulagement de la fatigue physique et mentale	Fernández, 2014
Activité radio protectrice et antimutagène	El Saied Azab, 2014
Effet antidépressif	Tabassum, 2014

Des travaux de recherche plus récents ont mis en évidence d'autres propriétés thérapeutiques du romarin. Abadi et *al*, en 2016, ont testé l'effet anxiolytique de *R. officinalis*. Pour cela, ils ont soumis des souris à une situation de stress en leur administrant au préalable un extrait hydroéthanolique de *R. officinalis*. Ils ont remarqué un important contrôle de l'anxiété, similaire au diazépam (anxiolytique de synthèse largement prescrit). Ainsi, *R. officinalis* pourrait être une alternative aux anxiolytiques et antidépresseurs disponibles, qui peuvent présenter des effets secondaires, notamment la somnolence, l'hypotension, les arythmies et la dépendance puisque son effet prophylactique contre l'anxiété a été prouvé.

A l'occasion de la journée mondiale contre le cancer, 4 février 2021, Dre Matshidiso Moeti, Directrice régionale de l'OMS, déclare que le cancer est reconnu par l'organisation comme un problème de santé mondiale. Le nombre de nouveaux cas a plus que doublé en Afrique par exemple, passant de 338 000 cas notifiés à 846 000 notifiés en 2020. Dans le but de proposer des solutions alternatives, moins invasives et moins coûteuses, De Oliveira et *al* (2017), Amar et *al* (2017) ainsi que Karimi et *al* (2017) par exemple ont évalué les extraits de *R. officinalis* et ont démontré une action antiproliférative efficace sur plusieurs types de cellules tumorales. Ces extraits ont permis d'interférer dans le cycle cellulaire, ainsi que de favoriser l'apoptose, dans le but de bloquer la colonisation et la multiplication des cellules malignes.

Un autre sujet d'intérêt pour la communauté médicale est l'émergence de micro-organismes opportunistes et résistants aux traitements antimicrobiens disponibles. Pour cette raison, l'extrait glycolique de *R. officinalis* a été utilisé en alternative à ces agents thérapeutiques pour contrôler le développement de biofilms mono- et polymicrobiens. Ainsi, des réductions significatives des communautés microbiennes ont été observées après l'application de l'extrait de plante (De Oliveira et *al*, 2017).

De plus, l'utilisation des antibiotiques peut entraîner une augmentation des lipides et des graisses dans le sang, connue sous le nom de dyslipidémie. L'accumulation de ces molécules dans les vaisseaux peut favoriser les maladies cardio-vasculaires et cérébrovasculaires. Cependant, l'administration d'extrait aqueux de *R. officinalis* aux animaux atteints de dyslipidémie induite par la gentamicine entraîne une inhibition de la prise de poids, causée par l'accumulation de graisse due au traitement antibiotique (Hegazy, 2018).

Dans le cas de la COVID-19, cette infection entraîne de nombreuses altérations physiologiques et biochimiques telles que la translocation des lymphocytes T dans les poumons, les altérations de la coagulation et l'augmentation des taux de ferritine, un médiateur de la dérégulation immunitaire (Figure 7), (Mrityunjaya, 2020).

Le SARS-CoV-2 induit des manifestations compliquées dues à trois types de stress : la tempête de cytokines, le stress oxydatif et le stress ER (par modification de la membrane du réticulum endoplasmique des cellules infectées), chacun stimulant les autres. C'est la boucle de rétroaction positive des événements dans la COVID-19 (A dans la figure 7), (Mrityunjaya et *al*, 2020 et Uddin et *al*, 2020)

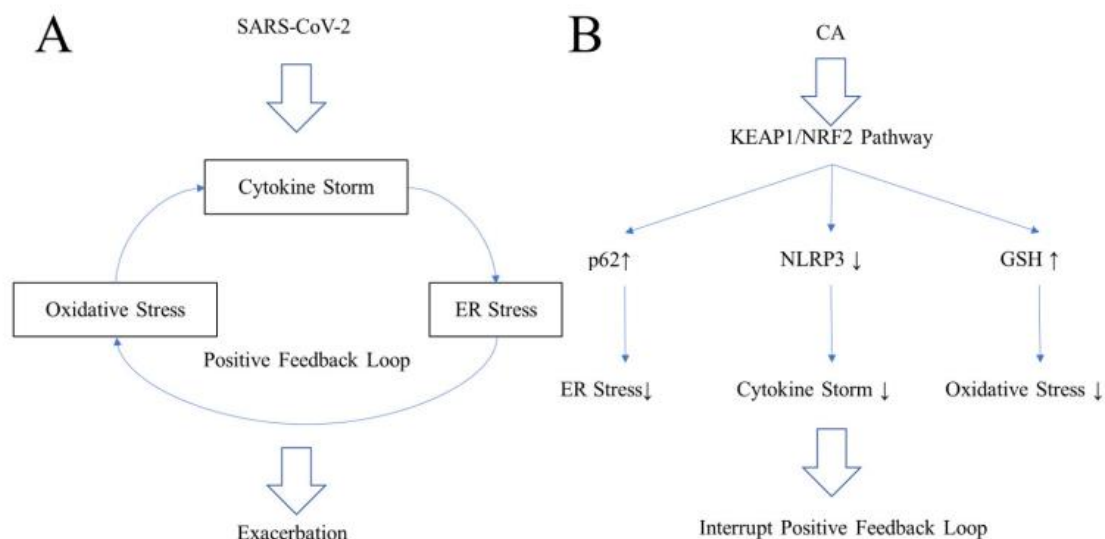


Figure 7 : Événements de la réponse immunitaire face à la COVID-19 (Satoh et al, 2022)

ER : endoplasmic reticulum, NRF2: erythroid derived 2-related factor 2, KEAP1 : Kelch-like ECH-associated protein 1, GSH : glutathione, NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3, CA : carnosic acid

Les activateurs de NRF2 peuvent stimuler la voie KEAP1/NRF2 et induire p62 ainsi que la forme réduite du glutathion (GSH), régulateurs importants du RE et du stress oxydatif (Satoh, 2022). Les activateurs NRF2 suppriment également l'inflammasome NLRP3, un contributeur potentiel à la tempête de cytokines dans la COVID-19. Il y a donc une interruption de la boucle de rétroaction positive par les activateurs NRF2 (B dans la figure 7), (Freeman et Swartz, 2020 ; Toldo et al, 2020).

L'acide carnosique semble inhiber les manifestations de l'infection par le SRAS-CoV-2 par deux mécanismes : l'un au point d'entrée virale, éventuellement par une liaison covalente à la protéine du récepteur ACE2, et l'autre en améliorant la tempête de cytokines par l'inhibition de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, l'acide carnosique représente une voie thérapeutique potentielle pour la COVID-19 (Satoh et al, 2022).

Cependant, concernant les extraits de *Rosmarinus officinalis*, la bibliographie ne rapporte aucune recherche sur l'effet des extraits sur l'agrégation plaquettaire qui est l'un des symptômes caractéristiques de la COVID-19.

➤ Composition chimique

Plusieurs composés présentant des activités pharmacologiques peuvent être isolés à partir d'huiles essentielles et d'extraits de *R. officinalis*.

Les composés les plus signalés comprennent l'acide caféique, l'acide carnosique, l'acide chlorogénique, l'acide monomère, l'acide oléanolique, l'acide rosmarinique, l'acide ursolique, l'alpha-pinène, le camphre, le carnosol, l'eucalyptol, le rosmadial, le rosmanol, les rosmaquinones A et B, le sécohinokio et les dérivés de l'eugénol et de la lutéoline (Borges, 2019).

En 2014, cinq nouveaux composés ont été identifiés dans un extrait éthanolique de *R. officinalis* : l'officinoterpenoside A₁ et A₂ (glycosides diterpénoïdes), officinoterpenoside B et C (glycosides triterpénoïdes) et officinoterpenoside D (normonoterpénoïde) (Zhang et al, 2014).

I.5.3.2. Monographie de *Lavandula angustifolia*

La monographie de *Lavandula angustifolia* est tirée du 3^{ème} volume de « Monographs on Selected Medicinal Plants ».

➤ Bref historique

Dès l'antiquité, dans les civilisations grecques et romaines, la lavande est déjà citée pour ses usages. Cette plante médicinale est originaire de la Perse sous l'appellation *Lavandula stoechas* Linné ou *spica* qui est connue actuellement sous le nom *Lavandula latifolia* (Belmont, 2013). Mais ce n'est qu'au moyen-âge que le terme « lavande » apparaît et trouve son origine dans le verbe latin « *lavare* » qui signifie laver. A cette époque, on trouvait la lavande était cultivée dans les jardins des monastères en tant que plante aromatique et était utilisée dans un but médicinal (Fabiani et Christof, 2002).

Les Egyptiens utilisaient la partie florale de la lavande au cours des processus de momification (Belmont, 2013).

En Provence, au Moyen-âge, les fleurs de lavande sauvage étaient utilisées par les paysans pour soigner les blessures superficielles. Puis, à fin du 19^{ème} siècle, la production s'est développée et a évolué en culture intensive (Veyan, 2000).

➤ Classification

Lavandula angustifolia appartient à l'embranchement des Spermaphytes.

Classe : *Magnoliopsidae*

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Sous-Famille : *Nepetoideae*

Genre : *Lavandula*

Espèce : *Lavandula angustifolia*

Ce genre comporte 25 à 35 sous-espèces de morphologies diverses. La détermination des espèces, très ardue, a donné lieu à des interprétations successives en raison de l'existence de variétés et d'hybrides spontanés.

Synonymes : *Lavandula spica* L., *Lavandula vera*, *Lavandula angustifolia* Mill et *Lavandula officinalis* désignent la même plante (Toninolli et Meglioli., 2013)

Noms vernaculaires : Khouzama, khuzama, khuzama fassiya, khuzama zerqua, al birri, alhucema, lavande femelle, lavande véritable, lavandula vraie (African pharmacopoeia, 2014)

➤ Botanique et Ecologie

Lavandula angustifolia est un arbuste aromatique de 1 à 2 m de haut. Ses rameaux sont gris-brun à brun foncé avec de longues pousses florifères et de courtes pousses feuillues.

Ses feuilles sont linéaires-lancéolées, grises tomenteuses lorsqu'elles sont jeunes, devenant plus vertes avec l'âge.

La tige porte des inflorescences habituellement non ramifiées de 10–25 cm de long avec un épi compact de 4 à 5cm, présentant parfois des grappes de fleurs éloignées de l'épi principal (Figure 8).

Les bractées sont larges, ovales et les bractéoles présentes mais minuscules. Le calice est à 13 nervures et la corolle fortement symétrique bilatéralement, faisant presque deux fois la longueur du calice à lobes proéminents, camaïeu de bleu/mauve, blanc, rarement rose violet (Paniagua-Zambrana et Bussmann, 2020).

Les feuilles, étroites ou ovales, sont longues de 2 à 5 cm. Les bractées de couleur brun jaunâtre, sont marquées de 5 à 7 nervures principales très distinctes. Leur contour est triangulaire et se détache facilement de l'axe de l'épi. Les fleurs, à pédoncule court, sont disposées en épis de six ou dix groupes, les inférieurs étant séparés des supérieurs (Photo 3). Elles sont portées par des bractées aussi larges que longues (Botineau, 2010).

La racine est généralement pivotante et parfois traçante.



Figure 8 : Schéma de *L. angustifolia*



Photo 3 : Fleurs de *L. angustifolia*

[Lavandula angustifolia - Köhler-s Medizinal-Pflanzen-087.jpg](#) (consulté le 5/4/2022)

➤ Répartition géographique

Les espèces du genre *Lavandula* sont pour l'essentiel présentes dans le pourtour méditerranéen. Au nord de la Méditerranée, elles s'étendent du Portugal jusqu'au Proche Orient. Et, au sud, elles se répartissent à travers les pays d'Afrique du nord jusqu'aux pays du Moyen-Orient (Figure 9). On trouve également des espèces de lavande au nord-est de l'Afrique tropicale (Somalie, Ethiopie, Erythrée et Soudan) ainsi qu'à l'ouest des côtes africaines sur les îles du Cap Vert. Enfin, en Inde, deux espèces de lavandes créent une disjonction du genre à l'est du pays (Upson et Jury, 2002).

En France, la culture de lavande reste une activité localisée dans le sud-est, principalement dans quatre départements : les Alpes de Haute Provence, les Hautes Alpes, la Drôme et le Vaucluse concentrant 94% de la production française de lavande et lavandin. D'autres pays comme la Bulgarie, l'Ukraine, la Chine cultivent la lavande mais ce sont des *Lavandula angustifolia* à partir des populations françaises.

La lavande de groupe *stoechas* se développent sur tout le pourtour méditerranéen notamment en Andalousie et dans une partie du Portugal.

La zone algéro-marocaine est clairement un centre de diversité avec un grand nombre d'espèces (3 espèces endémiques en Algérie et 4 en Maroc) représentant 3 des 6 sections du genre *Lavandula* (Upson et Jury, 1997).

Au Maroc, plusieurs espèces de genre *Lavandula*, appelées toutes lavande, sont localisées dans différentes régions du pays (Figure 9).

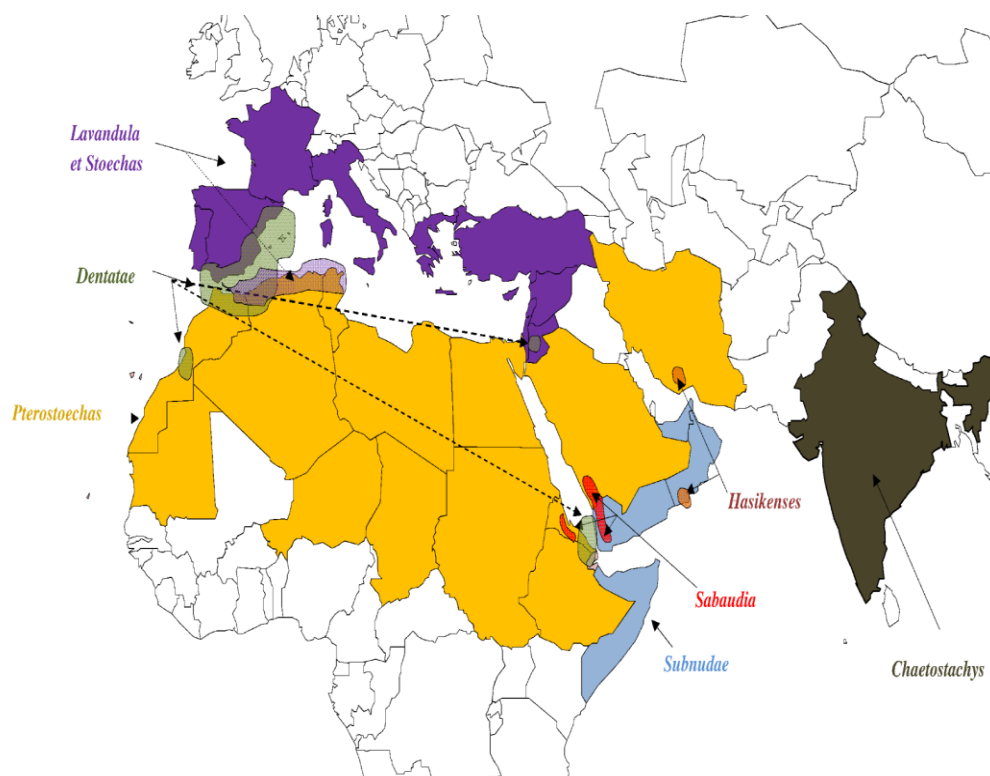


Figure 9 : Aire de répartition des espèces de lavandes dans le monde (Guitton, 2012)

Plusieurs lavandes ont été identifiées, en 2014: *Lavandula stoechas*, *L. angustifolia*, *L. atlantica*, *L. pedunculata* Miller, *L. Multifida*, *L. dentata*, *L. maroccana*, respectivement sur le plateau central, à Oulmès, Aquelmuoss, le Moyen-Atlas central (Ait Amro Ouali), la plaine du Saiss (Ain Jerri) et le Haut-Atlas occidental au niveau du bassin versant d'Ourika (Figure 10) (Bachiri et al, 2015).

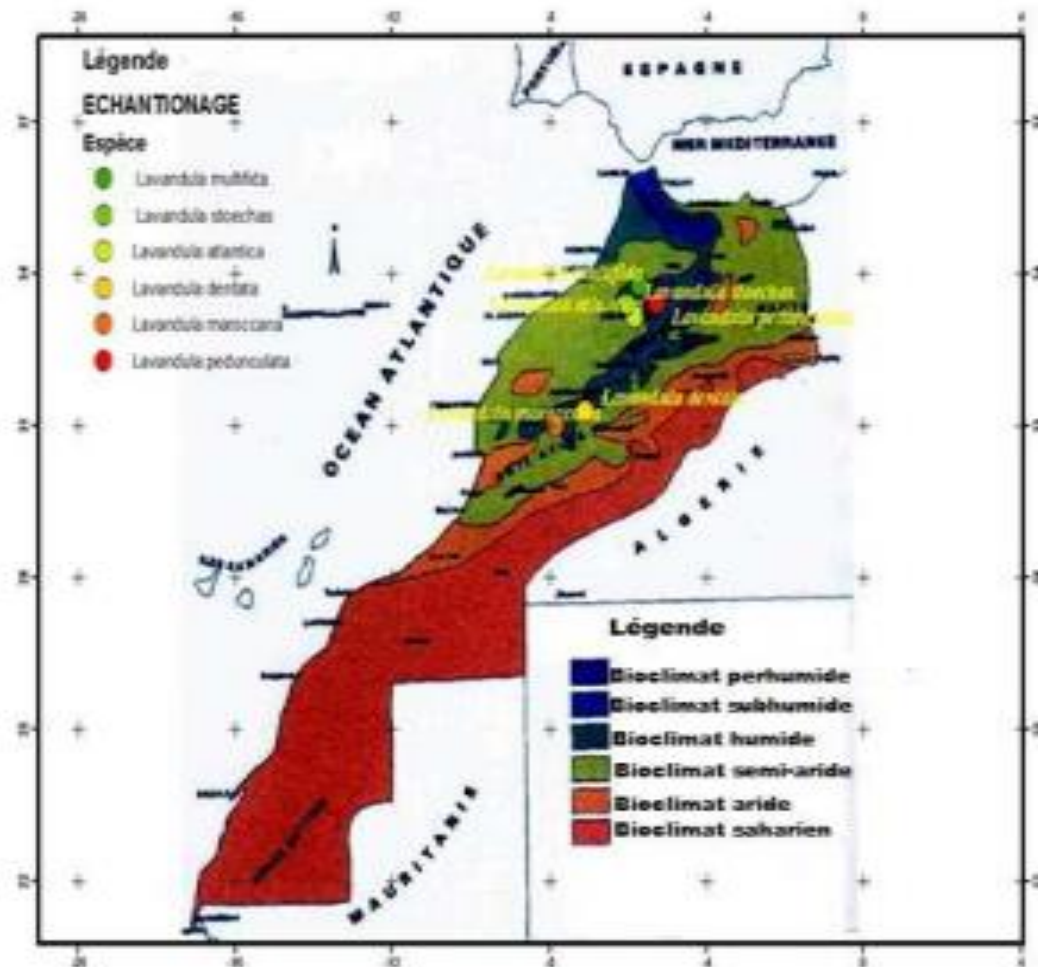


Figure 10 : Aire de répartition des lavandes au Maroc (Bachiri et al, 2015)

➤ Principaux constituants chimiques

(Radi et al, 2022)

- Monoterpénols (30-40%): linalol, terpinène-1-ol, lavandulol
- Esters terpéniques (40-50%): acétate de linalyle, acétate de lavandulyle
- Sesquiterpènes : bêta caryophyllène, bêta farnésène

- Monoterpènes : ocimène
- Sesquiterpénols, aldéhydes, cétones, coumarines
- Huile essentielle (1,0 à 3,0 %) dont les principaux constituants sont l'acétate de linalyle (30 à 55 %) et le linalol (20 à 50 %)
- β -ocimène, 1,8-cinéole (1,8-cinéol, cinéol, cinéole, eucalyptol), camphre et oxyde de caryophyllène.

➤ Propriétés médicinales en utilisation empirique

Dans la médecine arabe, la lavande est utilisée en traitement symptomatique des maux de tête, de l'agitation, de l'insomnie, comme carminatif et antispasmodique des troubles gastro-intestinaux d'origine nerveuse. En cas de toux, de grippe, de rhume, d'insuffisance biliaire et d'infections aussi bien urinaires que pulmonaires, elle est administrée en infusion (Bellakhdar, 1997).

Elle possède aussi un pouvoir antibactérien, diurétique, emménagogue et antioxydant marqué. Cette plante a aussi des propriétés insecticides marquées, ainsi qu'un pouvoir anticonvulsivant intéressant (Chu et Kemper, 2001).

➤ Utilisation en pharmacologie

De nombreuses équipes de recherche s'intéressent aux propriétés pharmacologiques de *Lavandula* et isolent les molécules actives qui possèdent des propriétés thérapeutiques :

- Activité antioxydante : un extrait à 50% d'extrait éthanolique a révélé un effet antioxydant *in vitro* à la dose moyenne de 45,0 mg/ml (Lamaison et al, 1990).
- Activité antimicrobienne des extraits aqueux, chloroformiques, hexaniques et méthanoliques : à la concentration de 60,0 μ g/ml, ces extraits ont inhibé la croissance de *Streptococcus pneumoniae* (Alkofahi et al, 1996).

- Activité antibactérienne : un extrait au méthanol des fleurs a inhibé la croissance de *Helicobacter pylori*, bactérie associée à l'ulcère peptique, *in vitro*, à la concentration minimale inhibitrice de 100,0 µg/ml (Mahady et al, 2005).

Concernant la lutte contre la COVID-19, à notre connaissance et en dehors de l'utilisation traditionnelle, aucune étude n'a été menée afin de tester l'effet antiviral de la lavande.

I.5.3.3. Monographie de *Curcuma longa* L.

La monographie de *Curcuma longa* est tirée du 3^{ème} volume de « Monographs on Selected Medicinal Plants ».

➤ Bref historique

Le curcuma constitue l'un des produits phares de la médecine traditionnelle indienne appelée médecine ayurvédique. Cette dernière constitue la plus ancienne tradition médicinale de l'humanité. Le curcuma est cité dans une série de traités médicaux datant d'environ 3 000 ans avant notre ère parmi les quelques 250 plantes médicinales mentionnées.

En Europe, lorsqu'il fut introduit par les Romains au moment de la conquête des Gaules, il était apprécié surtout pour sa couleur. Les Grecs le mélangeait à l'indigo pour obtenir une teinture verte qu'ils utilisaient pour teindre les tissus (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1992).

➤ Classification

Classe : *Liliopsidae*

Ordre : *Zingiberales*

Famille : *Zingiberaceae*

Sous-Famille : *Zingiberoideae*

Genre : *Curcuma*

Espèce : *Curcuma longa* L.

Le nom du genre *Curcuma* provient de la latinisation de l'arabe « kurkum » signifiant jaune et se référant à l'origine au safran.

Noms vernaculaires : Safran des Indes, Safran calédonien, Faux safran, Tumerie sauvage, Kurkum, Kharkoum, Alwaras, ...

Le genre *Curcuma* comprend de 40 à 110 espèces selon les sources, originellement répandues dans les régions d'Asie tropicale et d'Australie septentrionale, aux précipitations très saisonnières. On observe la plus grande diversité dans le genre en Inde, en Birmanie et en Thaïlande, beaucoup moins en Chine, en Australie et dans le Pacifique Sud. Sa distribution est exclusivement intertropicale (Bisset et Wichtl, 2000).

➤ Répartition géographique

Espèce originaire des zones tropicales du Sud Asiatique (Inde), le *Curcuma longa* L. est très répandu en Chine, en Indonésie, en Jamaïque, en Pérou, en Birmanie, en Thaïlande, en Australie, en Pacifique du Sud, en Europe, aux Comores, aux Mascareignes et aux Seychelles (Cheik Ali, 2012).

➤ Caractères botaniques

Le *C. longa* L. est une plante herbacée rhizomateuse, vivace qui peut atteindre une hauteur d'un mètre avec des feuilles de 50 cm de long et 7 à 25 cm de large.

Ses feuilles, à nervure axiale puissante et nervures secondaires parallèles, très longues, oblongues à elliptique sont engainantes (Boullard, 2001). Les gaines constituent une pseudotige courte. Les limbes criblés de points translucides sont vert foncé au-dessus, vert très clair en dessous (figure 11).

La floraison commence à partir de la 3^{ème} à 4^{ème} année. L'inflorescence est constituée d'un épi cylindrique formé de bractées imbriquées vert foncé et stériles, à l'aisselle desquelles naissent les fleurs blanches ou jaunâtres, une pour chaque bractée (Photo 4) (Hombourger, 2010).

Le rhizome de *Curcuma longa* (Photo 5) possède de nombreux rhizomes dont un principal mesurant environ 5 cm x 2,5 cm et présentant à maturité plusieurs rhizomes latéraux

aromatiques, cylindriques ou ellipsoïdes, de couleur gris-jaune à l'extérieur et orange sombre à l'intérieur (Standard of ASEAN, 1993).



Figure 11 : Schéma de *Curcuma longa* Photo 4 et Photo 5 : fleur et rhizome

(ReaserchGate.net, consulté le 5/4/2022)

Les rhizomes, jaune orangé en section, gris brunâtre en surface, épais et écailleux, se rident par dessiccation. Le curcuma commercialisé est dit rond et provient des rhizomes principaux qui sont de forme ovoïde. Il est ovale, piriforme et communément appelé « ampoule ».

Le curcuma long provient des rhizomes secondaires qui sont plus cylindriques. Ils mesurent 4 à 7 cm de long pour 1 à 1,5 cm de large et évoquent la forme de doigts, d'où leur appellation. Ils sont de couleur jaunâtre à brun-jaunâtre à l'extérieur et jaune ou jaune orange à l'intérieur. Les rhizomes dégagent une odeur aromatique forte lorsqu'ils sont coupés et leur goût est chaud et légèrement amer (Delaveau, 1987).

Le *Curcuma longa* est une plante stérile qui se dissémine par division de son rhizome (Jourdan, 2015).

➤ Partie utilisée

La poudre est la forme la plus utilisée aussi bien en cuisine que dans l'industrie. Elle est fabriquée selon un procédé qui obéit aux recommandations post-récoltes de la la Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO).

Les rhizomes récoltés sont bouillis dans l'eau pendant environ une heure et cela au plus tard trois jours après leur récolte. L'amidon contenu dans les rhizomes est ainsi gélifié et le séchage

est alors uniforme. Cela permet également l'élimination de toute traces et d'odeurs parasites. Ils sont ensuite séchés pendant 10 à 15 jours, à 60°C dans des tunnels aérés.

Le passage des rhizomes dans des tambours rotatifs équipés d'un maillage métallique permet de râper la surface et de supprimer les radicelles et les écailles. L'aspect des rhizomes est amélioré par un rinçage rapide avec une solution de poudre de curcuma, ce qui contribue à l'attractivité du produit commercialisé.

L'obtention de la poudre passe par une dernière étape de broyage et de tamisage (FAO, 2004).

➤ Constituants chimiques

Le curcuma contient des protéines (6,3 %), des matières grasses (5,1 %), des minéraux (3,5 %), des glucides (69,4 %) et de l'eau (13,1 %). Le dicétone phénolique (diferuloylméthane) (34% de la curcumine) est à l'origine de la couleur jaune, et comprend la curcumine I (94%), la curcumine II (6%) et la curcumine III (0,3%).

D'autres dicétones phénoliques, déméthoxycurcumine et bis-déméthoxycurcumine ont également été isolées des rhizomes de *Curcuma longa* (Bruneton, 1995).

La structure chimique de la curcumine (diferuloylméthane), principal curcuminoïde et fraction la plus importante de *C.longa* L.a été déterminée par Roughley et Whiting en 1973 (Lonchampt, 2016).

La curcumine est soluble dans l'éthanol, l'acétone, le chloroforme et l'acide acétique. Elle est insoluble dans l'eau. Dans la molécule de curcumine, la chaîne principale est aliphatique, insaturée et le groupe aryle peut être substitué ou non.

La présence de tumérones (a et b), de curdione, de curzérénone, de mono- et di-déméthoxycurcumine a été rapportée également (Bisset et Wichtl, 2000).

L'huile essentielle (5,8%) obtenue à partir de rhizomes contient de l'a-phellandrène (1%), du sabinène (0,6%), du cinéol (1%), du bornéol (0,5%), du zingibérène (25%) et des sesquiterpines (53%) (Bernard et al, 1982).

Les rhizomes sont riches en composés phénoliques tels que les monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et les curcuminoïdes (Tang et Eisenbrand, 1992).

➤ Propriétés thérapeutiques

Le curcuma est très largement utilisé dans la cuisine indienne en tant que colorant alimentaire et conservateur. En médecine ayurvédique, il est prescrit pour traiter de nombreuses affections (Bharat et *al*, 2008).

Ces dernières années, les nombreuses recherches effectuées *in vitro* ont montré l'intérêt de cette plante dans divers domaines. Les études se sont ainsi intensifiées à tel point que plus de 1 000 articles ont été intégrés dans la base de données de Medline entre 2002 et 2013 (Jourdan, 2015).

Le tableau (2) regroupe quelques propriétés thérapeutiques de *Curcuma longa*, tel que décrit dans la bibliographie :

Tableau 2 : Propriétés thérapeutiques de *Curcuma longa*

Indications	Références
Activité répulsive et antiseptique	Jilani et Saxena, 1990
Activité insecticide	Chowdhury et <i>al.</i> , 2000
Activité fongicide	Kim, 2003
Affections broncho-pulmonaires (antiasthmatique, antitussif et expectorant)	Hurtel, 2007
Céphalées et rhumes	Wicht et Anton, 2007
Infections oculaires et dermiques, arthrite, acné	Singh, 2007
Plaies chez les diabétiques	Ghanbari et <i>al</i> , 2008
Otites chroniques, manifestations allergiques et inflammatoires	Portes, 2008
Troubles digestif (action hémétique, antispasmodique et antidispeptique)	Singh, 2011

En Colombie, il est traditionnellement consommé comme stimulant circulatoire et pro-thrombose (Bussmann et *al*, 2018). Plus récemment, en 2021, Seo et *al* ont montré que *Curcuma Longa* améliore la sécrétion d'IFN- γ , un régulateur clé du système immunitaire humain, suggérant son utilisation potentielle en tant qu'ingrédient alimentaire stimulant le système immunitaire.

Chapitre II : Infections mycosiques

Cas du *Candida albicans*

II.1. Les candidoses

Dans toutes les régions du globe, les candidoses dues à des levures ubiquitaires appartenant au genre *Candida* sont présentes. Sur les 200 espèces connues, 23 sont à l'origine mycoses superficielles ou profondes et sont donc pathogènes pour l'homme (Born et *al*, 2003). Les candidoses superficielles représentent les aspects cliniques les plus couramment relevées dans les cas d'infections à *Candida*, notamment au niveau de la peau, des ongles et des muqueuses. La présence commensale des levures du genre *Candida* d'origine endogène, dans le tractus gastro-intestinal entraîne un déséquilibre du microbiote ou un déficit immunitaire la plupart des infections à *Candida* (d'Enfert, 2007).

Candida albicans est un agent causal prédominant de la candidose. Il est responsable de plus de 80 % des candidoses détectées (Silva et *al*, 2012).

Le spectre clinique de la candidose varie largement de superficielle à invasive. Le muguet buccal, la mycose vulvo-vaginale, l'infection des voies urinaires font partie des maladies les plus courantes causées par *C. albicans* chez l'homme (d'Enfert, 2021).

Cette espèce est également associée à des infections invasives telles que l'endocardite et la méningite qui sont souvent liés à une morbidité et mortalité élevées. La fréquence élevée des candidoses a créé un problème clinique grave dans le monde et le taux d'infection ne cesse d'augmenter (Chin et *al*, 2020).

Bien que ces infections soient observées à tout âge, leur impact est plus grave chez les nourrissons et les personnes âgées. Le diagnostic des candidoses est parfois difficile à cause de des symptômes très divers. De plus, elles sont source d'altération de la qualité de vie et donc de souffrance psychologique en raison de la gêne d'ordre esthétique qu'elles peuvent occasionner. Les mycoses peuvent se localiser au niveau des ongles, par exemple, et résistent aux traitements antifongiques prescrits (Richet et *al*, 2002).

Les mycoses constituent donc un véritable souci et peuvent être cataloguées en tant que problème de santé publique du fait de leur ténacité et leurs répercussions physiques et psychologiques, (Akammar et *al*, 2013).

Lors des vingt dernières années, la forte augmentation des infections superficielles à *Candida* a amélioré l'attention portée à la mycologie médicale. La proportion des atteintes à *Candida.spp* est très variable selon les études propres à chaque pays. Elle varie ainsi de 2,6% en France (Zukervar et *al*, 2011) à 52,44% en Grèce (Rigopoulos et *al*, 1998).

Les travaux de Boukachabine et Agoumi, publiés en 2005, ont montré que sur 22 ans, soit de 1982 à 2003, les cas d'onychomycose diagnostiqués par examen mycologique au laboratoire de parasitologie et mycologie à l'Hôpital des Enfants à Rabat, révèlent que 17.177 dermatophytes ont été isolés chez 4.940 patients. Les dermatophytes ont présenté 61,46 % des onychomycoses et les levures *Candida albicans* étaient responsables de 25,5 % des infections.

C'est aussi le pathogène fongique le plus souvent mis en cause dans les cas d'infection systémique nosocomiale. En 2011, l'étude réalisée par Pr El Hassani à l'hôpital Avicenne de Rabat, a montré que 22,55% de l'ensemble des mycoses superficielles sont des candidoses cutanéomuqueuses.

De même, à travers une étude rétrospective menée sur une période de cinq ans (2006–2010) au laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Casablanca, les résultats mycologiques (examen direct et culture) de 2070 prélèvements unguéaux, pratiqués durant cette période, ont été recueillis et analysés. Tous les cas d'onychomycose retenus dans cette étude affichent un examen direct et une culture tous deux positifs.

Ces résultats montrent que *C. albicans* reste la levure prédominante dans cette série (49 %), essentiellement au niveau des ongles des mains (Halim et *al*, 2013).

Les infections par ce champignon représentent ainsi une composante majeure de la charge de morbidité causée par les champignons (Yapar, 2014).

L'impact des candidoses sur la santé humaine se fait sentir de plus en plus notamment en raison du nombre croissant de patients immunodéprimés, de l'augmentation des transplantations d'organes, des chimiothérapies et de l'utilisation généralisée d'antibiotiques qui déséquilibre le microbiote humain (Sellam et Whietway, 2016).

De plus, ces infections deviennent difficiles à traiter en raison de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. L'altération génétique de ces souches renforce également leur

virulence, ce qui crée une difficulté supplémentaire (Gow et *al*, 2011) d'où la nécessité de rechercher de nouveaux composés antifongiques.

II.1.1. *Candida albicans*

C. albicans possède une polyvalence en tant qu'agent pathogène et s'adapte en tant que commensal à divers sites anatomiquement distincts du corps humain. Il peut se retrouver au niveau de la cavité buccale, du tractus gastro-intestinal et du tractus génital (Dantas et *al*, 2016).

Ce champignon provoque également des infections cutané-muqueuses et superficielles au niveau de la peau et des ongles ainsi que des infections systémiques, qui surviennent souvent par translocation et dissémination du tractus gastro-intestinal dans la circulation sanguine (figure 12, d'Enfert et *al*, 2020).

Certains protocoles médicaux tels que l'antibiothérapie, la corticothérapie, les traitements immunosuppresseurs, la chimiothérapie, les interventions chirurgicales antérieures, les greffes d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques, les affections comme le sida, la leucémie, le diabète et le lymphome, les traumatismes et les brûlures constituent des facteurs de risque de la candidose invasive (Aubry, 2022).

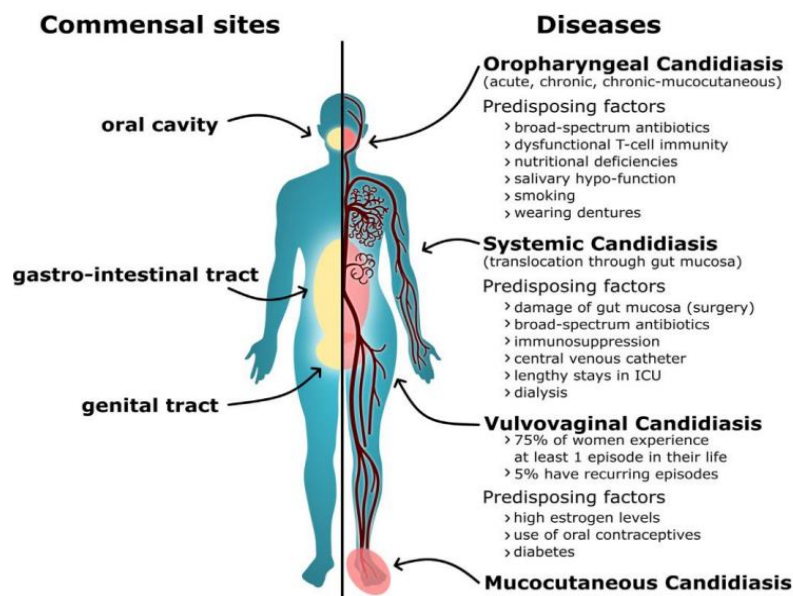


Figure 12 : Sites d'infection de *C. albicans* et facteurs aggravant des candidoses (d'Enfert et *al*, 2020)

II.1.2. Classification et caractéristiques de *C. albicans*

➤ Classification

Règne : Fungi (Champignons)

Division : *Ascomycota*

Classe : Saccharomycètes

Ordre : Saccharomycétales

Famille : Saccharomycétacées

Genre : *Candida*

Espèce : *Candida albicans*

➤ Reproduction

C. albicans est polymorphe car il peut prendre l'aspect de levures ou l'aspect de pseudo-hyphes selon la température, le pH et les nutriments du milieu (Ryan et *al*, 2004). Il est diploïde et encapsulé.

La forme levure est la plus couramment observée et elle est associée à une reproduction asexuée par bourgeonnement pour donner des blastoconidies. Les pseudo-hyphes dépourvus de structures propres aux hyphes vrais (parois parallèles, septum, etc ...) ont l'allure de longs filaments et produisent des chlamydospores aux parois épaisses (Théraud et *al*, 2004).

Les colonies d'aspect plissé apparaissent de 48 à 72 heures après la mise en culture à 37 °C sur un milieu de culture de champignons tel que la gélose de Sabouraud. Elles prennent ensuite un aspect lisse à la remise en culture.

➤ Adhésion et invasion

C. albicans est un agent pathogène connu pour sa capacité à déployer deux mécanismes d'action distincts (Figure 13) : l'endocytose induite et la pénétration active (Zhu et Filler, 2010).

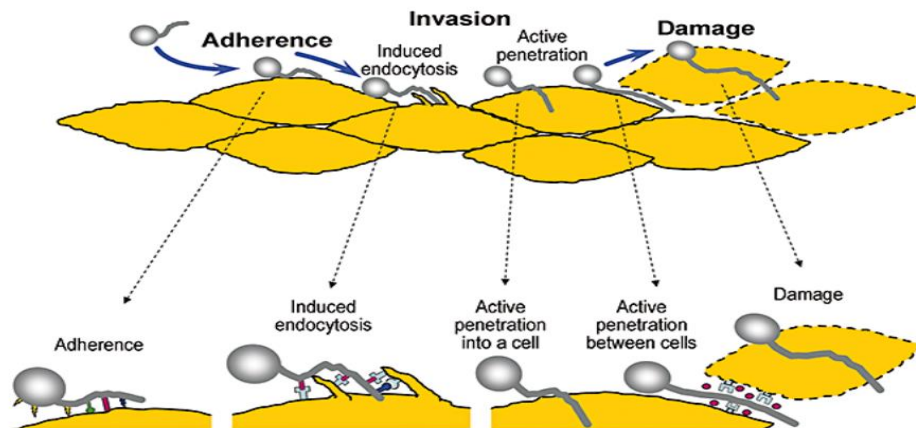


Figure 13 : Schéma des différentes étapes d'interaction *C. albicans* - cellules épithéliales (Zhu et Filler, 2010)

L'espèce *C. albicans* a la capacité de provoquer différents types d'infection en régulant l'expression de ses facteurs de virulence dans les différentes niches du corps humain.

La pathogénicité de cette espèce est médiée par l'altération de la résistance d'un hôte à l'infection, localement ou systémiquement. Les enzymes hydrolytiques sécrétées par ce champignon sont responsables des facteurs de virulence et de sa pathogénicité. Elles interviennent dans les mécanismes d'invasion et dégradent des protéines de l'organisme infecté telles que l'hémoglobine et la kératine, ainsi que la structure de la membrane des cellules afin de faciliter l'invasion. Elles ciblent également les cellules du système immunitaire et évitent les agents antimicrobiens (Poulain, 2013).

II.1.3. Mode d'action

Les études rapportent que les *Candida* possèdent une grande capacité à s'adapter et à se développer dans différentes conditions environnementales et dans des niches distinctes qui présentent des pH différents jusqu'à une valeur de (-2) dans l'estomac, par exemple. La croissance de ce champignon est ralentie à un pH alcalin (Costa et al, 2020).

La flexibilité métabolique de *Candida albicans* est un facteur essentiel dans sa propagation en raison de sa capacité à occuper divers sites dans le corps humain qui contiennent différentes sources de carbone assimilables et non assimilables. *C. albicans* a la capacité de croître et d'assimiler bon nombre de ces sources de carbone, principalement le glucose (Jacobsen et al, 2021).

Les biofilms de *C. albicans*, structures hautement organisées, sont omniprésents dans différents environnements. Ils se forment lorsque les champignons se fixent, adhèrent et s'accumulent sur des surfaces, sur lesquelles ils peuvent résister à un traitement antibiotique. La première étape d'initiation de la matrice extracellulaire, organisée en structure robuste est l'adhésion des cellules de *C. albicans* aux surfaces (Mendonça et al, 2022).

Ce processus est contrôlé via un réseau de facteurs de transcription de plus de 1000 gènes. La formation de biofilm dépend de l'espèce de *Candida* impliquée, par des modèles distincts de morphogenèse, par des agents environnementaux et par le type et la qualité des surfaces de contact (Nobile, 2015).

En général, les cellules et le biofilm sont une communauté coopérante d'adhérents qui sont attachés aux surfaces et se développent en produisant des polymères extracellulaires qui fournissent une matrice structurelle qui peut faciliter l'adhésion (Kokare et al, 2009).

Les biofilms de *C. albicans* présentent quatre phases de développement distinctes (Figure 14) :

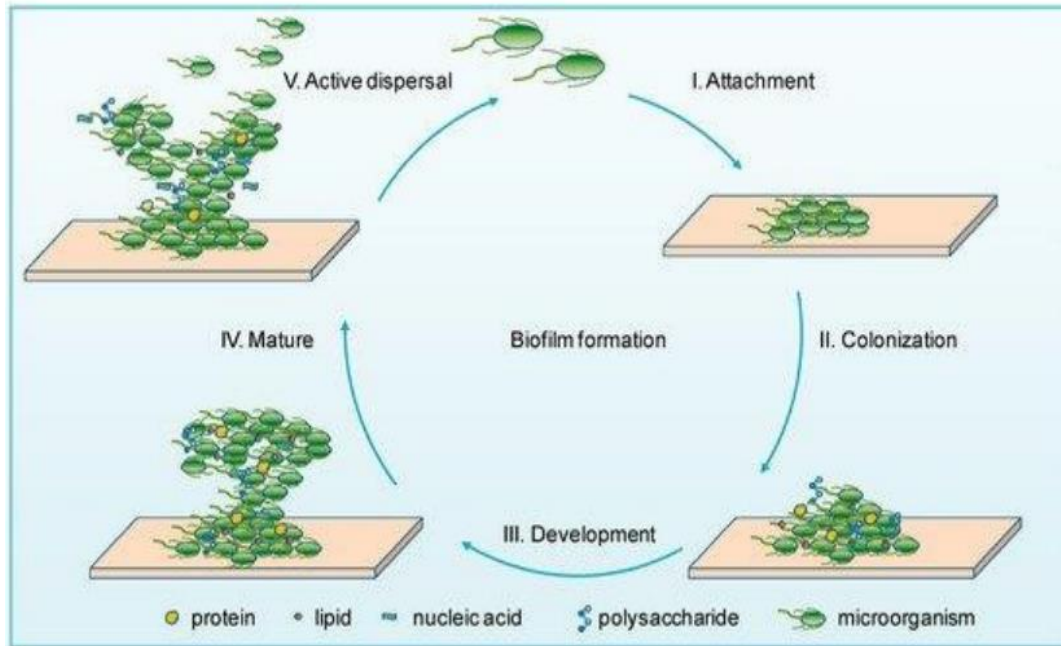


Figure 14 : Formation du microfilm de *C. albicans* (Kojic et Darouiche, 2004)

- 1- La phase précoce pendant laquelle les cellules de levure sphériques favorisent l'adhérence aux surfaces.
- 2- La phase intermédiaire, où la couche basale de la matrice avec des cellules proliférantes est formée par des cellules de levure passant à une forme filamenteuse.
- 3- La phase de maturation avec un ancrage accru des cellules fongiques, une croissance des hyphes concomitante à la production de matériau de matrice extracellulaire, agencé pour produire une architecture tridimensionnelle.
- 4- Le réseau dense de cellules sous forme de levures, pseudo-hyphes et hyphes, peut lentement disséminer les cellules de levure de la matrice vers de nouveaux sites d'ensemencement.

➤ Résistance aux médicaments

Un large éventail de produits de synthèse (Tableau 3) sont prescrits en traitement antifongique (López-Martínez, 2010).

Tableau 3 : Produits antifongiques de synthèse généralement prescrits

Exemple d'infection au <i>C. albicans</i>	Traitement fongique prescrit
Candidose vaginale	Antifongiques azotés topiques ou oraux : butoconazole, clotrimazole, triazole et l'éconazole.
Candidose mucocutanée	Antifongiques systémiques : fluconazole, traconazole et voriconazole.
Candidose invasive	Caspofongine ou formulations lipidiques d'amphotéricine B.

Il a été démontré que l'usage répété du fluconazole par exemple, notamment chez les patients immunodéprimés à qui il est administré à titre de prophylaxie chronique induit une résistance à ce produit (Ruhnke M., 2006). Une résistance aux échinocandines a aussi été décrite par Antinori en 2016.

II.2. Plantes à activité antifongique

L'activité antifongique d'extraits de plusieurs plantes médicinales marocaines a été mise en évidence dans le cadre d'études *in vitro*.

A titre d'exemple, Ceyhan et *al*, en 2012, ont montré que des plantes du genre *Eryngium* (plantes herbacées de la famille des Apiacées, chouka zerga, en arabe), tels que *E. maritimum*, *E. arvense*, *E. campestre* et *E. planum* possèdent des activités antimicrobiennes contre des champignons tels que *C. albicans* et *C. glabrata*.

Une étude a également été menée pour évaluer l'effet antifongique des extraits de *Daphne gnidium* (arbuste de la famille des Thyméléacées, lazaz en arabe) sur différents agents pathogènes. El Makhfi (2012) a ainsi testé des extraits aqueux et méthanolique de *D. gnidium*

sur quinze champignons pathogènes et montré un effet inhibiteur vis-à-vis de *Pythium catenulatum*, *P. torulosum*, *P. diclinum*, , *C. glabrata*, et *C. albicans*.

Talibi et *al.* (2012) ont également étudié l'effet antifongique des extraits organiques de huit espèces végétales marocaines contre l'agent de la pourriture aigre des agrumes, *Geotrichum candidum*. Les auteurs ont remarqué que parmi huit extraits végétaux, seuls les extraits méthanoliques de *Cistus villosus*, *Ceratonia siliqua* et *Halimiumum bellatum* ont présenté de puissants effets antifongiques et antibactériens.

Hassikou et *al.*, en 2014, ont également démontré l'activité antimycosique des extraits de feuilles et de l'écorce de *Quercus suber* sur une souche de *C. albicans*, responsable d'une infection vaginale. Les concentrations minimales d'inhibitions (CMI) relevées étaient comprises entre 12,5 et 50 mg/ml.

II.3. Monographie de *Quercus suber* L.

Au Maroc, les formations forestières naturelles et les nappes alfatières couvrent environ 9 millions d'hectares (5 814 000 ha pour les essences et 3 186 000 pour les nappes alfatières), soit un taux de couverture de 12,6% du territoire national. Ces écosystèmes sont stratégiques en raison de leurs divers rôles socio-économiques (recettes, matière première, ressources énergétiques, source d'emplois et de revenus, etc) (Aafi et *al.*, 2007)

Le chêne-liège, *Quercus suber* est une essence endémique du domaine méditerranéo-atlantique, mais son aire de répartition s'est fortement réduite suite à de fortes variations climatiques et surtout à l'action anthropique (Benabid, 2005).

➤ Classification

Classe : *Equisetopsidae*

Ordre : Fagales

Famille : *Fagaceae*

Sous-famille : *Quercoideae*

Genre : *Quercus*

Espèce : *Quercus suber* L.

Noms vernaculaires : Elfelline, Lfernane

➤ Distribution géographique

Le chêne-liège est endémique des pays du bassin méditerranéen occidental (Figure15). La suberaie mondiale s'étend sur environ 2 687 000 ha, répartis exclusivement sur 7 pays : le Portugal avec une superficie de 860 000 ha (32%), l'Espagne avec 725 000 ha (27%), le Maroc avec 440 000 ha (16,4%), l'Algérie avec 375 000 ha (14%), la Tunisie avec 5,3%, l'Italie avec 3,7% et la France avec 1,6% (Quézel et Médail, 2018).

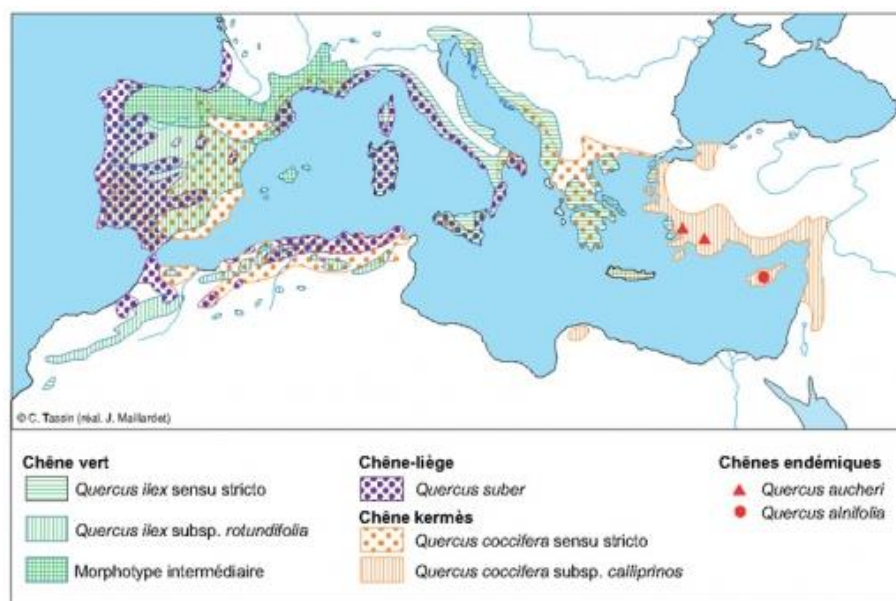


Figure 15 : Répartition spatiale des chênes sclérophylles dans le bassin méditerranéen (Quézel et Médail, 2018)

Au Maroc, les principaux massifs s'étendent dans le Rif, le Moyen-Atlas, le plateau central et la Meseta occidentale. Sa présence dans le Haut-Atlas est relativement peu importante. C'est le seul arbre qui présente encore des forêts de plaines suffisamment vastes et denses telles que les suberaies de la Mâamora et de Larache (Mhirit et Blerot, 1999).

➤ Description botanique

Q. suber est un arbre monoïque pouvant atteindre 10 à 15 m de haut (Photo 6). Il est caractérisé par :

- un tronc court entouré par une écorce très épaisse, dure, elle-même protégée par le liège,
- des feuilles alternes, simples, persistantes, spiralées sur tous les rameaux, coriaces, ovales, plus ou moins dentées et épineuses, glabres et de couleur verte.
- des fleurs unisexuées, actinomorphes plus ou moins staminées, groupées en épis dressés ou bien en cymes réduites (Campbell et al, 2002).
- des fruits : des glands, de forme ovoïde, pourvus d'un pédoncule court (Photo 7). Ils sont assez gros, allongés et contenus dans une cupule aux écailles molles et veloutées qui les relie au rameau. La cupule est un organe creux qui, à maturité entoure seulement la base de l'akène (El Hachemi, 2010).



Photo 7 : *Quercus suber* de la Maamora



Photo 6 : Glands

(Photos Lahlimi, 15/10/2021)

➤ **Ecologie**

Cette essence dépend fortement des conditions édaphiques et bioclimatiques du milieu. Elle est héliophile, sensible aux variations de la lumière. Elle est donc présente dans les zones bioclimatiques subhumides, humides et subhumides chaudes, tempérées et fraîches, exceptionnellement semi-arides chaudes et tempérées. Les suberaies s'accommodent de précipitations moyennes annuelles pouvant varier de 400 à 2000 mm (Aafi, 2007).

Du point de vue édaphique, *Q. suber* est essentiellement calcifuge, préfère les sols siliceux et acides tel que les sables pliocènes du Maroc. Il s'accommode de sols peu fertiles, superficiels ou riches en argiles, mais recherche plutôt des textures légères (sables), bien aérées et riches en matière organique (Hammoudi, 2002).

➤ **Usages**

Au niveau de l'écorce, le phelloderme, situé au-dessous de la couche de liège, fournit un tanin (dit dbagh en arabe) très utilisé par l'industrie de la tannerie (Ballu, 2004).

Les caractéristiques du liège (souplesse, isolant, etc) en font un matériau très demandé pour l'élaboration d'articles particuliers (agglomérés d'isolation, revêtement, décoration, bouchons,...). Depuis quelques années, il est également utilisé dans la construction de maisons

écologiques pour ses excellentes performances thermiques et acoustiques (Belghazi et *al*, 2003).

Le Maroc est l'un des principaux pays producteurs et exportateurs du monde. Il exporte 80% de sa production totale. Le bois du chêne-liège, dur et durable, résiste bien dans l'eau et c'est aussi un excellent bois pour la charpente et les traverses de chemin de fer.

➤ Utilisation en médecine traditionnelle

Les parties utilisées sont le latex, l'écorce des jeunes rameaux, les feuilles, les glands. Le latex est utilisé en usage externe dans le traitement des morsures de serpents et de la gale animale (Sijelmassi, 2011).

L'écorce est très utilisée vue ses nombreuses propriétés thérapeutiques :

- En gargarisme avec une décoction de 20g d'écorce dans un litre d'eau pendant 10 minutes en cas d'angine ou d'inflammation de la gorge avec douleur modérée à la déglutition, sans fièvre (Sijelmassi, 2011).
- En bain de siège avec une décoction de 80g d'écorce dans un litre d'eau pendant 10 minutes pour soigner les hémorroïdes et les affections de la peau (Atbib et *al*, 2007).
- En lotion pour stimuler la repousse des cheveux (Sijelmassi, 2011).

➤ Composition chimique

De nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur les caractéristiques phytochimiques de *Q. suber*. Boubaker et *al* (2010) ont par exemple, rapporté que l'écorce contient 3,5% de matières minérales, 9,5% de matière azotée totale et 54,1% de fibres insolubles dans les détergents neutres (NDF).

L'écorce contient essentiellement de la lignine, de la cellulose, des quantités importantes de composés extractibles par les solvants comme les cires, les composés aliphatiques et aromatiques et ceux extractibles par les acides phénoliques tels que les tannins, les flavonoides, les aldéhydes phénoliques et les coumarines (Fernandes et *al*, 2011).

D'autres travaux ont révélé que la concentration des composés phénoliques solubles totaux est estimée à 12,31% et celles des phénols polymérisés à 2,95% (Cabiddu et *al*, 2000).

Sonia et *al*, en 2010, ont identifié 15 composés phénoliques dont les acides ellagiques, galliques et protocatéchiques et ont montré que ce sont des composants majoritaires dans l'extrait de feuilles.

La composition tannique dans des échantillons de liège de reproduction de *Q. suber* a été étudiée à différents stades de transformation industrielle. Les ellagitanins, les roburines A et E, la grandinine, la vescalagine et la castalagine ont été identifiés et quantifiés par HPLC. Le groupe de tanins hydrolysables est le plus abondant dans l'extrait tannique pour tous les échantillons et la castalagine est la composante principale (Cadahia et *al*, 1998).

D'autres composés ont été également identifiés pour la première fois par Sonia et *al* (2010) en tant que composants du liège, notamment l'acide salicylique, l'ériodictyol, la naringénine et l'acide hydroxyphenyllactique.

D'autres substances ont également été identifiées en 2012 par une équipe de recherche pakistanaise. Khurram et *al* (2012) ont rapporté que l'écorce du genre *Quercus* est caractérisée chimiquement par la présence de flavonoïdes, tanins hydrolysables qui donnent, après hydrolyse, soit de l'acide gallique soit de l'acide ellagique, des tanins condensés, non hydrolysables qui rougissent par oxydation et donnent du pyrocatechol et divers tanoïdes et des saponines.

➤ Activités biologiques

Les différentes parties de *Q. suber* sont riches en molécules biologiquement actives qui lui confèrent de nombreuses propriétés biologiques. L'écorce est ainsi riche en substances polyphénoliques qui ont une activité antioxydante et antiradicalaire. Ces composés ont une grande capacité de piégeage des radicaux libres responsables de gros dommages dans le corps humain (Fernandes et al, 2011).

L'extrait brut de l'écorce possède également des propriétés antibactériennes sur les bactéries Gram positif comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et de type Gram négatif comme *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que des propriétés antifongiques sur *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* et *Candida Kreusi* (Didem et al, 2007).

L'extrait méthanolique de l'écorce a également montré une activité inhibitrice sur 3 moisissures qui affectent les pommes en post-récolte : *B. cinerea*, *A. alternata* et *P. expansum* (El Oudni, 2012).

Khurram et al, en 2012, ont rapporté que ces composés phénoliques et particulièrement les tanins comme les acides galliques et ellagiques ont un effet inhibiteur et antiprolifératif sur des lignées cellulaires cancéreuses du côlon.

Hassikou et al, en 2014, ont mis en évidence l'effet inhibiteur sur deux souches vaginales : *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans*.

Chapitre III : Toxicité aigüe de
Quercus suber, Rosmarinus
officinalis, Lavandula angustifolia et
Curcuma longa L.

La médication par les plantes connaît un regain d'intérêt notable. Grâce aux études scientifiques basées sur l'observation, l'expérimentation et une multitude d'analyses, les prescriptions empiriques des plantes médicinales deviennent de plus en plus crédibles (Fournier, 1999).

Les consommateurs ont tendance à penser, à tort, que les plantes présentent peu ou pas de danger du fait qu'elles sont naturelles (Rhalem et *al*, 2010). C'est ainsi qu'au Maroc comme dans tous les pays du monde, les plantes reconnues par ailleurs pour leurs qualités médicinales sont à l'origine d'intoxications accidentelles et parfois aussi volontaires. D'autant plus que l'engouement pour tout ce qui est naturel encourage au recours aux soins par les plantes, augmentant ainsi le risque d'erreurs qui peuvent s'avérer fatales. Cette situation constitue donc un problème de santé publique sérieux (Chater, 2016).

Par ailleurs, lorsqu'une plante contient un ou plusieurs composés présentant des effets négatifs pour l'Homme ou pour les animaux et que son utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves, cette plante est alors reconnue comme étant toxique. L'impact de l'utilisation d'une plante dépend de nombreux facteurs : la partie consommée, la quantité, la prise à jeun ou non ainsi que l'âge de l'utilisateur et les circonstances de prise (Fournier, 1999).

De manière globale, les cas d'intoxication tels que rapportés par le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) montrent que les accidents surviennent à la suite de pratiques anarchiques et non contrôlées des plantes.

La toxicité d'une plante regroupe donc l'ensemble des effets négatifs qui peuvent apparaître à la suite de l'ingestion ou l'inhalation d'une plante ou d'une partie d'une plante sous forme d'une dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées. Ces effets peuvent être des lésions morphologiques ou fonctionnelles plus ou moins graves dans un organisme vivant (Etame et *al*, 2017).

III.1. Effets indésirables des plantes médicinales

Bien que considérées comme sûres par la plupart des gens, les plantes médicinales peuvent avoir des effets indésirables ce qui peut, parfois, mettre la vie de l'utilisateur en danger.

Des études sur les effets indésirables de la phytothérapie montrent que la plupart des effets nocifs des plantes médicinales sont rapportés non pas à la plante elle-même, mais à une erreur d'identification, à une contamination involontaire par une autre plante, par des métaux lourds, par des micro-organismes pathogènes ou par des résidus agrochimiques, au non-respect de la dose adéquate ou à une interaction avec les médicaments (Zeggwagh et al, 2013).

A titre d'exemple, le ginseng a peu d'effets négatifs graves quand il est pris seul, toutefois, s'il est combiné avec la warfarine, son activité antiplaquettaire risque d'entraîner une anticoagulation excessive (Dong et al, 2017).

L'erreur d'identification des plantes peut être illustré par l'exemple de Belgique où plus de 50 personnes ont été atteintes d'insuffisance rénale en 1996 après avoir ingéré une préparation à base de plantes contenant *Aristolochia fangchi* (guang fang ji), une plante toxique, au lieu de *Stephania tetrandra* (fang chi hang) suite à la confusion entre ces deux espèces portant des noms vernaculaires chinois très proche (OMS, 2005).

Certaines plantes contiennent également des substances susceptibles de provoquer des réactions allergiques telles que les lactones sesquiterpéniques comme l'hélénaline, l'herniarine, la cnicine et la cynaropicrine (Wichtl et Anton, 2003). Ces substances sont détectées dans les plantes appartenant à de nombreuses familles végétales telles que les *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Amaranthaceae*, *Aristolochiaceae*, et *Lauraceae* (Zekkour, 2008).

III.2. Effets toxiques de certaines plantes

Les intoxications par les plantes constituent un accident fréquent dans la plupart des régions du monde. Certaines plantes sont classées dans la catégorie des plantes toxiques à intérêt médicinal et d'autres sont classées dans la catégorie des plantes médicinales à composés potentiellement toxiques (El Alami, 2021).

La toxicité des plantes est causée essentiellement en cas d'usage prolongé et à fortes doses et en cas d'utilisation de ces plantes par des personnes vulnérables.

A titre d'exemple, *Salvia officinalis* L., *Artemisia herba-alba* Asso. et *Artemisia arborescens* L., sont toutes trois des plantes médicinales efficaces à faible dose mais très toxiques à forte dose (CAPM, 2016). La feuille de Sauge officinale (*Salvia officinalis* L.) appartenant à la famille des Lamiaceae et inscrite à la 8^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne, contient de la thuyone, une cétone monoterpénique. Cette substance, consommée à forte dose unique (plus de 15 grammes de feuilles par dose) ou bien à de faibles doses répétées, peut provoquer des convulsions (Botineau, 2014).

La feuille de Ginkgo (*Ginkgo biloba* L., famille des Ginkgoaceae), inscrite également à la 8^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne, utilisée à des doses supérieures à celles recommandées peut provoquer des effets indésirables tels que des diarrhée, nausées, vomissements, agitation et faiblesse (Blumenthal, 2003).

Par ailleurs, la nuisance des remèdes à base de plantes peut dépendre aussi de facteurs liés aux consommateurs, tels que l'âge, la génétique et les maladies concomitantes (Zeggwagh et al, 2013).

En outre, les principes actifs des plantes qu'ils soient répartis dans toute la plante ou bien localisés spécifiquement dans une partie sont la base de leurs vertus ou de leur danger. Il s'agit de métabolites secondaires de nature chimique très variée et de concentration peut être importante comme ils peuvent exister à l'état de traces, ce qui n'enlève rien à leur dangerosité.

En conséquence, l'Organisation Mondiale de la Santé a prescrit des directives d'étude pour l'étude de la toxicité des plantes médicinales. Elles concernent les tests de toxicité aiguë, les tests de toxicité à long terme, les tests de toxicité locale et les tests de toxicité spéciaux.

Des lignes directrices ont également été proposées par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) en 2002, 2008 et 2018. Les médicaments traditionnels et à base de plantes sont de plus en plus utilisés, la validation scientifique de leur usage est devenue nécessaire et les études toxicologiques aiguës préliminaires sont essentielles pour prévenir le surdosage de médicaments à base de plantes et aident à déterminer les doses appropriées à utiliser pour un effet thérapeutique (Sankhadip, 2021).

III.3. Activité pharmaco-toxicologique

L'utilisation des plantes médicinales repose essentiellement sur la base de connaissances oralement transmises par les ancêtres, qui même s'ils ont au fil du temps découvert les vertus des plantes, ne maîtrisent pas les données relatives à leur phytochimie ni leurs propriétés pharmaco-toxicologiques ce qui accroît les risques pour les usagers (Hammiche et *al*, 2013). Par conséquent, la nature du principe actif est un facteur évident qui influence l'activité pharmacologique ou toxicologique d'une plante.

Les principes actifs d'origine végétale sont extrêmement variés, tant du point de vue structures moléculaires qu'impacts biologiques, ce qui confère à la plante son activité thérapeutique ou toxique. Les plus dangereux sont surtout les alcaloïdes, les hétérosides cardiotoniques, les terpénoïdes des huiles essentielles ; en second lieu arrivent les quinones, les saponosides, les furanocoumarines, les glucosinolates, les polyines et les oxalates de calcium qui ont des actions diverses sur les différents systèmes du corps (Alison et Paul, 2008).

De ce fait, des études phytochimiques poussées des plantes recensées s'imposent pour mieux identifier les principes responsables des effets nuisibles. Les effets indésirables et les signes d'intoxication diffèrent d'une plante à l'autre. À titre d'exemple, *Mandragora autumnalis* Bertol et à cause de sa teneur en divers alcaloïdes dont les principaux sont la mandragorine, l'hyosciamine et l'atropine provoque une irritation gastro-intestinale, des hallucinations et un syndrome anticholinergique (Piccilo et *al*, 2002). Au Maroc, dans les campagnes, des enfants attirés par l'aspect luisant et la belle couleur orange des baies sont parfois victimes d'intoxication pouvant mener au décès (Bellakhdar, 1997).

Une substance qui pénètre dans l'organisme peut avoir des effets bénéfiques ou toxiques. Inversement, l'organisme peut agir sur cette substance : c'est le métabolisme. La réponse de l'organisme à l'administration d'une substance toxique dépend de la quantité de la substance qui se retrouve dans un tissu ou un organe (Baynes et *al*, 2010).

Les substances toxiques ne produisent pas des effets avec la même intensité sur tous les organes. Cela dépend de nombreux facteurs, y compris l'importance de l'organe et la quantité des substances toxiques et/ou des métabolites réactifs qu'il contient. Des organes tels que le rein et le foie sont bien approvisionnés avec le sang et sont métaboliquement actifs, parce qu'ils ont un rôle important dans la biotransformation et l'excrétion des toxiques. Ces organes sont

appelés organes cibles puisqu'ils sont plus vulnérables et plus exposés que les organes ou les tissus mal irrigués ou métaboliquement moins actifs tels que la peau et l'os (Timbrell, 2000 ; Lapointe, 2004).

III.4. Etude de la toxicité

L'étude de la toxicité d'une substance regroupe les tests pharmacologiques, qui permettent de déterminer le degré de la nocivité de cette substance afin de soumettre son usage à un règlement précis. L'effet d'une substance toxique est évalué en fonction de plusieurs paramètres, dont le mode d'administration (orale, intraveineuse, intrapéritonéale), la posologie, la mortalité observée, les modifications du poids corporel, l'étude histologique de certains organes et les modifications de certains paramètres biochimiques sanguins appelés marqueurs de toxicité comme les transaminases (ALAT, ASAT), bilirubine, créatinine et urée (Etame et *al*, 2017).

Selon le nombre et la période d'exposition, la rapidité d'apparition des symptômes, leur sévérité on distingue quatre types d'entités toxiques (OCDE, 2018).

➤ Toxicité subchronique

L'exposition à la substance testée est de 90 jours. L'étude porte sur des lots de rongeurs mâles et femelles exposés pendant 6 heures au produit testé à 3 niveaux de concentrations au moins. Les animaux sont sacrifiés dans les 24 heures qui suivent la fin de la période d'exposition. Elle permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition répétée à une substance pendant 13 semaines par des examens cliniques avec observation des modifications de la peau, des poils, des yeux, des muqueuses de l'appareil respiratoire, circulatoire et le système nerveux.

➤ Toxicité chronique

La substance testée est administrée par voie orale, voie cutanée ou inhalation quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, la dose maximale ne dépassant pas 1000mg/kg de poids corporel, pendant 12 mois. Des durées plus courtes ou plus longues peuvent être choisies, ce qui permet aux effets de toxicité cumulés de se manifester.

➤ **Toxicité subaiguë**

Sur une période de 28 jours, la substance d'essai est administrée à plusieurs groupes d'animaux à différents niveaux de dosage à raison d'une dose précise pour chaque groupe. L'intoxication subaiguë correspond alors à des expositions fréquentes et répétées sur une période de plusieurs jours ou semaines pour que les symptômes d'intoxication apparaissent.

➤ **Toxicité aiguë**

La substance d'essai est administrée généralement oralement par une dose unique. L'essai-limite correspond à un niveau de dose d'au moins de 2000 mg/kg de poids corporel. Les animaux sont observés attentivement pendant les 4 premières heures puis quotidiennement par la suite, pour un total de 14 jours généralement. La toxicité aiguë concerne alors les effets indésirables qui surviennent dans les 14 jours suivant une exposition unique (OCDE, 2018).

L'usage clinique d'une plante doit par conséquent être toujours précédé d'un test de toxicité sur des animaux afin d'exclure tout risque encouru par l'homme lors de l'administration du produit. L'observation décrit les symptômes de l'intoxication observés, compare les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la DL_{50} qui est la dose d'une substance qui peut causer la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises (Sankhadip 2021).

Cette valeur, bien que limitée car elle ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions, elle constitue tout de même un paramètre intéressant (OCDE, 2018).

2^{ème} partie :
PARTIE EXPERIMENTALE

**Chapitre I : Evaluation de l'effet des
extraits de *Rosmarinus officinalis*,
Lavandula angustifolia et *Curcuma
longa* L. sur l'activation
plaquettaire chez les patients
COVID-19**

Introduction

La maladie à coronavirus COVID-19 causée par le virus SARS-CoV-2 a conduit à une urgence sanitaire sans précédent dans le monde. Elle se caractérise par un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) accompagné de pathologies cliniques, dont diverses coagulopathies pouvant être associées à une agrégation et une hyperactivation plaquettaire. Par conséquent, l'implication de la fonction plaquettaire dans la physiopathologie du COVID-19 est complètement admise (Huang et *al*, 2020).

Alors que la campagne de vaccination est en cours, seuls quelques traitements ont montré une efficacité contre le SRAS-CoV-2, qui est probablement le plus grand défi pour les systèmes de santé publique dans la plupart des pays (Petersen et *al*, 2020).

Les activités antivirales efficaces des produits naturels ont été prouvées par différentes études (Arakawa et *al*, 2009 ainsi que Sun et *al*, 2020). Ainsi, *Rosmarinus officinalis* L. est une espèce largement connue pour ses usages médicaux. Ses feuilles ont un potentiel thérapeutique important contre un large éventail de maladies telles que le diabète, les troubles de l'estomac, les maladies respiratoires et inflammatoires (Bakirel et *al*, 2008). En médecine traditionnelle, le romarin est utilisé pour la prévention et le traitement du diabète et des maladies cardiovasculaires (Ribeiro-Santos et *al*, 2015).

Lavandula angustifolia, plante présente dans de nombreux pays, particulièrement dans le pourtour méditerranéen et précisément au Maroc, est connue pour ses qualités antifongiques, antimicrobiennes et antiprotozoaires (Cavanagh et *al*, 2002 et Moon et *al*, 2006).

À notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'effet des extraits de ces plantes sur la fonction plaquettaire chez les patients COVID-19.

Curcuma longa, L. a une longue histoire d'utilisation dans différentes médecines traditionnelles (Ayati et *al*, 2019) et est devenu incontournable dans la médecine alternative en raison de ses propriétés anti-inflammatoires et effets antioxydants (Kocaadam et *al*, 2017).

Récemment, il a été démontré que *Curcuma longa* améliore la sécrétion d'IFN- γ , un régulateur clé du système immunitaire humain, suggérant son utilisation potentielle en tant que stimulant du système immunitaire (Seo et *al*, 2021). En Colombie, il est traditionnellement consommé comme stimulant circulatoire et pro-thrombose (Bussmann et *al*, 2018).

I.1. Matériel et méthodes

I.1.1. Matériel

I.1.1.1. Profil clinique des patients

Les critères d'inclusion comprennent des patients, hospitalisés ou non, ayant présenté un diagnostic confirmé de COVID-19, à l'aide d'un test de transcriptase inverse-amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) sur des prélèvements nasopharyngés. Ces patients ont été admis à l'hôpital Cheikh Zaïd du 7 décembre 2020 au 8 mars 2021.

Le tableau 4 décrit les caractéristiques cliniques des patients COVID-19.

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques des patients

Index	Donneurs sains	Patients COVID-19	p value
Nombre de patients	10	10	
Femmes/Hommes	5/5	5/5	--
Age	50.32±12.24	53±16.27	0.82
Poids en kg	79.44±26.82	82.67±13.94	0.94
Nombre de plaquettes x 10 ⁹ /L	238±75.59	187.5±96.61	0.21
Nombre de lymphocytes x 10 ⁹ /L	1.19±0.87	1.08±0.53	0.36
ALT, U/L	20.54±5.43	34.22±15.48	0.01
AST, U/L	19.62±4.40	36.17±14.81	0.01
LDH, U/L	362.89±134.37	616.30±192.36	0.01
C-reactive protein, mg/L	8.39±4.11	22.64±12.43	0.05
D-dimers, mg/L	0.56±0.38	1.46±0.62	0.01

ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), LDH (lactate dehydrogenase)

Le test t de Student non apparié a été utilisé pour calculer les valeurs de p. Les chiffres en gras indiquent une signification statistique à $\leq 0,05$

Le bilan des patients montre un taux élevé de transaminases hépatiques révélant une inflammation au niveau du foie. L'augmentation du taux de LDH témoigne d'un dommage cellulaire. Le taux élevé de la CRP est un marqueur de lésion cellulaire et celui des D-dimères, fragments de fibrine, indique la présence de microthromboses vasculaires.

I.1.1.2. Matériel végétal

Les espèces *Rosmarinus officinalis* et *Lavandula angustifolia* ont été récoltées au sein du jardin de l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques à Taounate en Mars 2021. L'espèce *Curcuma longa* L. a été acquise du commerce sous forme de racines en poudre issues de l'agriculture biologique.

Les espèces testées ont été botaniquement authentifiées par le Pr H. Khamar (Département de Botanique et d'Ecologie Végétale, Institut Scientifique, Université Mohammed V, Rabat, Maroc)

Les numéros des vouchers des plantes sont les suivants :

RAB112425 : *Rosmarinus Officinalis*

RAB112424 : *Lavandula Angustifolia*

RAB112426 : *Curcuma Longa* L.

I.1.2. Méthodes

I.1.2.1. Extraction au Soxhlet

Les parties aériennes des plantes sont séchées à 40°C pendant 48h, broyées à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisées avec une maille de 300 microns d'ouverture. Les poudres obtenues sont stockées dans des sachets alimentaires à température ambiante dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité.

L'extraction est réalisée par la technique de Soxhlet (Photo 8): 20 g de poudre sont placés dans la cartouche en cellulose et 750ml de méthanol à 85% sont placés dans le ballon, pendant 32 heures, temps nécessaire à l'épuisement total du matériel végétal, selon le protocole décrit par

Owen et Johns (1999). L'extrait est ensuite filtré, concentré sous pression réduite au moyen d'un rotavapeur (Photo 9).



Photo 8 et Photo 9 : Appareil de Soxhlet et Rotavapeur du Laboratoire de Botanique de la FSR

I.1.2.2. Isolement des plaquettes

L'extraction des plaquettes est réalisée au Centre de Recherche de l'Université Internationale Abulcassis des Sciences de la Santé. Elle débute par une centrifugation à vitesse réduite (190g pendant 15 minutes) ce qui permet de récupérer le Plasma Riche en Plaquettes (PRP) puis à grande vitesse afin d'isoler le culot concentré en plaquettes auquel est ajouté immédiatement de la prostacycline, inhibiteur momentané des plaquettes. L'ensemble est conservé dans un tampon physiologique contenant du magnésium, calcium, dextrose, ... appelé le complet. Le

pH est ajusté à 7,4 et la température maintenue à 37°C. La durée de vie des plaquettes est alors de 6 à 7 heures.

La concentration de la suspension de plaquettes est déterminée par le biais d'un compteur cellulaire, en utilisant une série de dilutions. Le nombre de plaquettes utilisées dans le cadre des essais est fixé à 250.10^6 plaquettes/ml de sang.

Les plaquettes sont alors maintenues au repos, dans un bain-marie pendant 1/2h jusqu'à élimination de toute trace de prostacycline. Ce sont des plaquettes fonctionnelles dites Washed Human Platelets.

I.1. 2.3. Evaluation de l'activation plaquettaire par microscopie confocale

La microscopie confocale permet d'évaluer la translocation de la PKC delta une fois phosphorylée vers les membranes des plaquettes qui sont alors activées.

Le protocole comporte plusieurs étapes :

- Stimulation des plaquettes par le collagène en présence de l'extrait éthanolique pendant 5 minutes à 37° ;
- Fixation pendant 30 minutes avec une solution de paraformaldéhyde à 2% (v/v) dépolymérisé dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) suivie par 2 lavages ;
- Immobilisation sur des coverslips recouverts de poly-Lysine pendant une nuit à 4°C.
- Perméabilisation des plaquettes adhérentes pendant 20 minutes avec 0,1 % de Triton X-100 contenant 2 % d'albumine de sérum bovin ;
- Incubation pendant 3 heures en présence de l'anticorps polyclonal anti-PKC δ anti-humain de lapin (Abcam) et l'anticorps monoclonal anti-humain anti-tubuline de souris (Santa Cruz Biotechnology) ;
- Lavage et marquage avec l'IgG anti-lapin (Alexa-555) et anticorps secondaires anti-souris IgG (Alexa-488) pendant 1h à température ambiante.

Enfin, les lamelles sont montées sur des lames microscopiques et des séries d'images confocales fluorescentes (Z-stacks) ont été acquises avec un microscope confocal LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

I.1.2.4. Détection de la phosphorylation de la PKC δ

La Western Blot (WB) est une technique qui permet la détection et l'identification de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines.

L'évaluation par Western Blot permet donc de mettre en évidence la phosphorylation de la PKC delta qui est une modification translationnelle et post traductionnelle. Elle est réalisée sur un lysat plaquettaire.

Le protocole adopté est mené tel que décrit par les travaux de Casenave et *al* (1983), Zaid et *al* (2020) et Limami et *al* (2021).

Les plaquettes sont d'abord stimulées par le collagène en présence d'extrait éthanolique ou du témoin pendant 5 minutes, en présence d'agitation contrôlée par des forces de cisaillement, simulant les conditions *in vivo*, à 37°C.

Les plaquettes lavées sont ensuite lysées dans un tampon SDS (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM Na₃VO₄ 5 mM, NaF 100 mM, TrisHCl 10 mM, Calpeptine 2 μ M, Phenantroline 300 nM, SDS-glycine 1% et cocktail d'inhibiteurs de protéases « complete » 1x). Les protéines sont titrées par la méthode BCA et dénaturées 5 minutes à 100°C en tampon Laemmli (Tris-HCl 65,8 mM, SDS 2,1%, glycérol 26,3%, bleu de bromophénol 0,01%) qui est un tampon de lyse. Les lysats plaquettaires sont alors chauffés pendant 5 minutes à 95°C.

Les protéines sont enfin placées dans des gels SDS-PAGE à 8 % puis transférées sur des membranes de nitrocellulose pour démarrer leur migration en fonction de leur taille et de leur charge, après une étape de blocage en PBS-Tween-lait (Tween 0,05%, lait 5%) pendant 1 heure.

Après 3 lavages successifs avec du TBS/Tween (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 7.4, 0.1% Tween-20), les protéines sont incubées pendant une nuit à 4°C avec des anticorps anti-phospho-PKC δ Tyr311 (Cell Signaling Technology).

Les trois lavages intermédiaires de 5 minutes sont réalisés en présence de PBS-Tween 0,05%. Les membranes sont ensuite incubées 1h sous agitation avec un anticorps secondaire fluorescent adapté couplé à la peroxydase du raifort, lavées comme indiqué précédemment puis incubées 2 minutes avec le réactif de révélation avant d'être exposées sur un film autoradiographique.

L'activité de la peroxydase liée est alors détectée par chimiluminescence améliorée (PerkinElmer Life Sciences). Les anticorps secondaires fluorescents utilisés sont les IgG Alexa induisant une fluorescence rouge qui révèle la présence de PKC δ et une fluorescence verte pour l' α tubuline localisées au niveau des membranes des plaquettes.

I.1.2.5. Test d'agrégation plaquettaire

L'agrégation des plaquettes est contrôlée sur un agrégomètre optique à huit canaux (SD Medical Innovation, Frouard, France) à 37 °C dans des conditions d'agitation contrôlée (Photo 10), (Zaid et *al*, 2021).

Les échantillons sont stimulés avec du collagène (Chrono-Log, USA) à des concentrations de 0,5 μ g/ml et 5 μ g/ml.



Photo 10 : Agrégomètre optique à 8 canaux (Hôpital Universitaire International Cheikh Zaid)

L'agrégation plaquettaire est ensuite surveillée et enregistrée jusqu'à stabilisation des traces puis la transmission de la lumière est mesurée au moment de l'agrégation maximale.

I.1.2.6. Essais de confirmation

Trois essais de contrôle ou témoins sont réalisés. Les plaquettes sont incubées en présence de:

- 137 mM de NaCl : Contrôle 1
- collagène à forte concentration (5µg/ml) : Contrôle 2
- tampon complet : Contrôle 3

I.1.2.7. Analyse spectrophotométrique des extraits

L'analyse est réalisée par spectrophotométrie, méthode qui consiste à mesurer l'absorbance, en solution afin de déterminer la concentration de l'espèce colorée. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière. Cette analyse permet de déterminer la teneur totale en composés phénoliques, ortho-diphénols, flavonoïdes et tannins.

I.1.2.8. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ET d'au moins 3 essais indépendants. Les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle, suivie d'un test de Dunnett pour la comparaison avec un seul groupe.

Toutes les données sont représentées sous forme de moyenne $\pm$ SD. L'analyse statistique est réalisée à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle avec test t de Dunnett pour comparaison avec un seul groupe : * $P < 0,05$ et **** $P < 0,0001$.

Les données avec $P \leq 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

I.2. Résultats et interprétation

La question de savoir si l'hyper-réactivité plaquettaire peut être inhibée ou au moins significativement diminuée après un traitement avec un extrait éthanolique de certaines plantes médicinales a été abordée dans notre étude. Il s'agit de *L. angustifolia*, *R. officinalis* et *C. longa* L., avec des rendements d'extraction respectivement de 34,6% ; 24,15% et 20,6%.

I.2.1. Quantification de l'agrégation plaquettaire maximale

- La figure 16 représente la quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités (ou non) avec l'extrait éthanolique de *Lavandula angustifolia* (n=10, points mauves), *Rosmarinus officinalis* (n=10, points rouges) et *Curcuma longa* (n=10, points verts) pendant 5 min à 37°C en réponse à une dose faible de collagène.

Les plaquettes isolées de donneurs sains (n = 10) et de patients atteints de COVID-19 sévère (n = 10) sont représentés par les points bleus.

La quantification des contrôles sains est représentée par une superposition grise.

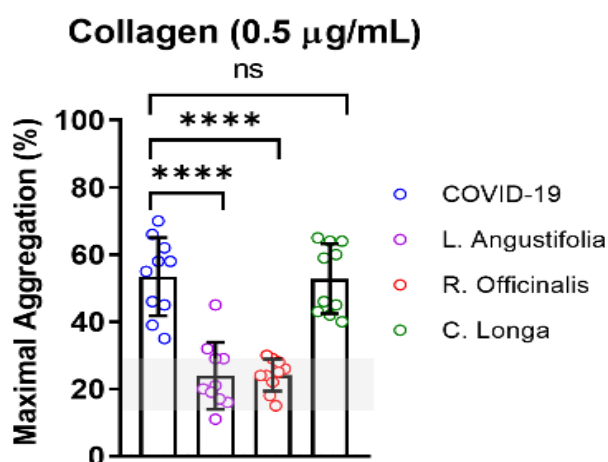


Figure 16 : Quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités (ou non) avec les extraits éthanoliques des plantes testées, en réponse à une dose faible de collagène

La figure 16 montre qu'à la concentration 0,5µg/ml, le pourcentage d'agrégation des plaquettes traitées avec *Lavandula angustifolia* et avec *Rosmarinus officinalis* chute de moitié par rapport aux plaquettes des patients COVID-19 montrant ainsi une différence significative et se retrouve ainsi dans la zone grise représentant le taux d'agrégation des plaquettes des donneurs sains.

L'extrait de *Curcuma longa* L. ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire. La différence avec les plaquettes COVID-19 n'est pas significative et le taux maximal d'agrégation est nettement supérieur à celui des donneurs sains.

Nos résultats confirment donc que les plaquettes des patients atteints de COVID-19 sont hyperactivées en réponse à une concentration sous-optimale de collagène (0,5 µg/ml) et que *Lavandula angustifolia* et *Rosmarinus officinalis* réduisent nettement l'hyperactivité et l'agrégation des plaquettes induites par la présence du virus de la COVID-19.

- La figure 17 regroupe les courbes de l'évaluation de l'agrégation des plaquettes des patients non traitées ainsi que celle des plaquettes traitées par les extraits de plantes testées, en réponse à une faible concentration de collagène : 0,5 µg/ml.

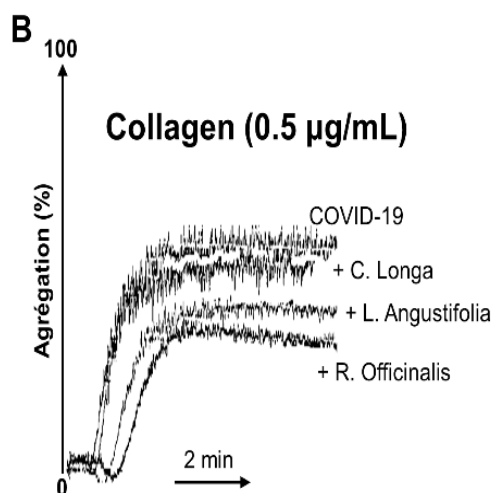


Figure 17 : Evaluation de l'agrégation des plaquettes des patients COVID-19 non traitées et celles traitées par les extraits de plantes

La figure 17 montre que les extraits de plantes ont diminué de manière significative le pourcentage d'agrégation des plaquettes par rapport aux plaquettes non traitées (trace « COVID-19 » sur le graphe) qui est de l'ordre de 70%. Concernant les traces des extraits de plantes, on note que l'extrait de *Rosmarinus officinalis* induit la diminution de l'hyperactivité la plus importante, suivi de l'extrait de *Lavandula angustifolia* puis celui de *Curcuma longa* L.

- La figure 18 représente la quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités ou non avec l'extrait éthanolique de *Lavandula angustifolia* (n=10, points mauves), *Rosmarinus officinalis* (n=10, points rouges) et *Curcuma longa* L. (n=10, points verts) pendant 5 min à 37°C en réponse à une dose élevée de collagène : 5µg/ml.

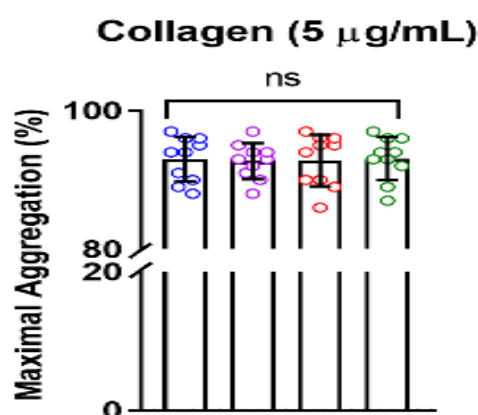


Figure 18 : Quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités (ou non) avec les extraits éthanoliques des plantes testées, en réponse à une dose élevée de collagène

L'inhibition ou du moins la diminution de l'agrégation disparaît à une concentration plus élevée de collagène : à la concentration 5µg/ml, les plaquettes traitées et non traitées présentent toutes un pourcentage d'agrégation élevé et similaire ne présentant pas de différence significative. Le collagène à forte dose stimule donc l'hyperactivation de toutes les plaquettes et leur agrégation. Il est donc plus judicieux d'utiliser une concentration suboptimale de collagène, soit la

concentration 0,5µg/ml qui permet donc de visualiser les différences de réponses des plaquettes traitées ou non par les extraits de plantes.

I.2.2. Translocation et phosphorylation de la PKCδ

L'activation plaquettaire dépend de voies de signalisation qui sont régulées essentiellement par plusieurs isoformes de la famille des PKC. L'isoforme PKCδ est l'un des membres les plus importants de cette famille puisqu'il s'agit d'un régulateur clé de l'adhésion, de l'activation, de la sécrétion et de l'agrégation plaquettaires (Murugappan, et *al*, 2004; Yacoub et *al*, 2006; Zaid et *al*, 2015 et 2016).

Chez les patients COVID-19, la PKCδ est transloquée vers la membrane et est phosphorylée sur le résidu Tyr311. L'effet du prétraitement des plaquettes avec les extraits éthanoliques des plantes testées est représenté dans les figures 19 et 20.

Nous avons ainsi étudié dans un premier temps, l'éventuelle translocation de la PKCδ (Figure 19) puis nous avons vérifié si la phosphorylation a bien eu lieu (figure 20).

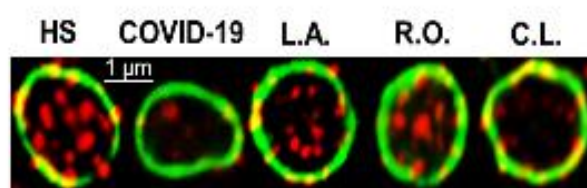


Figure 19 : Image par microscopie confocale de plaquettes de patients COVID-19, en réponse à une faible dose de collagène (Gr: 63x)

- L'image de la figure 19 met en évidence l'actine, protéine localisée au niveau des membranes en vert et la PKCδ, protéine isoforme, abondante dans le milieu intracellulaire des plaquettes en rouge. Sa présence permet de visualiser un éventuel changement de forme des plaquettes, caractéristique des plaquettes hyperactivées sous l'effet du COVID-19.

Cette image montre ainsi que les plaquettes traitées avec les trois extraits présentent une forme tout-à-fait comparable à celle du témoin (plaquettes de donneur sain, HS) alors que les

plaquettes des patients COVID-19 présentent une forme aplatie, caractéristique des plaquettes hyperactivées.

On note également que les points rouges révélant la présence de PKC δ dans les plaquettes traitées aux extraits de *Lavandula angustifolia* et *Rosmarinus officinalis* se trouvent majoritairement dans le milieu intracellulaire. Il n'y a donc pas eu de translocation de la PKC δ vers la membrane.

Concernant l'extrait de *Curcuma longa*, les plaquettes apparaissent doublement colorées pour PKC δ (rouge) et α -tubuline (vert) au niveau des membranes. Cet extrait n'a donc pas eu d'effet antiplaquettaire : il n'a pas inhibé la translocation de la PKC δ vers la membrane des plaquettes.

- La figure 20 montre les bandes révélées par la phosphorylation de PKC δ sur le résidu Tyr311 et la PKC δ totale des plaquettes de patients infectés par la COVID-19 et celles de donneurs sains. Ces bandes sont obtenues par Western Blotting qui permet de visualiser la migration des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Connaissant celui de la PKC δ qui est 76 Kd, nous pouvons comparer avec les bandes obtenues avec ou sans prétraitement avec les extraits de plantes.

La PKC δ totale a été évaluée dans chaque condition afin d'établir des ratios facilitant la comparaison. La figure montre d'ailleurs des bandes de PKC δ totale identiques dans tous les cas.

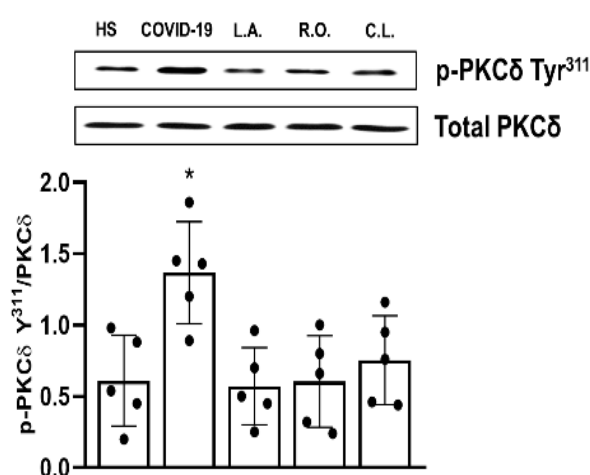


Figure 20 : Analyse des lysats plaquettaires par SDS-PAGE pour P-PKCdelta Tyr311 (Immunoblot supérieur, représentatif de 5 donneurs)

La figure 20 montre que la phosphorylation de PKC δ sur le résidu Tyr311 est augmentée significativement en réponse au collagène chez les patients atteints de COVID-19 sévère alors que le prétraitement des plaquettes avec des extraits éthanoliques de *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis* et *Curcuma longa* L. pendant 5 min à 37°C produit des bandes comparables à celle du donneur sain (HS).

I.2.3. Tests de confirmation : Effets du NaCl, du collagène à forte concentration et du tampon complet

Pour nous assurer que les résultats obtenus sont imputables aux extraits et non pas au NaCl, au tampon ou bien au collagène, nous avons testé l'effet de ces produits.

Les figures 18, 21 et 22 montrent l'activité des plaquettes incubées en présence de collagène à forte concentration (5 μ g/ml), de 137 mM de NaCl et de tampon complet, respectivement. Ils constituent donc les témoins.

- La figure 18 (présentée plus haut) qui représente la quantification de l'agrégation maximale des plaquettes de patients COVID-19 prétraités (ou non) avec les extraits éthanoliques des plantes testées, en réponse à une dose élevée de collagène (5 μ g/ml) montre bien qu'il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage d'agrégation maximale des plaquettes traités ou non par les extraits de plantes.

On peut donc en déduire que le collagène n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire. Il n'interfère donc pas non plus dans les essais menés.

- La figure 21 représente la quantification de l'agrégation des plaquettes incubées exclusivement dans le NaCl à la concentration 137 mM.

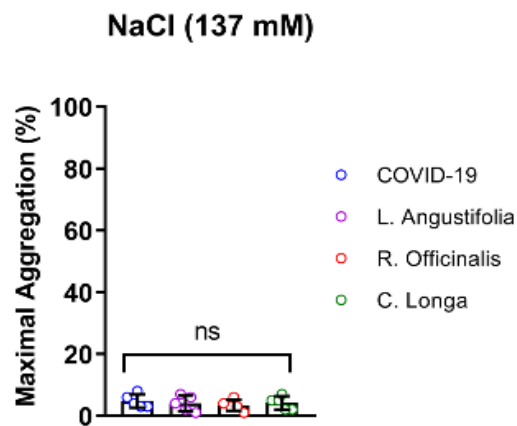


Figure 21 : Quantification de l'agrégation des plaquettes incubées dans NaCl (n=5)

La figure 21 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage d'agrégation maximale des plaquettes traitées par les extraits de plantes. Il n'y a pas non plus de différence significative du pourcentage entre les plaquettes traitées par les différents extraits de plantes. On peut déduire donc que NaCl n'interfère pas dans le mécanisme d'agrégation.

- La figure 22 représente la quantification de l'agrégation des plaquettes incubées exclusivement dans le tampon complet.

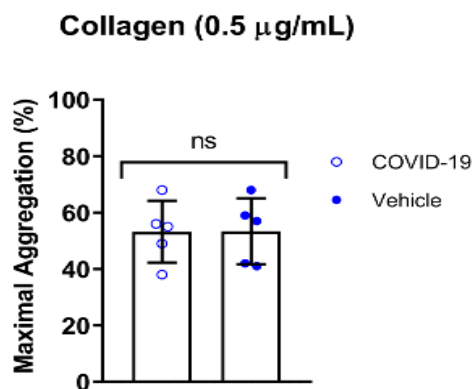


Figure 22 : Quantification de l'agrégation des plaquettes incubées dans le tampon complet (n=5)

Là aussi, aucune agrégation spontanée des plaquettes n'a été observée avec le complet. Il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage d'agrégation maximal des plaquettes de patients COVID-19 et des plaquettes incubées dans le tampon complet.

Les figures 18, 21 et 22 montrent bien que l'effet relevé est bien celui des extraits éthanoliques des plantes puisque le le collagène, le NaCl et le complet utilisés seuls n'entraînent aucune réaction.

I.2.4. Teneur en composés phénoliques

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique de ces extraits de plantes sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Composés phénoliques des extraits méthanoliques des plantes utilisées

Plante	Total des phénols (mg GAE g ⁻¹ DW)	Ortho-diphénols (mg GAE g ⁻¹ DW)	Flavonoides (mg CATE g ⁻¹ DW)	Tannins (mg ECE g ⁻¹ DW)
<i>R. officinalis</i>	48.48±0.13	133.88±1.78	49.14±0.83	18.10±0.77
<i>C. longa</i>	13.26±1.77	39.16±0.93	45.39±1.06	95.27±0.16
<i>L. angustifolia</i>	41.92±0.64	108.84±0.67	35.72±0.70	23.58±0.44

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SD (n = 3) pour chaque groupe. Les valeurs en gras représentent les valeurs les plus élevées pour chaque paramètre.

L'analyse spectrophotométrique montre que *R. officinalis* présente la teneur la plus élevée en phénols totaux alors que *C. longa* L. affiche la teneur la plus faible. On note également que ce sont les ortho-diphénols qui sont les plus représentés parmi les composés phénoliques chez *R. officinalis* ainsi que *L. angustifolia* alors que ce sont les tannins qui présentent une forte teneur chez *C. longa* L.

I.3. Discussion et conclusion

Plusieurs groupes d'étude (Zhang et *al*, Hottz et *al*, Zaid et *al* en 2020 ainsi que Limami et *al* (2021) ont rapporté une augmentation de l'activation plaquettaire, de l'agrégation et des agrégats plaquettes-leucocytes dans les prélèvements sanguins des patients contaminés par le virus de la COVID-19 par rapport à ceux des donneurs sains.

Rakiewicz et *al* (2020) ainsi que Pellegrini et *al* (2021) ont rapporté la présence de plaquettes dans les thrombus trouvés dans plusieurs organes de cas d'autopsie COVID-19.

Enfin, Koupenova et *al* (2021) ont rapporté la présence de virions du SRAS-CoV-2 dans les plaquettes de patients COVID-19.

Ces études montrent donc que la réactivité plaquettaire augmente pendant l'infection par le SRAS-CoV-2 et postulent que l'hyperréactivité plaquettaire peut être le principal moteur de la thrombose chez les patients atteints de COVID-19 sévère, contribuant à la défaillance d'organes et parfois même au décès.

Nos résultats montrent que les extraits de *Lavandula angustifolia* et *Rosmarinus officinalis* inhibent la translocation membranaire de PKC δ habituellement observée dans les plaquettes de patients COVID-19 en réponse à une faible dose de collagène. Ces extraits possèdent donc un effet antiplaquettaire. L'administration de ces extraits protégerait de l'hyperactivité des plaquettes et par conséquent éviterait leur agrégation et in fine la survenue de thromboses qui peuvent entraîner un risque d'infarctus du myocarde et un accident vasculaire cérébral ischémique tel que rapporté par Poissy et *al* ainsi que Lax et *al*, en 2021.

Les résultats obtenus montrent également que le prétraitement des plaquettes avec les extraits éthanoliques de *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis* et *Curcuma longa* L. empêche la phosphorylation de la PKC δ sur le résidu Tyr311. Ainsi, la PKC δ n'étant pas phosphorylée, les plaquettes ne sont pas hyperactivées, l'agrégation n'a pas lieu et le risque de thrombose diminue.

En conclusion, nos travaux ont démontré l'efficacité *in vitro* des extraits éthanoliques de *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis* et *Curcuma longa* dans l'inhibition de l'hyperréactivité plaquettaire lors d'une infection par le SARS-CoV-2.

Lavandula angustifolia et *Rosmarinus officinalis* ont également un effet anti-agrégant et inhibent la phosphorylation de la PKC δ . Le prétraitement par les extraits de ces plantes diminue fortement l'hyperactivation des plaquettes en inhibant la phosphorylation de la pKC δ et de ce fait empêche l'agrégation plaquettaire responsable des thromboses qui contribuent à la défaillance d'organes et parfois même au décès chez les patients atteints de COVID-19 sévère.

L'extrait de *Curcuma longa* L. n'affiche pas d'effet anti-agrégant important mais il est aussi efficace que les autres extraits concernant l'inhibition de la phosphorylation de la pKC δ et empêche ainsi l'activation des plaquettes.

Les extraits de plantes testées lors de cette étude, *R. officinalis*, *L. angustifolia*, et *C. longa* L. présentent donc une action positive sur la réduction de l'hyper-réactivité des plaquettes due à l'infection par le virus responsable de la COVID-19. Ils constituent donc une alternative anti-SRAS-CoV-2 intéressante.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de nombreuses équipes de recherche qui ont mis en évidence l'effet d'extraits de plantes sur la formation de thromboses due à d'autres pathologies telles que l'hypertension par exemple.

Leyen et al (2020) ont ainsi montré que les extraits du rhizome et de la partie aérienne de *Canna warszewiczii* (A. Dietr) réduisent l'agrégation plaquettaire en inhibant l'action de l'ADP et du collagène.

Irfan et al (2021) ont également montré l'effet antithrombotique des extraits fermentés de ginseng au niveau des poumons de rats en atténuant la sécrétion de la thromboxane, cytokinine qui joue un rôle majeur dans l'agrégation plaquettaire.

Frattani et al (2020) ont testé l'effet de l'extrait aqueux, obtenu par décoction, de *Petroselinum crispum* var. *neapolitanum* Danert administré par voie veineuse à des rats à la concentration de 25mg/kg cinq minutes avant l'induction d'une thrombose. Leurs résultats ont montré une réduction de 98,5% alors que l'administration par voie orale d'une dose de 125mg/kg entraîne une réduction de 76,5%.

Dans ce contexte, le large potentiel thérapeutique des composés naturels bioactifs, aux activités antiplaquettaires et anticoagulantes, extraits des plantes, devrait être élargi. Les plantes sont, en effet, riches en métabolites secondaires bioactifs, puissants antioxydants et composés anti-

inflammatoires, également capables d'inhiber l'activité de nombreuses enzymes, dont les sérine protéases plasmatiques, démontrant des effets anticoagulants et antiplaquettaires (Lamponi, 2021).

En effet, El Haouari et al (2016) ont suggéré que l'effet antiplaquettaire est attribué à la présence de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les coumarines, les terpénoïdes et d'autres substances qui corrigent les anomalies plaquettaires en interférant avec différentes voies de signalisation plaquettaire, y compris l'inhibition de la voie ADP, la suppression de la formation de TXA₂, la réduction des anomalies intracellulaires, la mobilisation du Ca²⁺ et la dégradation des phosphoinositides, entre autres.

Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* présente les taux les plus élevés en composés phénoliques alors que les travaux de Touati N. (2019) montrent dans les huiles essentielles alors que la teneur en polyphénols totaux de la lavande (89±7mg/g) est statistiquement plus élevée que celle du romarin (56.73±5.46mg/g). Ce qui montre que les techniques d'extraction révèlent des compositions différentes en substances actives.

Il est assez difficile d'attribuer l'effet antimicrobien d'un extrait à un ou à quelques principes actifs, les extraits contenant toujours un mélange de différents composés chimiques (Caillet et al, 2005 ; Caillet et al, 2006). En plus des principaux composants, des éléments mineurs peuvent apporter une contribution significative à l'activité antimicrobienne des extraits (Al Namer, 2014).

Il serait légitime de déduire, d'après nos résultats, que l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis*, de *Lavandula angustifolia* et de *Curcuma longa* L. résulte de la synergie de leurs composants.

Les composés naturels peuvent donc constituer des traitements alternatifs et/ou complémentaires importants pour le traitement des maladies de l'hémostase. Les plantes testées dans le cadre de ce travail, comme toutes les plantes, sont des réservoirs de molécules actives. Les extraits de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa* ayant clairement montré une activité antivirale vis-à-vis de la COVID-19 par inhibition de l'hyperactivation plaquettaire, il serait encore plus profitable de déterminer les molécules responsables de cet effet inhibiteur ce qui ouvrirait certainement la voie à l'élaboration de médicaments efficaces.

**Chapitre II : Evaluation de l'activité
anticandidosique des extraits de
l'écorce de *Quercus suber* L. sur 5
souches de *Candida albicans***

Introduction

Au cours de la dernière décennie, un grand intérêt a été réservé à l'étude des candidoses, tant de point de vue biologique, que de point de vue nosologique et thérapeutique. Cette importance donnée à l'étude des candidoses fait suite à l'apparition de la résistance de souches aux médicaments les plus communément utilisés et aux complications que ces germes produisent chez les patients à profil clinique particulier (Sellam et Whietway, 2016). Ainsi les candidoses autrefois qualifiées de banales, sont maintenant classées parmi les infections graves pouvant engendrer un taux élevé de mortalité et de morbidité chez les immunodéprimés et les diabétiques (Chin et al, 2020). La chimiothérapie antifongique a montré une grande efficacité contre les candidoses superficielles. Cependant, les atteintes profondes restent les plus difficiles à traiter compte tenu de la cytotoxicité des antifongiques systémiques.

On assiste ces dernières années à un regain d'intérêt pour les plantes médicinales et aromatiques et pour leurs extraits dans le domaine thérapeutique, face à la méfiance accrue suscitée par l'usage des produits chimiques (Senhaji, 2005).

L'utilisation des plantes ou de leurs extraits pourrait constituer une excellente alternative aux problèmes de résistance et de cytotoxicité des antifongiques. Aussi, dans le cadre de la recherche alternative aux médicaments anticandidosiques habituellement prescrits, notre contribution consiste à mettre en lumière l'activité antifongique de l'écorce de *Quercus suber* L. et de valoriser ainsi cette ressource végétale marocaine.

Pour cela, ce chapitre concerne l'évaluation de l'effet anticandidosique de trois extraits de l'écorce de *Q. suber* L. obtenus par décoction, macération et par la méthode de Soxhlet sur la croissance de cinq souches de *Candida albicans*.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel

➤ Matériel végétal

Des échantillons de l'écorce de la tige de *Quercus suber* L. ont été récoltés à la forêt de Mâamora, « canton A ». Après un tri minutieux, les échantillons sont séchés à 40°C pendant 48 heures, réduits en poudre et conservés à l'abri de l'humidité.

L'espèce a été botaniquement identifiée par Pr Halim Khamar (Département de Botanique et d'Ecologie Végétale, Institut Scientifique, Université Mohammed V), sous le numéro de voucher : RAB113640.

➤ Souches fongiques testées

Les cinq souches de *Candida albicans* étudiées sont affiliées aux Collections Coordonnées Marocaines de Micro-organismes (CCMM) de la mycothèque du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire (LMBM) du Centre National de la Recherche Scientifique et Technique (CNRST).

Ces souches proviennent de divers prélèvements (Tableau 6) :

Tableau 6 : Substrat d'origine des cinq souches de *C. albicans* étudiées

Référence	Substrat d'origine
L2 (IHEM 15824)	Ongle du doigt
L5 (IHEM 15827)	Ongle du doigt
L12 (IHEM 15834)	Cathéter ombilical
L13 (IHEM 15835)	Prélèvement buccal
L14 (IHEM 15836)	Ongle de l'orteil

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Méthodes d'extraction

La poudre d'écorce a été utilisée selon 3 extractions différentes :

➤ extrait aqueux (AE) obtenu par décoction : 5g de poudre végétale sont portés à ébullition dans un ballon pendant 20 min dans 500ml d'eau distillée puis filtrés sur papier Whatman.

➤ extrait obtenu par macération à froid dans le méthanol (MEM) : 200 g de poudre d'écorce sont mélangés à 500ml de méthanol. Le mélange est mis sous agitation pendant 24 heures. Après filtration sur papier Whatman, le marc est transféré dans 500ml du même solvant pendant 24 heures.

Après quatre macérations successives pendant 4 jours et après épuisement total, le macérât obtenu est filtré et évaporé sous vide à 67,7°C. L'extrait récupéré est conservé à 4°C.

➤ extrait obtenu par la méthode de Soxhlet (MES) : 100 g de poudre d'écorce sont soumis à l'extraction par le méthanol 99% au Soxhlet pendant 32 heures, temps nécessaire à l'épuisement total du matériel végétal, selon le protocole décrit par Owen et Johns (1999). L'extrait est ensuite filtré, concentré sous pression réduite au moyen d'un rotavapeur.

II.1.2.2. Calcul du rendement des extraits

Les extraits recueillis ont été pesés en vue d'en évaluer le rendement qui est calculé selon la formule suivante :

$$R = me / mi \times 100$$

R: rendement en extrait (%)

me : masse de l'extrait récupéré (en mg)

mi : masse initiale de la matière végétale sèche (en mg)

II.1.2.3. Dénombrement des colonies de *Candida albicans* par la méthode de dilution

Une gamme de dilutions successives, allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7} , a été réalisée avec du sérum physiologique.

A partir de chaque dilution, un volume de 1ml est prélevé puis ajouté par la technique de stries à la surface d'un milieu gélosé (Sabouraud Dextrose Agar) à raison de trois répétitions pour chaque dilution. Les cultures sont ensuite incubées à 30°C pendant 48h.

Le comptage est basé sur la notion de l'Unité Formant Colonie (UFC) selon la formule suivante:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times (n_1 + 0,1 n_2)} \times \frac{1}{d}$$

N = Nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial

Σ Colonies : Somme des colonies des boites interprétables

V : Volume de solution déposée (1ml)

n_1 : Nombre de boites retenues à la première dilution

n_2 : Nombre de boites retenues à la seconde dilution

d : Taux de dilution de la première dilution retenue

II.1.2.4. Tests anticandidosiques

➤ Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice

100 mg d'extrait sont dissouts dans 1ml d'eau distillée stérile pour les trois extraits méthanoliques.

Pour tester l'activité anticandidosique des différents extraits, nous avons utilisé la méthode de la microdilution en milieu liquide sur plaques stériles à fond plat (Bio-Rad) de 96 puits (Eloff, 1998).

La manipulation consiste à déposer 100 µl de milieu Sabouraud liquide dans chaque puits, puis 100 µl de solution de l'extrait. Ensuite, une série de dilutions successives avec un facteur de dilution de ½ a été établie afin d'obtenir des concentrations allant de 50 mg/ml à 3,12 mg/ml.

Cinq plaques ont été utilisées, chacune correspondant à une souche de levure.

Chaque puits a été ensuiteensemencé par 10µl de suspensions de levure préalablement préparées.

Les témoins ont été mis dans des puits isolés par ajout de 10µl des souches testées à 100µl du milieu adéquat sans extrait pour la préparation des témoins négatifs et, par ajout du milieu de culture seul, pour la préparation des témoins positifs.

Les microplaques sont scellées au parafilm, dans des conditions aseptiques puis incubées à 30°C pendant une durée de 48h.

La croissance des levures a été révélée par addition de 10 µl dans chaque puits du tétrazolium (TTC: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromide) préalablement préparé à la concentration 0,4 mg/ml. Il s'agit d'un indicateur redox qui permet de différencier des tissus vivants des tissus morts grâce à la réduction du TTC en 1,3,5-triphénylformazan qui est rouge, par les déshydrogénases présentes dans les tissus vivants.

Les microplaques sont ré-incubées à 30°C pendant 24h.

L'absence de la coloration dans les puits indique un effet inhibiteur de la croissance de la levure.

Les concentrations enregistrées correspondent aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) (Ryder et *al*, 1998).

➤ Tests fongicide/ fongistatique

La détermination du profil fongicide ou fongistatique nécessite l'ensemencement en stries de 100µl des contenus des puits ayant une concentration supérieure ou égale à la CMI transférés sur un milieu de culture Sabouraud.

L'incubation a eu lieu à 37°C pendant 24 heures.

L'effet fongistatique se traduit par une reprise de croissance tandis que l'effet fongicide indique une absence totale de croissance.

II.1.2.5. Sensibilité au Fungizone

L'activité inhibitrice du Fungizone, produit antifongique de synthèse de référence à la concentration de 1ug/ml sur la croissance de *Candida albicans* a également été testée.

Il s'agit de l'amphotéricine B, acide organique extrait de *Streptomyces nodosus*, habituellement prescrit dans le traitement des candidoses.

II.1.2.6. Analyses statistiques

Tous les tests ont été effectués en triple. Les valeurs de chaque expérience ont été exprimées en moyenne $\pm$ écart type (SD). Des comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle, suivie d'un test t de Dunnett pour la comparaison avec un seul groupe. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism (Version 8).

Les différences (entre les groupes) ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$.

II.2. Résultats et discussion

II.2.1. Rendement des extraits

Les extraits de *Quercus suber* L. ont été obtenus en utilisant soit l'eau (par décoction, extrait AE), soit le méthanol comme solvant (par macération : extrait MEA) et par la méthode de Soxhlet (extrait MES).

Les résultats du calcul du rendement des extraits selon les différentes techniques d'extraction utilisées sont présentés dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Rendement des extraits de l'écorce de *Q. suber* L. des trois méthodes d'extraction (%)

	Décoction (extrait AE)	Macération (extrait MEA)	Soxhlet (extrait MES)
Poids de la matière végétale en(g)	5	200	100
Masse de l'extrait pur en (g)	0,96	32	17,5
Rendement en extrait (%)	19,2	16	17,5

Les analyses statistiques ont été réalisées en exploitant un logiciel STATISTICA où le test de Duncan est utilisé au seuil de $p < 0,05$

Pour 5g d'écorce de *Q. suber* traités par décoction, le rendement de l'extrait est de 19,2%.

Pour 200 g de matière végétale macérée dans le méthanol, l'écorce de *Quercus suber* a donné un rendement en extrait de 16%.

Pour l'échantillon de 100g de la poudre de l'écorce de *Quercus suber* soumis à l'extraction au Soxhlet, le résultat montre un rendement de 17,5%.

Comme résumé dans le tableau 7, l'extrait aqueux (AE) a montré le rendement d'extraction le plus élevé (19,2 %) par rapport aux extraits méthanoliques. Une différence non significative a été enregistrée entre les deux extraits méthanoliques en termes de rendement d'extraction. En effet, nous avons constaté qu'en faisant macérer 200g de matière végétale dans du méthanol, le rendement en extrait est de 16% alors qu'avec la moitié de la quantité d'écorce, le rendement du Soxhlet a atteint 17,5%. Cette différence, principalement liée à la méthode d'extraction, a révélé une meilleure productivité du Soxhlet par rapport à la macération, qui a permis l'épuisement total de la matière végétale en seulement quelques cycles avec un gain de temps appréciable.

Les deux extractions méthanoliques obtenues par macération et Soxhlet ont montré un pourcentage de rendement d'extraction de l'ordre de 16% et 17,6% respectivement, la différence n'étant pas significative.

Concernant l'extraction par macération, la bibliographie ne fournit aucune donnée. Ainsi, à notre connaissance, cette technique est utilisée pour la première fois dans l'étude des extraits de l'écorce de *Quercus suber*. Le rendement obtenu est presque similaire à celui obtenu par Soxhlet mais il s'avère que c'est une technique qui nécessite plus de temps, plus de matière végétale et de solvant.

Les recherches actuelles se focalisent sur l'optimisation des techniques d'extraction permettant d'obtenir des extraits de bonne qualité et dans des délais courts. De ce fait, la technique d'extraction au Soxhlet est donc plus efficace par rapport à la technique de macération.

Le dénombrement des colonies a été effectué pour déterminer la concentration de levure présente dans la préparation initiale. A cet effet, le nombre d'unités formant colonies (UFC) a été déterminé par la méthode de dilution. Les résultats du dénombrement des souches de *C. albicans* sont présentés dans la figure 23.

II.2.2. Détermination du nombre d'unités formant colonie (UFC) des souches fongiques

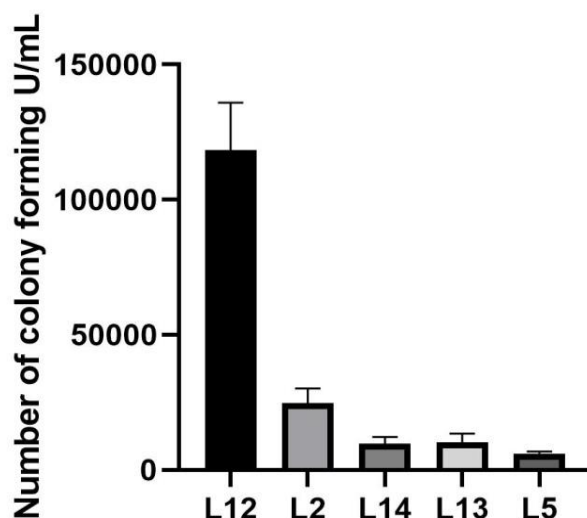


Figure 23 : Unités formant des colonies des souches de *C. albicans* isolées à partir d'ongles de doigts (L2 et L5), d'un prélèvement buccal (L13), d'un cathéter ombilical (L12) et d'un ongle d'orteil (L14).

Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD avec trois répétitions.

La détermination des UFC a révélé une grande variation entre les différentes souches. Ainsi, on note que les souches L12 (prélevée à partir d'un cathéter ombilical) et L2 (ongle du doigt) affichent le plus grand nombre d'UFC : 11.10^7 et 14.10^6 UFC/ml respectivement, suivies des souches L14 (ongle de l'orteil) et L13 (prélèvement buccal): 17.10^5 et 16.10^5 UFC/ml respectivement, puis de la souche L5 (ongle du doigt) qui a manifesté le plus faible nombre de d'UFC : 8.10^4 UFC/ml. Ces résultats révèlent une grande variation du nombre d'unités formant colonies (UFC) par millilitre d'eau physiologique, selon les souches testées.

Étant donné que les cinq souches testées appartiennent à la même espèce, *Candida albicans* et ont été cultivées dans les mêmes conditions de culture, la grande différence des valeurs de CFU peut être attribuée à la différence de substrat d'origine de chaque souche, puisqu'elles proviennent de différents prélèvements.

On peut donc affirmer que le nombre d'UFC varie en fonction des souches étudiées et plus précisément en fonction de leur substrat d'origine.

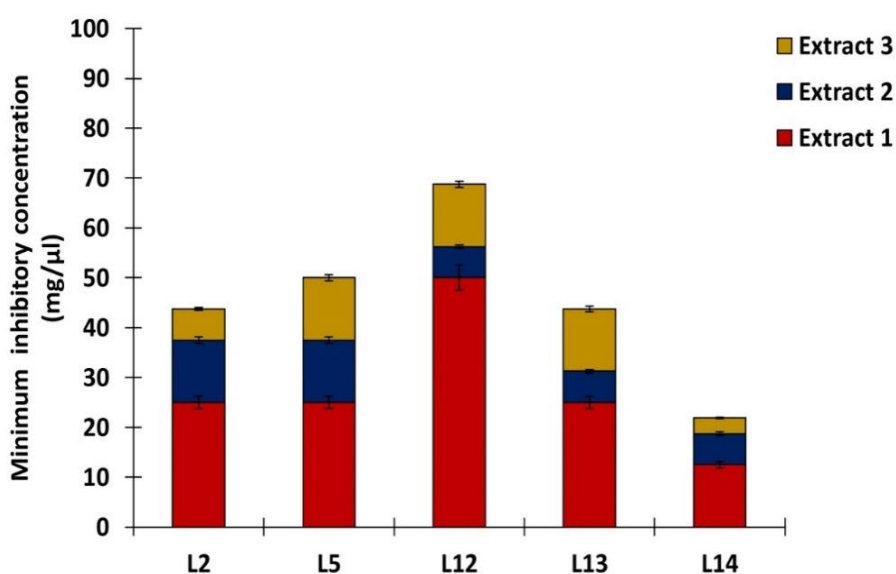


Figure 24 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de *Q. suber* L. testés sur cinq souches de *C. albicans* (L2: souche prélevée sur l'ongle; L13: souche du prélèvement buccal; L2 et L5: souches d'ongles de doigts; L12: souche du cathéter ombilical)

Les valeurs sont la moyenne $\pm$ SD de trois répétitions biologiques.

II.2.3. Détermination de l'activité antifongique des extraits de *Quercus suber* L. sur la croissance de *Candida albicans*

L'activité antimycosique des extraits de la poudre de l'écorce de *Q. suber* L., issues des différentes techniques d'extraction et à différentes concentrations, a été estimée par l'absence ou la présence de coloration au niveau des puits (figure 24).

Les résultats montrent que toutes les souches testées sont sensibles aux trois extraits mais à des degrés variables. Des différences d'efficacité sont également notées en fonction du mode d'extraction et des dilutions utilisés.

Ainsi, selon le mode d'extraction, la décoction a permis de montrer que la souche L14, isolée à partir du prélèvement de l'ongle de l'orteil s'est avérée plus sensible que les autres souches avec une concentration minimale d'inhibition (CMI) à 12,5mg/ml alors que L2 (cathéter ombilical), L5 (ongle du doigt) et L13 (prélèvement buccal) affichent une CMI à 25 mg/ml et L12 (ongle de l'orteil) à 50mg/ml.

Concernant la macération, les souches L2 et L5 responsables des infections des ongles de doigts ont manifesté le même degré de sensibilité et présentent une CMI à 12,5mg/ml alors que L12 (cathéter ombilical), L13 (prélèvement buccal) et L14 (ongle de l'orteil) affichent une CMI à 6,25mg/ml.

L'utilisation de l'extrait obtenu par la technique de Soxhlet a donné les résultats suivants : la souche L14 (ongle de l'orteil) présente une CMI à 3,12 mg/ml, L2 (cathéter ombilical) à 6,25 mg/ml et les trois souches restantes, soit L5, L12 (ongles des doigts) et L13 (prélèvement buccal) affichent une CMI à 12,5 mg/ml.

En regard de ces résultats, on peut affirmer que l'extraction par la méthode de Soxhlet permet d'obtenir les concentrations minimales d'inhibition aux dilutions les plus basses des extraits, particulièrement dans le cas de la souche L14, provenant de l'ongle de l'orteil avec une valeur de 3,12 mg/ml.

Par ailleurs, l'absence de coloration aux premières dilutions pour les 5 souches, dans tous les tests effectués révèle qu'aucune souche n'a pu se développer aux concentrations les plus élevées (50 et 25mg/ml) pour les deux extraits méthanoliques (macération et Soxhlet).

Ainsi, pour l'extrait obtenu par macération, la CIM est à 12,5 mg/ml pour les souches L2 et L5 (ongles de doigts). La CIM est à 6,25 mg/ml pour L12 (cathéter ombilical), L13 (prélèvement buccal) et L14 (ongle de l'orteil).

Avec l'extrait obtenu par la méthode de Soxhlet, les souches L5 (ongle de doigt), L12 (cathéter ombilical) et L13 (prélèvement buccal) affichent une CMI à 12,5 mg/ml, la souche L2 (ongle du doigt) à 6,25 et la souche L14 (ongle de l'orteil) à 3,12mg/ml.

On note qu'à la concentration 3,12 mg/ml, tous les extraits testés se sont montrés inactifs sur toutes les souches étudiées sauf pour l'extrait par Soxhlet qui s'avère efficace à la dilution 3,12 mg/ml sur la souche L14 (ongle de l'orteil).

Ces différences d'efficacité ont également été notées en fonction des souches étudiées. Ainsi, les souches L2 et L5, prélevées à partir d'ongles de doigts, affichent un comportement similaire face au mode d'extraction et aux dilutions, à une exception près : avec l'extrait aqueux, la CMI pour les deux souches est à 25 mg/ml, Avec l'extrait obtenu par macération, la CMI est à 12,5 pour les deux souches également et avec l'extrait par Soxhlet, la L5 montre une CMI à 12,5 mg/ml et la L2 une CMI à 6,25mg/ml.

Ces deux souches sont donc particulièrement sensibles aux extraits obtenus par Soxhlet.

La souche L12 (cathéter ombilical) affiche une CMI à 6,25 mg/ml avec l'extrait obtenu par macération, à 12,5mg/ml avec le Soxhlet et 50mg/ml avec l'extrait aqueux.

La souche L13 (prélèvement buccal) affiche une CMI à 6,25 mg/ml avec l'extrait obtenu par macération, à 12,5 mg/ml avec le Soxhlet et 25 mg/ml avec l'extrait aqueux.

C'est donc l'extrait obtenu par macération qui est le plus efficace pour les souches L12 et L13.

La souche L14 (ongle de l'orteil) affiche une CMI à 3,12 mg/ml avec le Soxhlet, à 6,25 mg/ml avec l'extrait obtenu par macération et 12, 5 mg/ml avec l'extrait aqueux.

Cette souche montre donc une sensibilité élevée à l'extrait obtenu avec le Soxhlet avec une CMI à la dilution la plus basse utilisée.

II.2.4. Résistance des souches de *C. albicans* étudiées au Fungizone

Le tableau 8 regroupe l'effet du Fungizone sur la croissance des 5 souches de *C. albicans* étudiées.

Tableau 8 : Effet fongicide du Fungizone sur la croissance des souches de *C. albicans*

	L2	L5	L12	L13	L14
Fungizone (1µg/ml)	-	-	-	+	-

L2 et L5: souches prélevées sur des ongles de doigts ; L13 :prélèvement buccal ; L12: cathéter ombilical ; L14: ongle d'orteil. (+) Culture positive ; (-) culture négative.

Les résultats montrent que le Fungizone, produit de synthèse de référence, est inefficace contre la croissance de la souche L13, provenant d'un prélèvement buccal, confirmant ainsi sa résistance vis-à-vis de ce produit.

II.2.5. Profils Fongicide/Fongistatique

Les résultats des tests Fongicide/Fongistatique (Fc/Fs) sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Effet fongicide (MFC) et fongistatique (CFS) des extraits d'écorce de *Q. suber* sur les 5 souches de *C. albicans*

		L2		L5		L12		L13		L14	
		MFC	CFS	MFC	CFS	MFC	CFS	MFC	CFS	MFC	CFS
Extrait AE (décoction)		-	25	-	25	-	50	-	25	-	12.5
Extrait MEM (macération)		-	12.5	-	12.5	50	6.25	-	6.25	-	3.12
Extrait (Soxhlet)	MES	6.25	-	12.5	-	12.5	-	12.5	-	6.25	3.12

L2 et L5: souches prélevées sur des ongles de doigts; L13: prélèvement buccal; L12: cathéter ombilical; L14: ongle d'orteil.

MFC : Concentration fongicide minimum ; CFS : Concentration fongistatique minimum

Les résultats révèlent des différences en fonctions des souches et du mode d'extraction. Ainsi, concernant l'extrait aqueux (AE), la souche L12 (cathéter ombilical) présente une concentration fongistatique minimum (CFS) égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI) : 50 mg/ml. Les souches L2 et L5 (ongle du doigt) ainsi que la souche L13 (prélèvement buccal) affichent la même CFS qui coïncide avec la CMI : 25 mg/ml. Et pour la souche L14 (ongle d'orteil), la CFS et la CMI sont de 12,5 mg/ml.

Avec l'extrait obtenu par macération (MEM), les souches L2 et L5 (ongle du doigt) affichent une CFS et une CMI d'une valeur de 12,5 mg/ml. Pour les souches L12 (cathéter ombilical) et L13 (prélèvement buccal), les CFS et CMI sont égales à 6,25 mg/ml.

La souche L12 est la seule à afficher une concentration fongicide minimale de 50 mg/ml.

Concernant la souche L14 (ongle d'orteil), la CFS est à 3,12 mg/ml alors que la CMI est de 6,25 mg/ml.

L'utilisation de l'extrait obtenu par la méthode de Soxhlet montre les résultats suivants :

les souches L12 (cathéter ombilical) et L13 (prélèvement buccal) présentent la même valeur aussi bien pour la concentration fongicide minimale (MFC) que pour la concentration minimale inhibitrice (CMI) : 12,5 mg/ml.

Pour les souches L2 et L5 (ongle du doigt) les CFS sont égales aux CMI, respectivement 6,25 mg/ml et 12,5 mg/ml. Et la souche L14 affiche une CFS égale à la CMI, soit 3,12 mg/ml et une MFC à 6,25 mg/ml.

La détermination du profil fongicide/fongistatique pour les concentrations supérieures ou égales à la CMI a donc révélé que l'extrait de Soxhlet a un effet fongicide sur toutes les souches à des concentrations variables, et un effet fongistatique sur la souche L14 à la dose 3,12 mg/ml.

L'extrait issu de la macération a montré une activité fongistatique sur toutes les souches et fongicide sur la souche L12 à la concentration 50 mg/ml.

Pour l'extrait de la décoction, les cinq souches présentent des concentrations minimales fongistatiques qui coïncident avec les concentrations minimales inhibitrices.

II.3. Discussion et conclusion

De nos jours, la lutte contre les infections qu'elles soient virales, bactériennes ou fongiques se base exclusivement sur les prescriptions de médicaments. Ces derniers sont considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves, notamment les infections multi résistantes, comme c'est le cas de celles provoquées par *Candida albicans* (Chebaibi et al, 2015). De plus, les effets secondaires induits par ces médicaments inquiètent de plus en plus les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. Pour ces raisons, les traitements à base de plantes apparaissent aujourd'hui comme une alternative de choix à la chimiothérapie antifongique communément utilisée.

Dans ce sens et au regard des résultats obtenus, ce travail a permis de mettre en évidence l'existence d'une activité anticandidosique des extraits de l'écorce de *Quercus suber* L., corroborant ainsi plusieurs travaux qui ont montré l'efficacité de produits naturels (huiles essentielles, extraits méthanoliques, éthanoliques, ...) de plusieurs plantes sur les souches fongiques et particulièrement *Candida* spp.

Cependant, nos résultats montrent que l'activité antifongique de l'écorce de *Q. suber* varie selon la technique d'extraction et le solvant utilisés.

Trois techniques d'extraction ont été utilisées. Il est donc nécessaire, en premier lieu, d'évaluer le rendement de ces techniques et donc de prévoir la quantité de matériel végétal à prélever et d'estimer la productivité des extraits totaux. Cela permet une utilisation rationnelle de la ressource naturelle, respectueuse de l'environnement et donc durable pour les espèces visées (Mirzaei et al, 2013).

Le calcul du rendement a révélé que l'extrait aqueux obtenu par décoction présente une valeur supérieure par rapport aux extraits méthanoliques. Une découverte similaire a été rapportée par Dhanani et al (2017). Ces résultats peuvent être attribués aux paramètres de polarité et de température de l'eau (Khan et al, 2019). Vergara-Salinas et al (2012) ont montré que l'augmentation de la température du solvant améliore le mouillage des particules végétales en diminuant la tension superficielle, ce qui se traduit finalement par un rendement d'extraction plus élevé.

Les deux extractions méthanoliques obtenues par macération et Soxhlet ont montré un pourcentage de rendement d'extraction de l'ordre de 16% et 17,6% respectivement.

Dans la littérature, les travaux réalisés sur la poudre de l'écorce de *Quercus suber* L. ont été réalisés uniquement par la technique d'extraction au Soxhlet. Dans notre étude, le rendement obtenu par cette technique est de l'ordre de 17,5 % en comparaison à 7% avancé par Castola et al (2003) lors de travaux effectués sur la même espèce végétale et selon le même procédé d'extraction.

Concernant l'extraction par macération, la bibliographie ne fournit aucune donnée. Ainsi, à notre connaissance, cette technique est utilisée pour la première fois dans l'étude des extraits de l'écorce de *Quercus suber*. Le rendement obtenu est presque similaire à celui obtenu par Soxhlet mais il s'avère que c'est une technique qui nécessite plus de temps, plus de matière végétale et de solvant.

Les recherches actuelles se focalisent sur l'optimisation des techniques d'extraction permettant d'obtenir des extraits de bonne qualité et dans des délais courts. De ce fait, la technique d'extraction au Soxhlet est donc plus efficace par rapport à la technique de macération.

L'activité antifongique des extraits enregistrée sur les cinq souches de *Candida albicans* étudiées est variable en fonction de la souche testée, d'une part, de la technique d'extraction utilisée et de la concentration de l'extrait, selon une relation dose-réponse, d'autre part.

En effet, toutes les souches se sont avérées sensibles aux différents traitements et les plus sensibles dans chaque cas ne sont pas forcément celles ayant présentées le nombre d'unités formant colonies (UFC) le plus faible. Ainsi, l'extrait aqueux de *Q. suber* s'avère efficace sur la souche prélevée de l'ongle de l'orteil avec une concentration d'inhibition minimale à 12,5mg/ml alors que les extraits aqueux de plantes connues pour leur activité antifongique se révèlent inefficaces contre *Candida albicans* telles que *Harrisonia abyssinica* (Bene et al,2015) ou la cannelle (Veilleux, 2019).

Concernant les extraits méthanoliques obtenus par macération et Soxhlet, ils ont montré un effet inhibiteur appréciable contre les souches de *Candida albicans*.

Ainsi, le traitement par macération montre que les souches L2 et L5 responsables des infections des ongles de doigts ont manifesté le même degré de sensibilité et présentent une CMI à 12,5mg/ml alors que L12 (cathéter ombilical), L13 (prélèvement buccal) et L14 (ongle de l'orteil) affichent une CMI à 6,25mg/ml.

Le traitement par Soxhlet, lui, montre que les souches L5, L12 (ongles des doigts) et L13 (prélèvement buccal) affichent une CMI à 12,5 mg/ml, L2 (cathéter ombilical) à 6,25mg/ml et enfin la souche L14 (ongle de l'orteil) à 3,12 mg/ml.

Ces résultats concordent avec ceux d'études antérieures qui ont souligné une activité antimicrobienne élevée de *Q. suber*, notamment contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Sarwar, 2015).

D'autres espèces et d'autres parties des plantes du genre *Quercus* ont également fait l'objet de plusieurs études sur l'activité anticandidosique notamment sur *C. albicans*. Ainsi, les travaux de Didem et al (2017) ont montré que les extraits méthanoliques des feuilles de *Q. suber*, *Q. cerris*, *Q. pubescens* et *Q. coccifera*, ont une activité antifongique élevée sur trois espèces de *Candida* testées : *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*.

De même, Güllüce et al (2004) ont rapporté une activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de feuilles de *Quercus ilex* L. contre *Candida albicans* puisque la CMI (125 µg/ml) était inférieure à la CMI du médicament conventionnel (500 µg /ml).

Anibal et al (2013) ont aussi rapporté que les extraits méthanoliques de graines de *Punica granatum* L. étaient actifs sur les espèces de *Candida*.

Aouadhi et al, en 2013, ont également relevé une activité antimicrobienne importante d'extraits méthanoliques de *Marrubium vulgare* et *Teucrium polium* vis-à-vis de *Candida albicans* avec des valeurs de CMI de 3,25mg/ml et 12,5mg/ml respectivement.

L'effet antifongique des extraits méthanoliques d'autres espèces sur *Candida albicans* tels que l'extrait d'*Artemisia mesatlantica* ont été relevés par Hassikou et al en 2014.

Akroum, en 2017, a montré également que l'extrait acétonique de la poudre d'écorce de *Quercus suber* a également un effet actif *in vitro* et *in vivo* sur *Candida albicans*.

D'autre part et contrairement aux extraits testés, le produit chimique de synthèse testé, le Fungizone s'est montré inefficace sur la souche de *Candida* qui cause une infection au niveau des ongles d'orteils. Ceci pourrait être attribué à une résistance acquise par les patients porteurs de ce genre d'infections. Cette résistance a été également rapportée par Didem et al (2007) pour trois espèces de *Candida* testées : *C. albicans*, *C. krusei*, et *C. glabrata*.

Pour apprécier l'activité antimycosique des extraits de *Quercus suber*, la concentration fongicide minimale est l'un des paramètres microbiologiques utilisés in vitro pour déterminer l'activité fongicide des agents antimicrobiens. Nos résultats montrent que le profil fongicide des trois extraits est variable selon la méthode d'extraction. Le meilleur effet fongicide contre les cinq souches de *Candida* a été enregistré avec l'extrait méthanolique obtenu par Soxhlet. Cet extrait a également montré un effet fongistatique sur L14, souche prélevée au niveau du cathéter ombilical égale à la concentration minimale d'inhibition, soit 3,12 mg/ml d'extrait.

L'extrait méthanolique obtenu par macération a montré un effet fongistatique sur les cinq souches testées et une activité fongicide contre la souche L12, souche prélevée sur l'ongle de l'orteil à 50 mg/ml.

L'effet fongistatique de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique obtenu par macération a démontré une action temporaire de ces extraits sur le développement des pathogènes sans les éliminer complètement. Ces différences de profil fongicide entre les 3 différents extraits peuvent être dues à une différence de concentration des principes actifs des extraits (terpénoïdes, phénols, polyphénols, quinones, ...) (Bene et al, 2015).

Ce travail contribue donc à la valorisation des usages traditionnels exploités comme approche rapide et efficiente pour découvrir de nouvelles propriétés médicinales des extraits de la poudre d'écorce de *Quercus suber* obtenus par différents modes d'extraction.

Ce procédé peut donc être proposé comme une solution alternative aux produits pharmaceutiques de synthèse indiqués actuellement contre les infections fongiques causées par *Candida albicans* et pourrait être étendu à l'échelle industrielle.

Enfin, des analyses plus approfondies devraient être menées pour identifier les composés biologiquement actifs présents dans les extraits méthanoliques de l'écorce de *Q. suber* responsables de l'activité anticandidosique qui a été démontrée dans ce travail.

**Chapitre III : Evaluation de la
toxicité aigüe de *Rosmarinus
officinalis*, *Lavandula angustifolia*,
Curcuma longa L. et *Quercus suber* L.**

Introduction

L'étude des activités thérapeutiques des plantes a pour objectif principal de mettre au point des traitements naturels sans effets secondaires. Pour atteindre ce but, les chercheurs et scientifiques s'évertuent à identifier les composés actifs des plantes, à déterminer les doses efficaces contre l'agent d'infection mais ne présentant aucun risque pour le patient. Le phytomédicament bénéficie alors d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) qui garantit au consommateur efficacité et innocuité (Rubon, 2005).

Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. En effet, il n'est pas envisageable d'administrer un nouveau composé à l'homme sain ou malade compte tenu des risques non connus susceptibles d'apparaître. L'expérimentation animale est donc utilisée de manière rationnelle et, dans tous les cas, selon des bonnes pratiques qui garantissent un traitement éthique de l'animal de laboratoire (Cash, 2022).

Les essais de toxicité à des fins d'évaluation ont pour objectifs de déterminer les possibles effets indésirables et d'obtenir des informations pour définir le rapport exposition-réponse.

Dans le cas de toxicité aiguë, quand on recherche la DL_{50} par exemple, les animaux sont exposés à une forte dose unique. Ces essais fournissent des informations en cas d'exposition accidentelles mais également des indices sur les mécanismes qui se déclenchent et l'effet sur les organes affectés (Frazier, pour l'OCDE, 1999).

C'est dans cette perspective que ce chapitre traite la toxicité aiguë des extraits des 4 plantes testées dans le cadre de ce travail.

III.1. Matériel et méthodes

III.1.1. Matériel

III.1.1.1. Matériel végétal

Des échantillons de l'écorce de la tige de *Quercus suber* L. ont été récoltés à la forêt de Mâamora, « canton A ». Après un tri minutieux, les échantillons sont séchés à 40°C pendant 48 heures, réduits en poudre et conservés à l'abri de l'humidité.

Les espèces *Rosmarinus officinalis* et *lavandula angustifolia* ont été récoltées au sein du jardin de l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques à Taounate en Mars 2021. L'espèce *Curcuma longa* a été acquise du commerce sous forme de racines en poudre issues de l'agriculture biologique.

Les espèces testées ont été botaniquement authentifiées par le Pr Halim Khamar (Département de Botanique et d'Ecologie Végétale, Institut Scientifique, Université Mohammed V, Rabat, Maroc)

Les numéros des vouchers des plantes sont les suivants :

RAB113640 : *Quercus suber* L.

RAB112425: *Rosmarinus Officinalis* L.

RAB112424: *Lavandula Angustifolia*

RAB112426: *Curcuma Longa*

III.1.1.2. Matériel animal

L'étude de la toxicité aiguë a été réalisée sur des souris blanches du type Balb/c provenant de l'animalerie du Laboratoire de la Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de Rabat (Photos 11 et 12).



Photo 11 et Photo 12 : Souris de l'animalerie de la FSR

Les animaux sont hébergés dans des conditions ambiantes de température, d'humidité et de lumière et sont nourris avec des préparations classiques pour rongeurs de laboratoire et disposent d'eau à volonté.

III.1.2. Méthodes

III.1.2.1. Extraction par Soxhlet

Les parties aériennes de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et l'écorce de *Q. suber* sont séchées à 40°C à l'étuve pendant 48 heures, broyées à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisées avec une maille de 300 microns de taille d'ouverture. Les poudres obtenues sont stockées dans des sachets alimentaires à température ambiante dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité.

L'extraction des parties aériennes de *R. officinalis* et *L. angustifolia* a été réalisée par la méthode de Soxhlet : 20g de poudre de matériel végétal sont déposés dans la cartouche en cellulose et 750 ml d'éthanol à 85°C dans le ballon.

Concernant l'écorce de *Q. suber*, 100 g de poudre d'écorce sont soumis à l'extraction par le méthanol 99% au Soxhlet pendant 32 heures (Photo 11), temps nécessaire à l'épuisement total du matériel végétal, selon le protocole décrit par Owen et Johns (1999).

Les extraits sont ensuite filtrés, concentrés sous pression réduite au moyen d'un rotavapeur (Photo 12).

La poudre de *Curcuma longa* a été soumise à la même technique d'extraction que l'écorce de *Quercus suber*.

Après épuisement total du matériel végétal, les extraits sont passés au rotavapeur jusqu'à élimination totale du solvant (Photo 12).

Les extraits secs récupérés sont placés dans des tubes en verre et stockés à -4°C.

III.1.2.2. Test de la toxicité aiguë des extraits testés

Les essais de toxicité accompagnent les essais d'activités biologiques au cours de la sélection de nouvelles molécules ou bien de l'évaluation d'extraits de plantes. La toxicité est appréciée par la détermination de la DL₅₀ (Dose Létale 50) (Wepierre, 1981).

Le protocole suivi est conforme à la ligne directrice de l'Organisation for Economic Coopération and Development (OCDE) pour les essais de produits chimiques adoptée en juin 2018.

- Dans le cas de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Q. suber*, les souris sont mises à jeun de nourriture pendant 3 à 4 heures et ont été réparties en 4 lots à raison de quatre souris mâles par lot. Les souris ont un poids moyen de 20g.

- Lot 1 : Chaque souris servant de contrôle reçoit un volume de 20 ml/kg de sérum physiologique NaCl 0,9% par voie intrapéritonéale (IP).

- Lot 2 : Chaque souris reçoit une dose de 300mg/kg de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Quercus suber* dans un volume de 20 ml/kg en IP;

- Lot 3 : Chaque souris reçoit, en dose de confirmation, 300mg/kg de l'extrait de *Quercus suber* dans un volume de 20 ml/kg en IP;

- Lot 4 : Chaque souris reçoit une dose de 2000mg/kg de l'extrait de *Quercus suber* dans un volume de 20 ml/kg en IP.

Chaque animal est marqué, pesé puis l'extrait lui est administré par voie orale à l'aide d'une sonde d'alimentation gastrique. Au cours de cette période, pour chaque groupe, un certain nombre de paramètres ont été observés, notamment le poids corporel, les signes de toxicité et le nombre de décès.

Après administration de l'extrait, les animaux traités sont soumis à une observation continue toutes les 30 minutes durant les premières 24 heures. Ensuite, ils sont gardés en observation

pendant 15 jours, au cours desquels sont notées les variations de poids corporel, les signes de toxicité et le nombre de décès.

- Concernant les extraits méthanoliques au Soxhlet de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa*, des souris albinos de souche BALB/c âgées d'un mois, provenant de l'animalerie de la Faculté des Sciences de Rabat, de poids variant entre 20 et 22 g ont été utilisées avec comme critères d'inclusion : animaux sains, nullipares et non gravides pour les femelles.

Les souris, mises à jeun, sont réparties selon l'homogénéité de leur poids en 4 lots de 6 souris:

- ❖ Lot 1 (témoin) : ces souris ont reçu uniquement une solution saline (NaCl à 9‰).
- ❖ Lots traités : ces groupes ont reçu une dose de 2000 mg/kg d'extrait de plante :
 - Lot 2 : traité avec l'extrait de *R. officinalis*
 - Lot 3 : traité avec l'extrait de *L. angustifolia*
 - Lot 4 : traité avec l'extrait de *C. longa*

La toxicité aigüe a été évaluée, en administrant les extraits par voie orale aux souris, après 4 heures de jeûne, par gavage à l'aide d'une canule d'intubation à embout légèrement recourbé, le volume ne dépassant pas 1 ml/20g de poids corporel (Photo 13).



Photo 13 : Administration de l'extrait aqueux par voie orale (gavage)

Le calcul de la DL50 a été effectué selon la formule de Dragstedt et Lang.

$$DL_{50} = \frac{50 (X_1 - X_2) + X_1 Y_2 - X_2 Y_1}{Y_2 - Y_1}$$

X1 : dose inférieure encadrant la DL₅₀

X2 : dose supérieure encadrant la DL₅₀

Y1 : Pourcentage de mortalité correspondant à X1

Y2 : Pourcentage de mortalité correspondant à X2

Le nombre éventuel d'animaux morts est noté et à la fin de l'essai dans le but de calculer la DL₅₀ (quantité d'extrait administrée en une seule fois et qui cause la mort de 50% du lot testé). Les animaux en vie sont pesés. Ils sont ensuite sacrifiés, disséqués et leurs organes immédiatement prélevés et observés.

Le comportement des animaux a été observé, toutes les 30 min pendant les 4 premières heures suivant l'administration des extraits, puis matin et soir, quotidiennement durant une période d'observation de 14 jours. Les troubles symptomatiques éventuels (manque d'appétit, difficultés motrices et dyspnées) ont été notés.

Le poids de chaque animal a été déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et noté ensuite au moins une fois tous les 2 jours. Les variations de poids sont calculées et enregistrées.

III.1.2.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées en utilisant le logiciel STATISTICA version 7.1. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. Les degrés de signification entre lots traités et témoin ont été mesurés par le test (t) de Student. Si $p < 0,01$, cette différence est considérée comme hautement significative.

III.2. Résultats et interprétation

III.2.2. Etude de la toxicité aiguë de *Quercus suber*

➤ Signes cliniques

Les signes cliniques observés chez les souris, après administration par voie intrapéritonéale (IP) des doses testées de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Quercus suber* sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Signes cliniques observés chez les souris après administration intra-péritonéale de l'extrait de Q. suber

Dose	Observations
Témoin	Comportement normal
300 mg/kg	Courte période dépressive et somnolence + Diminution des réflexes Après environ 5 à 10 minutes : Retour à la normale
2000 mg/kg	Regroupement de toutes les souris testées Diminution de la mobilité Augmentation du temps de somnolence Difficultés respiratoires Réduction de la sensibilité à la douleur et au bruit Perte de l'appétit allant jusqu'au refus de s'alimenter Paralysie des membres postérieurs

En comparaison au lot témoin, les résultats obtenus montrent que les doses administrées aux lots traités induisent des signes cliniques d'intensité variable en fonction de la concentration de l'extrait étudié.

Ainsi, à la dose de 300 mg/kg, on note une courte période dépressive accompagnée de somnolence et d'une diminution des réflexes. Cette période dure de 5 à 10 minutes.

A la dose de 2000 mg/Kg, on note des signes cliniques plus graves, à savoir une diminution de la mobilité, une augmentation du temps de somnolence, des difficultés respiratoires, une perte

d'appétit entraînant un refus de manger, une paralysie des membres postérieurs et une diminution de la sensibilité à la douleur et au bruit.

➤ *Evolution du poids*

L'évolution du poids a également été suivie pour les groupes I (témoin), II traité à la dose de 300mg/kg et III traité à la dose de 2000mg/kg d'extract pendant 14 jours (figure 25).

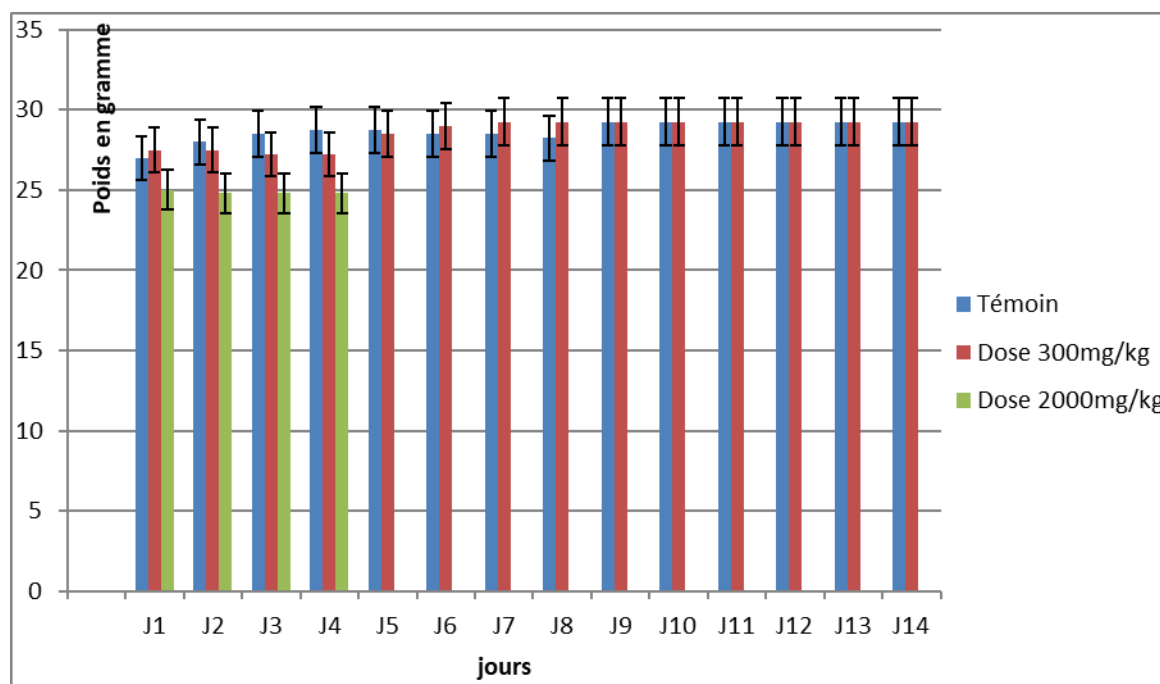


Figure 25 : Evolution du poids après injection par voie IP de l'extract de Soxhlet de *Q. suber*
Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD de trois répétitions.

Les résultats montrent que l'administration de 300 mg/kg d'extract méthanolique n'affecte pas le poids des souris. Les valeurs de poids des souris sont restées comparables et similaires à celles enregistrées pour le lot témoin.

L'injection de 2000 mg/Kg d'extract méthanolique a, par contre, induit une diminution significative du poids des souris et la mort de la totalité des souris après 5 jours (Figure 26).

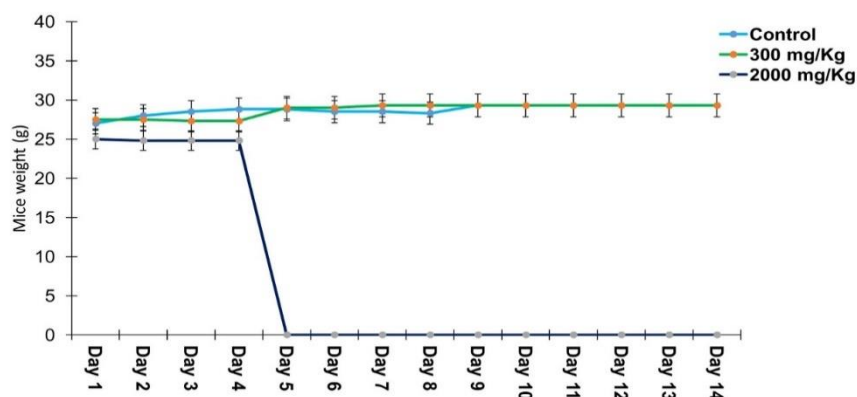


Figure 26 : Evolution du poids après injection de l'extrait méthanolique de *Q. suber*

Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD de trois répétitions.

➤ Calcul de la dose létale DL_{50}

Ce travail a également permis de déterminer la dose létale 50 % ou DL_{50} de l'extrait au Soxhlet de la poudre de l'écorce de *Quercus suber*, chez les souris mâles.

Le calcul de la dose létale DL_{50} a permis de tracer la courbe représentant le logarithme des doses de l'extrait au Soxhlet injectées en fonction du pourcentage de mortalité. Ces deux paramètres ont montré une régression linéaire (figure 27).

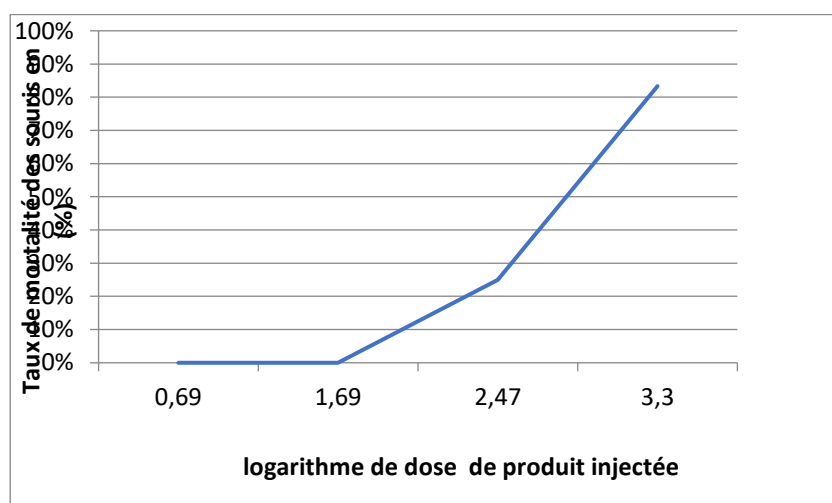


Figure 27 : Courbe de toxicité aiguë de l'extrait de *Q. suber*

Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD de trois répétitions.

L'étude de la toxicité aiguë de cet extrait a montré que le poids des souris qui ont reçu la dose de 300 mg/kg de l'extrait méthanolique n'a montré aucune différence significative par rapport au témoin non traité.

Cependant à la dose de 2000 mg/kg, on note une diminution significative du poids puis la mort de la totalité des souris. La dose létale DL_{50} a été déterminée sur la base du logarithme des doses d'extrait de Soxhlet et du pourcentage de létalité. Pour *Q. suber*, ce paramètre a été estimé à environ 1150 mg/kg chez les souris mâles lorsqu'il est administré par voie intrapéritonéale.

III.2.3. Evaluation de la toxicité de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa*

➤ Comportement et signes cliniques

Aucune différence significative n'ayant été observée concernant l'effet des extraits de *R. officinalis*, *L.angustifolia* et *C. longa*, le tableau 11 regroupe le comportement des animaux et les symptômes observés 4 heures après l'administration des extraits (dits lots traités) puis tous les 2 jours, pendant 14 jours.

Tableau 11 : Evaluation du comportement des souris et symptômes relevés durant 14 jours après administration des extraits de plantes

Symptômes	Lot témoin		Lots traités	
	Premières 4 heures	Tous les 2 jours pendant 14 jours	Premières 4 heures	Tous les 2 jours pendant 14 jours
Tremblements	Non	Non	Non	Non
Salivation	Non	Non	Non	Non
Convulsions	Non	Non	Non	Non
Peau et fourrure	Normales	Normales	Normales	Normales
Léthargie	Non	Non	Non	Non
Saignement	Non	Non	Non	Non
Somnolence	Non	Non	Oui	Non
Diarrhée	Non	Non	Oui	Non

Aucun décès n'a été constaté chez les animaux traités quel que soit l'extrait administré.

Les seuls symptômes détectés sont une somnolence et la survenue de diarrhées chez les souris traitées. Ces symptômes sont transitoires puisque 4 à 5 heures plus tard, les souris retrouvent une activité normale.

Les résultats révèlent donc que le traitement à dose unique avec les 3 extraits testés par voie orale à la dose de 2000 mg/kg n'a pas causé de décès chez les souris tout au long de la période d'étude. Aucun signe de toxicité lié au traitement n'a été observé. Ainsi, la dose létale par voie orale de *L. angustifolia*, *R. officinalis* et *C. longa* est estimée supérieure à 2000 mg/kg.

➤ Variation du poids des animaux

La figure 28 montre la variation de poids du lot témoin.

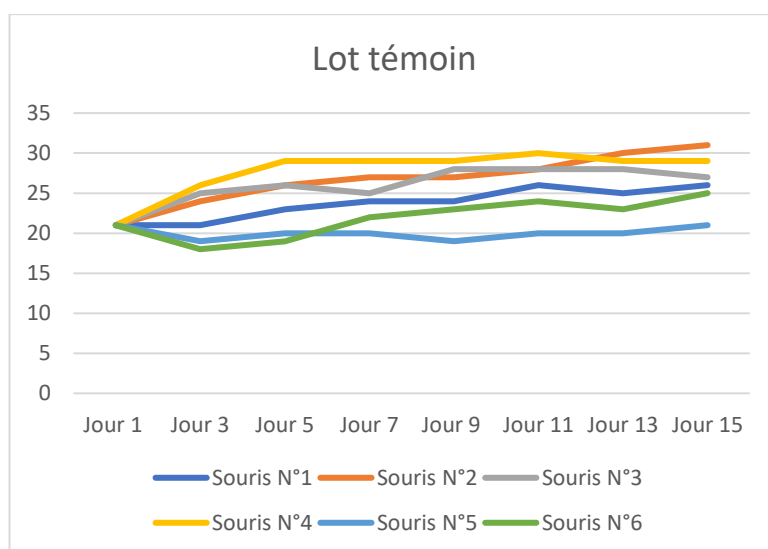


Figure 28 : Variation du poids des souris du lot témoin (en grammes)

Les gains de poids corporel dans ce groupe témoin sont significativement plus élevés par rapport à celui des lots traités, représentés dans les figures 29, 30 et 31, concernant respectivement *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa* pendant les 14 jours, particulièrement pendant la deuxième semaine après traitement. Une augmentation de 10g a été enregistrée entre

le 1^{er} et le 15^{ème} jour de la souris 2 du lot témoin alors que l'augmentation de poids la plus élevée est de 5g avec l'extrait de *R. officinalis*, 7g avec *L. angustifolia* et *C. longa*.

Cette différence est probablement due à la diarrhée survenue après l'administration des extraits.

La figure 29 représente l'évolution du poids corporel du lot traité par l'extrait de *R. officinalis*.

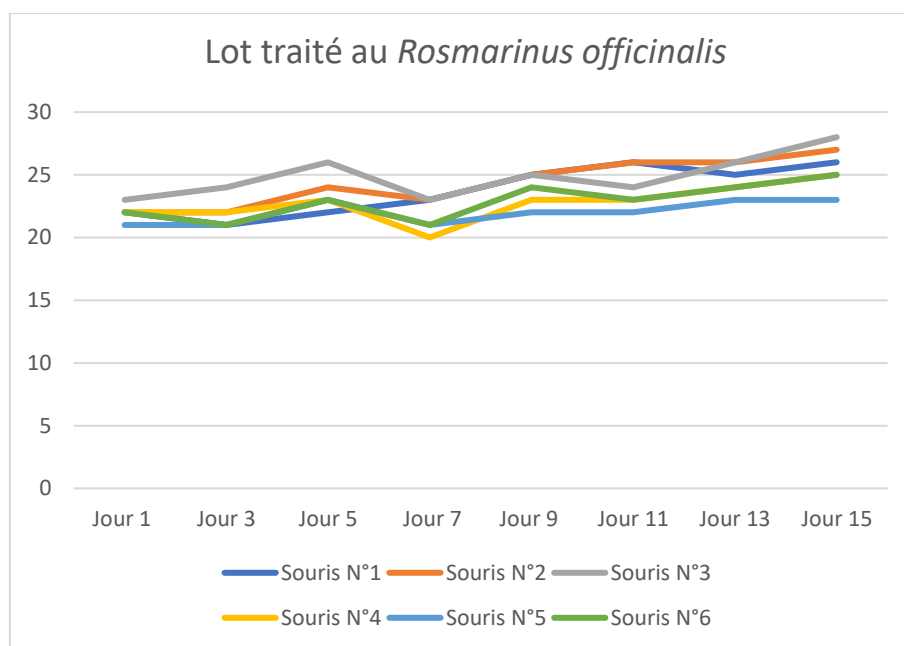


Figure 29 : Variation du poids des souris du lot traité par l'extrait de *R. officinalis* (en grammes)

Le poids de ce lot augmente en fonction du temps mais l'analyse statistique (test t de Student) ne montre pas de différence significative par rapport au lot témoin.

La figure 30 montre l'évolution du poids du lot traité par l'extrait de *Lavandula angustifolia*.

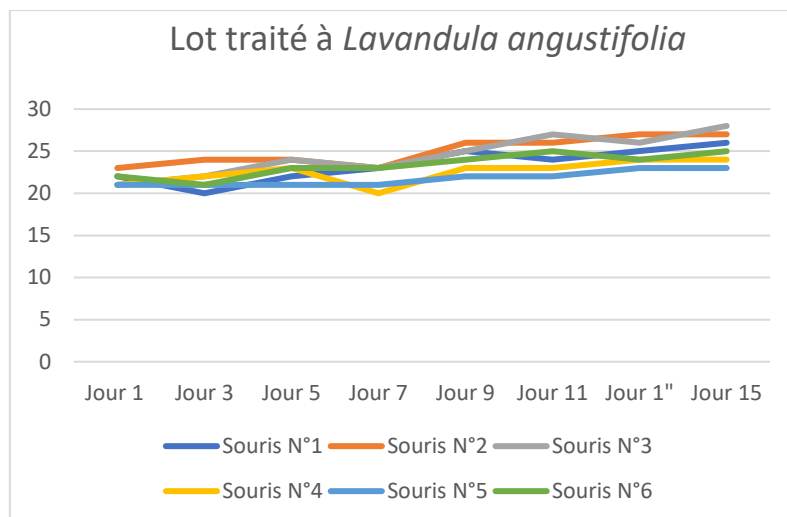


Figure 30 : Variation du poids des souris du lot traité par l'extrait de *L. angustifolia* (en grammes)

L'analyse statistique (test t de Student) ne montre pas de différence significative par rapport au lot témoin.

La variation de poids du lot traité par l'extrait de *Curcuma longa* est représentée dans la figure 31.

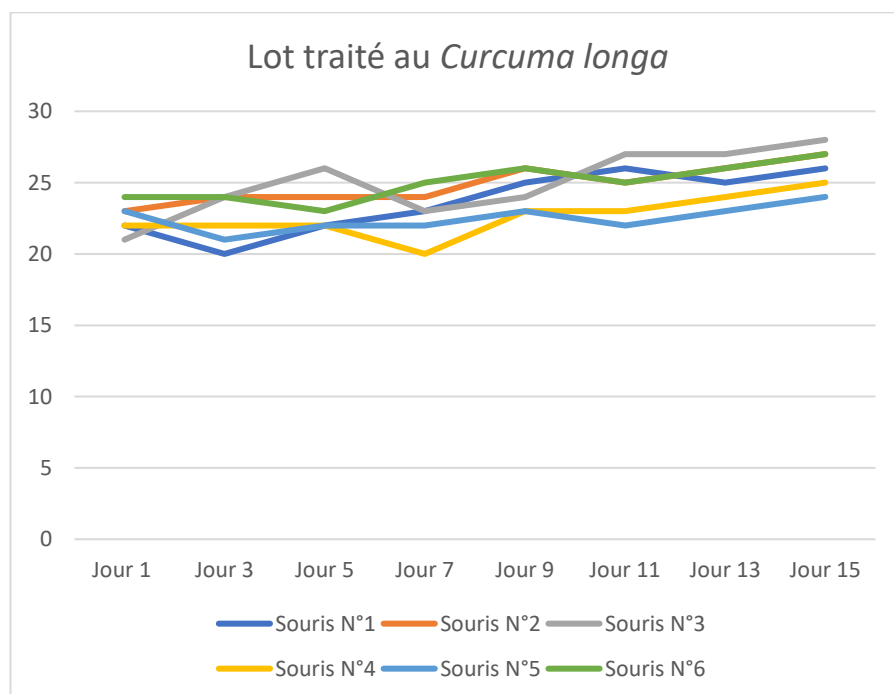


Figure 31 : Variation du poids des souris du lot traité par l'extrait de *C. longa* (en grammes)

Les figures 29, 30 et 31 représentant la variation du poids des souris en fonction du temps montrent la même tendance pour les trois extraits. Pendant toute la durée du traitement, le poids des souris augmente progressivement, quel que soit l'extrait administré et cette variation n'est pas significativement différente de celle du témoin.

➤ Analyse macroscopique des organes

Afin de confirmer l'innocuité des 3 extraits administrés, une dissection a été réalisée et les organes ont été prélevés à la fin du traitement. Les photos 14 et 15 présentent respectivement les organes prélevés d'une souris appartenant au lot témoin et ceux d'une souris traitée. Aucune différence n'a été notée entre les souris traitées avec les extraits de *R. officinalis*, *L. angustifolia* ou *C. longa*. Quel que soit l'extrait administré, les reins, foie, cœur, rate ne présentent aucune anomalie. L'analyse macroscopique de ces organes montre que leur couleur et leur texture sont normales chez toutes les souris traitées.

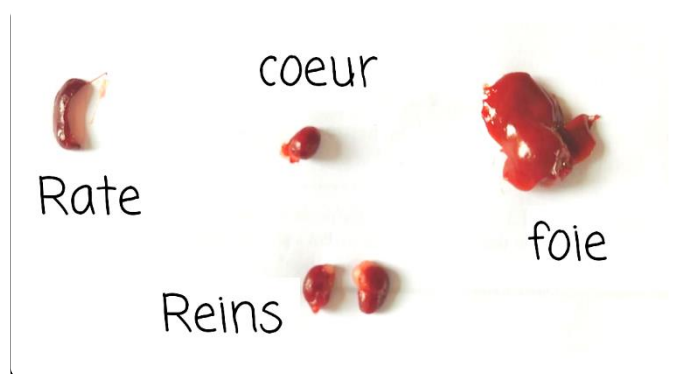


Photo 14 : : Organes prélevés chez une souris témoin

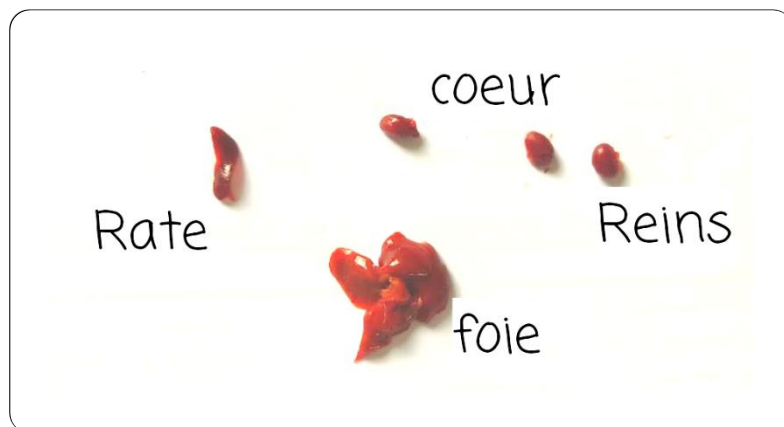


Photo 15 : Organes prélevés chez une souris traitée

III.3. Discussion et conclusion

Les signes cliniques observés après administration des extraits de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa* sont une somnolence et une diarrhée qui ne durent que quelques heures. Ces symptômes ont aussi été relevés par Mekonnen et al (2019) lorsqu'ils ont étudié la toxicité aigüe de l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia*. Ils sont rapportés également par Hoeffel (2018) avec différents extraits (hydroalcoolique, glycéroalcoolique et aqueux) de *Rosmarinus officinalis* et par Etame-Loe et al (2018) concernant l'extrait au vin de palme, l'extrait hexanique et éthanolique des rhizomes de *Curcuma longa*.

Concernant *Q. suber*, les symptômes sont plus graves : diminution de la mobilité, somnolence plus marquée, difficultés respiratoires, refus de s'alimenter, paralysie des membres postérieurs et diminution de la sensibilité à la douleur et au bruit.

La dose létale DL_{50} a été déterminée sur la base du logarithme des doses d'extrait de Soxhlet et du pourcentage de létalité. Pour *Q. suber*, ce paramètre a été estimé à environ 1150 mg/kg chez les souris mâles lorsqu'il est administré par voie intrapéritonéale, ce qui peut être considéré comme modérément toxique selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (Diezi et al, 1989).

Cependant, la valeur de DL_{50} dans notre travail est nettement inférieure à celle avancée par Milrzaei et al, en 2013, qui ont testé l'extrait aqueux de poudre de fruit de *Quercus suber* administrée par voie intrapéritonéale à des souris et qui est de 5000 mg/kg.

Milrzaei et al (2013) ont également rapporté que cet extrait administré par voie orale a révélé une absence de mortalité même pour une dose élevée de 5000 mg/kg de poids corporel dans tous les groupes des rats après 14 jours de traitement.

Cette différence peut être liée à la partie du végétal utilisé. Ce qui suggère que les extraits de fruits de *Quercus suber* sont moins toxiques que ceux obtenus à partir de l'écorce.

Par comparaison à d'autres espèces, la valeur DL₅₀ de *Quercus suber* reste supérieure à celles induites par *Anogeissus leiocarpus* et *Mansonia altissima*, par exemple, dont les DL₅₀ sont respectivement de 290,81 et 186,5 mg/kg de poids corporel (Ouédraogo et al, 2008).

Par ailleurs, les différents tests de toxicité aiguë de ces deux plantes réalisés par Ouédraogo et al (2008) ont permis d'observer les mêmes signes cliniques de toxicité à savoir une diminution de l'activité motrice des animaux telle que mise en évidence dans notre travail.

A l'issue de ce test d'évaluation de la toxicité aiguë de *Quercus suber*, les résultats révèlent également une augmentation du taux de mortalité au fur et à mesure de l'augmentation des doses de l'extrait méthanolique d'écorce de *Quercus suber* allant de 300 à 2000 mg/kg. Ceci permet de déduire un effet dose-réponse de cet extrait sur les souris.

Ces résultats concordent avec ceux de Djyh et al. (2010) qui ont montré que l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait total aqueux de l'écorce de *Mansonia altissima* a un effet dose sur les souris et que le taux de mortalité a augmenté de 30% pour une dose allant de 175 mg/kg à 200 mg/kg.

A l'évidence, ce travail nous a permis de montrer que les extraits de l'écorce de *Q. suber*, particulièrement celui obtenu par la méthode du Soxhlet sont modérément toxiques et possèdent une activité antifongique due à des principes actifs naturels, candidats potentiels aux traitements des candidoses. Cette étude mérite donc d'être approfondie afin de déterminer la dose ne présentant aucune toxicité tout en gardant un effet anticandidosique.

Concernant *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa*, l'étude de la toxicité montre que l'administration par voie orale des extraits de ces plantes à la dose de 2000 mg/kg n'entraîne aucune létalité, ce qui signifie que la DL_{50} est supérieure à cette dose.

Aussi, selon la classification admise (OMS, 1978) on peut conclure que *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa* ne sont pas toxiques.

En 2009, le rapport réalisé par European Medicines Agency a montré que tous les extraits du romarin que ce soit l'extrait méthanolique, éthanolique ou aqueux n'entraînent aucune toxicité à une dose 2g /kg ce qui conforte nos résultats.

En outre, nous n'avons observé aucun comportement anormal durant les 14 jours, ce qui est en accord avec une étude réalisée par Zanella et *al*, en 2012, qui ont montré que l'administration de l'huile essentielle de romarin chez les souris a amélioré la phase d'acquisition, d'apprentissage et la mémoire sociale à court terme.

A titre d'exemple et selon les résultats obtenus, chez une souris qui pèse 22 g, l'administration per os d'une dose unique de 0,44 g ce qui équivaut à 1,82 g de romarin frais, le rendement en extrait étant de 24,15% de matière première n'entraîne aucun décès ni signes de toxicité.

Si l'on transpose ce résultat chez un homme de 60 kg, une dose orale unique de 496,9 g de cette plante fraîche ne devrait provoquer aucun symptôme aigu.

Les résultats de cette étude montrent une légère diminution du poids de quelque souris traitées par rapport aux témoins. Cette baisse du poids pourrait être liée à une baisse de l'activité générale des animaux qui restent blottis dans un coin de la cage après l'administration de l'extrait, et qui aurait pour conséquence une diminution de leur consommation de nourriture ainsi qu'à la diarrhée survenue. Cette légère diminution de poids est transitoire et n'affecte pas la tendance générale d'augmentation du poids de tous les lots. Cela est en accord avec divers travaux qui montrent que le traitement par des substances non toxiques n'entraîne pas de variation significative du poids et du comportement des souris.

Par la suite, le poids des souris augmente progressivement, quel que soit l'extrait administré et cette variation n'est pas significativement différente de celle du témoin.

Ces résultats confirment ceux de Al Namer (2014) concernant *Rosmarinus officinalis* et *Lavandula angustifolia*, appuyés par ceux de Mekonnen (2019) sur *L. angustifolia*.

Ces résultats confirment également les travaux de Etame-Loe (2018) sur *C. longa* qui ont testé des doses de 200, 400 et 800mg/kg en dose unique et en doses répétées pendant 28 jours. Ces traitements ont engendré une baisse pondérale non significative des animaux traités.

A titre de comparaison, Mikolo et al (2020) ont testé l'effet de *Tetracera potatoria* (plante médicinale, communément utilisée en Afrique de l'ouest) à la dose de 5000 mg/kg et dans ce cas, le comportement général des souris demeure normal en comparaison avec les témoins. Cependant, les souris tests ont gagné relativement moins du poids que les témoins mais sans différence significative au seuil de 5%, cela étant dû à une consommation moindre d'aliments.

Anadon et al, en 2008, ont trouvé aussi que le poids corporel et la consommation de nourriture et d'eau ainsi n'ont pas été affectés par l'administration de l'extrait du romarin en dose orale unique de 2000 mg/kg de poids.

Concernant *Curcuma longa*, nos résultats confortent ceux de Bhavanishankar et al (1980), Qureshi et al (2006) ainsi que Balaji et al (2010) qui ont rapporté que cette espèce ne présente aucune toxicité, quel que soit le mode d'extraction utilisé et même à des doses supérieures à 2000mg/kg.

Enfin, les organes prélevés à la fin du traitement (reins, foie, cœur, rate) des souris traitées ne présentent aucune atteinte, leur couleur et leur texture comparativement au groupe témoin sont normales. Cela confirme davantage que la dose administrée des extraits administrés n'est pas toxique.

Plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux effets bénéfiques de ces plantes sur le fonctionnement des organes. Ainsi, El Kady et Tawfik, en 2019, ont montré que les souris prétraitées à l'extrait éthanolique de romarin sont protégées de l'atteinte des cellules hépatiques habituellement due à l'exposition aux rayons gamma. Salokhe et al, en 2020, ont rapporté que chez des souris traitées à l'extrait éthanolique de romarin, les paramètres hématologiques, histopathologiques, biochimiques ainsi que le poids total et le poids des organes ne présentent pas de différence significative avec les témoins.

Concernant, *Lavandula angustifolia*, Simeon et al (2022) ont étudié l'effet de l'extrait éthanolique sur les paramètres hématologiques et histologiques des cœurs de rats. Ils n'ont relevé aucune différence par rapport aux témoins. Cette étude conclut que la lavande pourrait constituer une plante intéressante dans le cas de maladie cardiovasculaire.

Enfin, Naz et *al*, en 2018, ont mis en évidence l'effet protecteur de *Curcuma longa* sur les lésions hépatiques de souris. Sharma et Kumari (2018) ont également montré l'effet protecteur de *C. longa* sur les poumons de souris exposées au cadmium. Negaoui et *al* (2022) ont relevé que *Curcuma longa* protège les souris pour lesquelles une inflammation a été induite par les lipopolysaccharides (LPS) et dans ce cas, l'analyse de la rate prélevée et l'étude histologique effectuée au niveau intestinal ne détectent aucune altération.

Notre travail a donc mis en évidence l'innocuité *in vitro* des extraits de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa*. Concernant *Quercus suber*, l'extrait est légèrement toxique, selon la classification de toxicité admise.

Conclusion et perspectives

Depuis la nuit des temps, l'humanité a dû faire face à la maladie et aux épidémies. La réponse s'est toujours faite, quel que soit le degré de civilisation, par les plantes. De manière empirique ou bien par approche scientifique, les plantes sont toujours présentes dans l'arsenal thérapeutique, pour soigner les hommes, les animaux et même les végétaux.

Le présent travail s'est justement intéressé à quatre plantes de la pharmacopée marocaine : un arbre, *Quercus suber*, deux arbustes : *Rosmarinus officinalis* et *Lavandula angustifolia* et un rhizome : *Curcuma longa*.

Ces quatre plantes sont communément utilisées en tant que plantes médicinales sous différentes formes : infusion, aromates, cataplasme, lotion, ...

Il nous a semblé judicieux de confirmer les effets thérapeutiques de ces plantes par le biais d'une démarche scientifique rigoureuse. Nous avons ainsi testé l'activité antivirale de *Rosmarinus officinalis*, de *Lavandula angustifolia* et de *Curcuma longa* sur l'activation des plaquettes sanguines prélevées chez des patients atteints de la COVID-19.

Cette pneumonie virale, apparue en mars 2019, a causé des dégâts considérables à l'échelle planétaire. Aucun pays, aucune communauté, aucune race ni aucune tranche d'âge n'a été épargné. Les statistiques, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, rapportent que le nombre total de décès associé directement ou indirectement à la COVID-19 entre le 1^{er} janvier 2020 et le 31 décembre 2021 est d'environ 14,9 millions.

Le Maroc, un des pays qui ont le mieux géré cette crise, accuse tout de même les chiffres de 1.170.427 cas cumulés et 16.080 décès au 06 juin 2022, selon les chiffres officiels du Ministère de la Santé.

Aussi, face à la pandémie, la réponse notamment dans les pays développés est le traitement médicamenteux antibiotique, antiviral, vaccin, ... avec tout ce que cela comporte comme effets secondaires, accoutumance, apparition de résistances alors que la nature offre un véritable réservoir de plantes qui soignent et soulagent lorsqu'elles sont utilisées à bon escient.

Notre travail a ainsi mis en évidence l'activité antivirale de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa* et a démontré l'efficacité *in vitro* des extraits de ces plantes dans l'inhibition de l'hyperréactivité des plaquettes sanguines, caractéristique de l'infection par la COVID-19.

Les résultats montrent que les extraits de *Rosmarinus officinalis* et de *Lavandula angustifolia* ont un effet anti-agrégant et inhibent la phosphorylation de la PKC δ et de ce fait empêchent l'agrégation plaquettaire responsable des thromboses qui contribuent à la défaillance d'organes et parfois même au décès.

L'extrait de *Curcuma longa* s'est également montré efficace et a inhibé l'activation des plaquettes en bloquant la phosphorylation de la PKC δ , bien qu'il n'ait pas montré d'effet antiagrégant.

Les extraits de ces trois plantes ont, en définitive, un effet certain de réduction de l'hypermotilité des plaquettes due à l'infection par le virus SARS-CoV-2.

Nous avons, par ailleurs, testé l'activité antifongique de l'écorce de *Quercus suber* en utilisant trois modes d'extraction : la décoction, la macération à froid et l'extraction par la méthode de Soxhlet. Nous avons étudié l'effet de ces trois extraits sur cinq souches de *Candida albicans* isolées à partir d'ongles de doigts, d'orteil, de cathéter ombilical et à partir d'un prélèvement buccal. La dangerosité de ce champignon réside justement dans sa polyvalence dans les environnements les plus divers car il s'adapte en tant que commensal à tous les organes du corps humain, au niveau des muqueuses et peut même disséminer dans la circulation sanguine. Le spectre clinique des candidoses induites par *Candida albicans* varie de superficielle à invasive et peut être associé à des complications graves telles que l'endocardite et la méningite qui sont souvent liées à une morbidité et une mortalité élevées.

Notre travail a ainsi montré l'activité anticandidosique de l'écorce de *Quercus suber*. L'activité antifongique des extraits enregistrée sur les cinq souches de *Candida albicans* testées s'avère variable en fonction de la souche testée, d'une part, et en fonction de la technique d'extraction ainsi que de la dilution, d'autre part.

Ainsi, l'extrait aqueux, obtenu par décoction, est efficace sur la souche prélevée de l'ongle de l'orteil à la concentration minimale d'inhibition (CMI) de 12,5 mg/ml. Le traitement par l'extrait obtenu par macération dans le méthanol montre que la souche responsable de la mycose des ongles des orteils présente une CMI à 6,25 mg/ml. Et l'extrait obtenu par la méthode de Soxhlet affiche une CMI à 12,5 mg/ml pour la souche des ongles de doigts et du prélèvement buccal, à 6,25 mg/ml pour la souche prélevée du cathéter ombilical et à 3,12 mg/ml pour la souche prélevée à partir de l'ongle d'orteil.

Nos résultats montrent également que le meilleur effet fongicide contre les cinq souches de *C. albicans* testées a été enregistré avec l'extrait méthanolique obtenu par Soxhlet.

Ainsi, l'extraction par Soxhlet s'avère être la technique la plus efficace puisqu'elle inhibe la prolifération des souches testées notamment la souche prélevée au niveau de l'ongle de l'orteil qui est résistante au Fungizone, antifongique de synthèse largement prescrit.

L'étude a également confirmé l'innocuité de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa* L. en déterminant la dose létale médiane (DL₅₀) qui s'est avérée supérieure à 2000mg/ml. Ces plantes ne sont donc pas toxiques, aux doses habituellement utilisées par les consommateurs.

Concernant *Quercus suber*, l'extrait de l'écorce s'est avéré modérément toxique selon la classification admise. Il serait donc intéressant de déterminer par des analyses supplémentaires la dose antifongique efficace, ne comportant pas d'effet toxique.

En conclusion, notre travail a permis une étape supplémentaire dans l'élaboration de produits alternatifs aux traitements médicamenteux de synthèse, très largement prescrits actuellement et qui présentent de nombreux effets secondaires.

Les quatre plantes étudiées qui sont facilement disponibles et d'un coût très abordable ont montré clairement des effets thérapeutiques, antifongique pour *Quercus suber* contre cinq souches de *Candida albicans* et antiviral pour *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et *Curcuma longa* contre le virus de la COVID-19.

A l'évidence, ce travail est une première approche qui mériterait d'être développé davantage. Les résultats obtenus ne constituent qu'une étape de recherche à la valorisation des plantes étudiées dans un domaine médical qui souffre d'absence de médicaments efficaces et non toxiques. Ainsi, l'élaboration de produits alternatifs doit passer par une confirmation des performances mises en évidence par le biais de cette étude et peut être complétée, sur le plan pharmacologique, par une identification des molécules actives impliquées ainsi que par une étude de la toxicité chronique pour écarter tout effet secondaire. Sur le plan microbiologique également, une étude ultrastructurale pourrait détecter les modifications induites par les extraits en vue d'élucider leur mécanisme d'action et des essais *in vivo* pourraient ouvrir la voie au développement d'un traitement efficace, sans effet secondaire et peu coûteux.

Références bibliographiques

- Aafi A., 2007. Etude de la diversité floristique de l'écosystème de Chêne-liège de la forêt de la Maamora. Thèse de Doctorat d'état Es-Sc agronomiques, IAV Hassan II, Rabat (190p).
- Aanouz I., Belhassan A., El-Khatabi K., Lakhlifi T., El-Ldrissi M., Bouachrine M., 2021. Moroccan medicinal plants as inhibitors against SARS-CoV-2 main protease : computational investigations, *J Biomol Struct Dyn.*;39(8):2971-2979.
- Abadi MNA., Mortazavi M., Kalani N., Marzouni HZ., Kooti W., Ali-Akbari S., 2016. Effect of hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. leaf on anxiety in mice. *J Evid Based Complementary Altern Med.*;21:NP85–90.
- Adem S., Eyupoglu V., Sarfraz I., Rasul A., and Ali M., 2020. Identification of potent COVID-19 main protease (Mpro) inhibitors from natural polyphenols: an in silico strategy unveils a hope against CORONA, *Preprints 2020* (doi: 10.20944/preprints202003).
- African pharmacopea, 2014. African Union Common Repository (Specialized Technical and representational Agencies AU STRC Archives.
- Ahn JY, An S, Sohn Y, Cho Y, Hyun JH, Baek YJ, 2020. Environmental contamination in the isolation rooms of COVID-19 patients with severe pneumonia requiring mechanical ventilation or high-flow oxygen therapy. *J Hosp Infect.* 106(3):570-6
- Akammar S., 2013. Les onychomycoses : étude rétrospective et particularités chez les diabétiques (Thèse), Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V, Rabat.
- Akram M., Tahir IM., Shah SMA., Mahmood Z., Altaf A., K. Ahmad, Munir N., Daniyal M., Nasir S., Mehboob H., 2018. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: a systematic review, *Phytother Res.*, 32 (5), pp. 811-822.
- Akroum, S., 2017. Antifungal Activity Of Acetone Extracts From *Punica Granatum* L., *Quercus Suber* L. And *Vicia Faba* L. *J. Mycol. Medicale*, 27, 83–89.
- Al-Hader AA., Hasan ZA., Aqel MB., 1994. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*. *J Ethnopharmacol*; 43 :217–21.
- Alison J. et Paul D., 2008. *Toxicologie d'Urgence* (1ère edn). Elsevier/Masson : Paris..
- Alkofahi A., Masaadeh H., Al-Khalil S., 1996. Antimicrobial evaluation of some plant extracts of traditional medicine of Jordan. *Alexandria Journal of Pharmacy*, 10:123–126.
- Al Namer R., 2014. Valorisation pharmacologique de *Rosmarinus officinalis* et de *Lavandula officinalis*: Toxicité aiguë, potentiel psychotrope et antibactérien. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat, 157p.
- Amar Y., Meddah B., Bonacorsi I., Costa G., Pezzino G., Saija A., 2017. Phytochemicals, antioxidant and antiproliferative properties of *Rosmarinus officinalis* L on U937 and CaCo-2 cells. *Iran J Pharm Res.*;16:315–27.
- Amaral GP., de Carvalho NR., Barcelos RP., Dobrachinski F., Portella L., da Silva MH., 2013. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food Chem Toxicol.*;55:48–55

Anado' AN., 2008. Acute Oral Safety Study of Rosemary Extracts in Rats. Journal of Food Protection, 790–795.

Anibal PC., Peixoto ITA., Foglio MA., José Francisco H., 2013. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Braz J Microbiol. 17;44(3):839-48.

ANPMA, 2021 : Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques : Vision Stratégique de l'ANPMA 2018-2022 (<https://www.anpma.ma/strategie>).

Antinori S., Milazzo L., Sollima S., Galli M., Corbelliono M., 2016. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review, European Journal of Internal Medicine. Volume 34, October 2016, Pages 21-28.

Aouadhi C., Ghazghazi H., Brahim H., Abderrazak M., 2014. Total phenolic content, antioxydant and antibacterial activities of *Marrubium vulgare* methanolic extract. Tunis. J ; Med. Plants Nat. Prod ; 11 :73-79.

Arakawa T., Yamasaki H., Ikeda K., Ejima D., Naito T., Koyama AH., 2009. Antiviral and virucidal activities of natural products. Curr Med Chem, 16(20): p. 2485-97.

Ataee R., Falahati A., Ebrahimzadeh M.A., Shokrzadeh M., 2016. Anticonvulsant activities of *Sambucus nigra*, Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 20 (14), pp. 3123-3126.

Atbib M., Baddouri Kh., Benjouad A., 2007. Forêt de la Maamora (*Quercus suber* L.)..

Aubry P., 2022. Mycoses profondes Actualités 2022. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France.

Ayati Z., Ramezani M., Amiri MS., Moghadam AT., Rahimi H., Abdollahzade A., Sahebkar A. and Emami SE., 2019. Ethnobotany, Phytochemistry and Traditional Uses of *Curcuma* spp. And Pharmacological Profile of Two Important Species (*C. longa* and *C. zedoaria*): A Review, Current Pharmaceutical Design, 25: p. 871-935

Bachiri L., Labazi N., Daoudi A., 2015. Etude ethnobotanique de quelques lavandes marocaines spontanées, Volume 9(3), ISSN: 1308-1318, p1309..

Bakirel, T., Bakirel U., Kele OU., Ulgen G., Yardibi H., 2008. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. J Ethnopharmacol, 116(1): p. 64-73.

Balaji S. and Chempakam B., 2010. Toxicity prediction of compounds from tumeric (*Curcuma longa* L). Food and Chemical Toxicology, vol 48, Issue 10, p2951-2959.

Ballu J.M., 2004. Bois de musique, la forêt berceau de l'harmonie. Edition du Gerfaut, Paris

Barrett T.J, Bilaloglu S, Cornwell M., BurgessH.M., Virginio V.W., Drenkova K., Ibrahim H., Yuriditsky E., Aphinyanaphongs Y., Lifshitz M., Liang F.X., Alejo J., Smith G., Pittaluga S., Rapkiewicz A.V., Wang J., Iancu-Rubin C., Mohr I., Ruggles K., Stapleford K.A., Hochman J., Berger J.S., 2021. Platelets contribute to disease severity in COVID-19. J Thromb Haemost.;19:3139–3153.

- Baynes RE. et Hodgson E., 2010. Absorption and Distribution of Toxicants. Textbook of Modern Toxicology. Hoboken, New Jersey. (4):79-114.
- Bedevian AK., 1994. Illustrated polyglottic dictionary of plant names, Presses Argus & Papazian, Cairo, ISBN B00194ED3G.
- Belghazi B., Ezzahi M., Khaldi A., 2003. Bilan des travaux de régénération artificielle du chêne-liège (*Quercus suber* L.) dans quelques forêts d'Afrique du nord. XII World Forestry Congress, Québec City, Canada..
- Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires (1370p) Editions Le Fennec, Maroc.
- Bellakhdar J., 2006. Plantes Médicinales au Maghreb et Soins de Base, Précis de Phytothérapie Moderne. Éditions Le Fennec, Casablanca.
- Belmont M., 2013. *Lavandula angustifolia* M., *Lavandula latifolia* M., *Lavandula x intermedia* E. : Etudes botaniques, chimiques et thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2013 (dumas-00858644), 144p.
- Benabid A., 2000. Flore et écosystèmes du Maroc : évaluation et préservation de la biodiversité. Paris: Ibis Press
- Benabid A., 2005. Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité, Ibis Press, Paris (359p)..
- Bendif H., Caprioli G., Lupidi G., Quassinti L., Sagratini G., A Vitali L., Vittori S. and Maggi F., 2017. *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. Food Chem. 218: p. 78-88.
- Bene K., Camara D., Bra N., Fofie Y., Zirihi GN., 2015. Étude ethnobotanique, activité antifongique in vitro sur *Candida albicans* et toxicité sur les cellules HFF de *Harrisonia abyssinica* Oliv. (Simaroubaceae), une plante de la pharmacopée ivoirienne. Journal of Applied Biosciences, vol 94
- Bernard GT, Esteban P, Christopher JS., 1982. Turmerones: Isolation from Turmeric and their Structure Determination. Chemical communications 6; 1982: 363..
- Bernardes WA., Lucarini R., Tozatti MG., Flauzino LG., Souza MG., Turatti IC., 2010. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. Z Naturforsch C.;65:588–93.
- Bhavanishankar TN., Shantha NV., Ramesh HP., Murthy I., Murthy S., 1980. Acute toxicity studies in rats, guineapigs and monkeys. Indian Journal of Experimental Biology, 18(1). 73-75.
- Bisset NG. and Wichtl M., 2000. Herbal drugs and Phytopharmaceuticals, Third Edition, Scientific Publisher Boca (0849310113), 565 pages.
- Blumenthal M., 2003. The ABC clinical guide to herbs. American Botanical Council. American Botanical Council, P.O. Box 144345, Austin, TX 78714-4345, USA.
- Borges RS., Sánchez Ortiza BL., Pereira ACM., Keitaa H., Carvalhoa JCT, 2019. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, antiinflammatory activity, and

mechanisms of action involved ; Journal of Ethnopharmacology, volume 229, 30, Pages 29-45..

Born F., 2003. Les candidoses buccales : revue littérature, Université de Genève, N°714 2013 pp (3) [2].

Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Editions Tec & Doc Lavoisier, ISBN 978-2-7430-1112-3, 1355 p.

Botineau M., 2014. Guide des plantes toxiques et allergisantes. Belin. Paris : Belin, 2011. 240 p. (collection des guides des fous de nature.

Boubaker A., Kayouli C., Buldgen A., 2010. Composition chimique et teneur en composés phénoliques des espèces arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens, p. 315-317..

Boukachabine Kh. et Agoumi A., 2005. Les onychomycoses au Maroc. Les annales de biologie clinique, vol 63 (6), Nov-Déc 2005..

Boullard B., 1999. Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Estem. Paris (ISBN 2843711177), 636p..

Bousbia N., 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires, Thèse (Université d'Avignon), NNT:2011AVIG0243.

Bruneton J., 1995. Pharmacognosy : Phytochemistry, medicinal plants, (Edit. Tec & Doc Lavoisier, ISBN 2743010584, 1118p.

Burlacu E., Nisca A., Tanase C., 2020. A Comprehensive Review Of Phytochemistry And Biological Activities Of Quercus Species. Forests 2020, 11, 904.

Bussmann R.W., Paniagua Zambrana NY., Romero C., 2018. Astonishing diversity-the medicinal plant markets of Bogota, Colombia. J Ethnobiology Ethnomedicine 14, 43.

Cabiddu A., Decandia M., Sitzia M., Molle G., 2000. A note on the chemical composition and tannin content of some mediterranean shrubs browsed by Sarda goats. Optins méditerranéennes, vol 52, p175.

Cash R., 2022. Les limites de l'expérimentation animale, dans « L'expérimentation animale en question, p 105-131.

Cadahia E., Garcia-Vallejo M.C. Conde E.,1998. Waxes composition of Quercus suber reproduction cork from different Spanish provenance. Wood Science and Technology September 1999, vol 33, issue 4, p 271-283..

Campbell Ch., Kellogg E.A., Judd W.S., 2002. Botanique systématique : une perspective phylogénétique, 1ère édition américaine De Boerck Université, p303-309.

CAPM, 2016. Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc. Ministère de la santé. Royaume du Maroc.

- Carvalho ACB., Nunes D., Baratelli T., Shuqair NS., 2007. Aspectos Da Legislação No Controle Dos Medicamentos Fitoterápicos. TC Amaz. 2007, 5, 26–32.
- Castola, V., Marongiu, B.; Bighelli, A.; Floris, C.; Laï, A.; Casanova, J. Extractives Of Cork (*Quercus Suber* L.), 2005. Chemical Composition Of Dichloromethane And Supercritical CO₂ Extracts. *Ind. Crops Prod.*, 21, 65–69.
- Cavanagh, H.M. and J.M. Wilkinson, 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res*, 16(4): p. 301-8.
- Cazenave JP, 2013. Les plaquettes sanguines : conclusion, *Bull. Acad. Natle Méd.*, 2013, 197, no 2, 419-423, séance du 26 février 2013.
- Ceyhan N., Keskin D. & Ugur A., 2012. Antimicrobial activities of different extracts of eight plant species from four different family against some pathogenic microorganisms. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10 (1) : 193-197.
- Chaker E., H'mida S., Sfar Z., 1987. Bilan des mycoses superficielles rencontrées à l'Hôpital Habib Thameur de Tunis, Tunisie, 1987 pp 283-290.
- Chater S., 2016. Les intoxications par les plantes dans la région du Gharb Chrarda Beni Hssin. Doctorat en médecine, Université Mohammed V.
- Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M. et Ed-Dra A., 2016. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils from seven Moroccan medicinal plants. *Phytothérapie* 14:355-362.
- Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., 2020. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Lond Engl.*;395(10223):507–513.
- Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen H-L, Chan MCW, 2020. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe*. 2020;1(1):10.
- Choi JG., Kim YS., Kim, Chung HS., 2019. Antiviral activity of ethanol extract of *Geranii Herba* and its components against influenza viruses via neuraminidase inhibition, *Sci. Rep.*, 9 (1), p. 12132.
- Chowdhary A., Sharma C., Meis, JF., 2017. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017, 13(5).
- Chowdhury H., Walia S. & Saxena B. S., 2000. Isolation, characterization and insect growth inhibitory activity of major turmeric constituents and their derivatives against *Schistocerca gregaria* (Forsk) and *Dysdercus koenigii* (Walk). *Pest Manag.Sci*. 56 : 1086-1092.
- Chu C. and Kemper MD., 2001. *Lavandula* spp. Longwood Herbal Task Force: (<http://www.mcp.edu/herbal/>).
- Connors JM, Levy JH., 2020. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation *Blood*;135 (23):2033- 2040.
- Costa ACBP, Back-Brito GN, Mayer FL, Hube B, Wilson D, 2020. *Candida albicans* Mrv8, is involved in epithelial damage and biofilm formation. *FEMS Yeast Res* 20(5).

d'Enfert Ch., Hube B., 2007. *Candida: comparative and functional genomics*. Edition Horizon Scientific Press 2007.

d'Enfert Ch., Kaune A-K., Alaban L-R, Chakraborty S., Cole N., Delavy M., Kosmala D., t Marsaux B, Fróis-Martins R., Morelli M., 2020. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS. Microbiology Reviews*.

Da Silva PJ., Bendjeddou LZ., Meijer L., 2014. Search for natural substances with therapeutic activity, *Med Sci (Paris)*, Volume 30, Number 3, 319-328.

Da Silva PPJ., Bendjeddou LZ. et Laurent Meijer L., 2014. Search for natural substances with therapeutic activity. *Med Sci (Paris)*, Volume 30, Number 3, Mars 2014.

Dantas AdS, Lee K., Raziunaite I., Schaefer K., Wagener J., Yadav B., Gow N.A.R., 2016. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 34, December 2016, Pages 111-118.

de Oliveira JR., de Jesus D., Figueira LW, de Oliveira FE., Pacheco Soares C., Camargo SE., Jorge AO., de Oliveira LD., 2017. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood)*;242:625–34.

Del Baño MJ., Castillo J., Benavente-García O., Lorente J., Martín-Gil R., Acevedo C., 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J Agric Food Chem.*;54:2064–8.

Delaveau P., 1987. Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Ed. Albin Michel, Paris. 130-136.

Denaro M., Smeriglio A., Barreca D., Trombetta D., 2019. Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update, *Phytotherapy Research* 34(9).

Develoux M., Bretagne S., 2005. *Candidoses et levures diverses EMC (Elsévier SAS, Paris) Maladies infectieuses* 8, 602-A-10.

Dhanani T., Shah S., Gajbhiye N., Kumar S., 2017. Effect Of Extraction Methods On Yield, Phytochemical Constituents And Antioxidant Activity Of *Withania Somnifera*. *Arab. J. Chem.* 2017, 10, S1193–S119915.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N., Kumar, S., 2017. Effect Of Extraction Methods On Yield, Phytochemical Constituents And Antioxidant Activity Of *Withania Somnifera*. *Arab. J. Chem.*, 10, 1193–1199.

Didem F., Melike E., Ekrem K., Koray Sakar M., 2007. Antibacterial and antifungal activities of some *Quercus* species growing in Turkey. *FABAD. J. Pharm. Sci.* 32, p127-130.

Diezi, J., 1989. *Toxicology: Basic Principles And Chemical Impact*. Pharmacol. Fundam. Princ. Prat. Slatkine Med Acad. Press Genève, 33, 44.

Djyh Gb., Adeoti M., Djaman A., Guede G., 2010. Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait total aqueux d'écorce de *Mansonia altissima* (bois bete) chez les souris. *J. sci. pharm. biol.*, Vol.11, n°2 - 2010, pp. 13-20.

Dos Reis Livero FA, da Silva LM, Ferreira DM, Galuppo LF, Borato DG, Prando TB, Lourenço EL, Strapasson RL, Stefanello ME, Werner MF, Acco A, Naunyn, 2016. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid, *Schmiedebergs Arch Pharmacol*, :389(9) : 985-98. Epub 2016 Jun 17.

Dupont F. et Guignard J-L., 2012. Botanique, Les familles des plantes (Editions Elsevier Masson), 2012, ISBN 978-2-2294-714226-9, p3-8.

El Alami A., 2021. Plantes médicinales, alimentaire et aromatiques potentiellement toxiques. Book, April 2021, ISBN 979-10-290-1156-6, Publié le 29-04-2021 par Les Editions Chapitre.com.

El Hachemi H., 2010. Cartographie et état des lieux des périmètres de régénération du chêne-liège dans la suberaie de la Maâmora. Mémoire de 3ème cycle, ENFI Salé (53p).

El Haouari M., Rosado JA., 2016. Medicinal Plants with Antiplatelet Activity. *Phytotherapy Research* 30(7).

El Hassani N., 2013. Les mycoses : étude d'une série répertoriée au service de parasitologie-mycologie médicale de l'hôpital ibn Sina de Rabat sur une période de 5 ans (2007-2011), Université Mohammed V, Faculté de médecine et de pharmacie- Rabat.

Elkady AA. Ans Tawfik SS., 2021. The prevention of γ -Rays-Induced liver toxicity by *Rosmarinus officinalis* leaves ethanolic extract in mice, 2021. Conference : 15th Arab Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy 12-16/12/2021, Aswan, Egypt.

El Makhfi F., 2012. Evaluation de l'activité antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Daphne gnidium*. Mémoire de master, Faculté des Sciences, Université Mohammed V Agdal, Rabat., Maroc, (55p).

Eloff JN., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.*, 64(8):711-3.

El Oudni H., 2012. Evaluation de l'efficacité d'extraits du chêne-liège (*Quercus suber*) in vitro sur trois moisissures des pommes après récolte : *B. cinerea*, *A. alternata* et *P. expansum* (Thèse), FSR, Université Mohammed V, Rabat.

El Saied Azab A., 2014. Nephro-protective effects of curcumin, rosemary, and propolis against gentamicin-induced toxicity in Guinea pigs: morphological and biochemical study. *Am J Clin Exp Med.*;2:28.

Enjuanes L., Sola I., Almazan F., Ortego J., Izeta A., Gonzalez J.M., Alonso S., Sanchez J.M., Escors D., Calvo E., Riquelme C., Sanchez C., 2001. Coronavirus derived expression systems. *J Biotechnol* ; 88 :183-204.

Escalón S. Researchers step up the fight against Covid-19. 2021. <https://lejournel.cnrs.fr/articles/traitements-contre-le-covid-19-les-scientifiques-affutent-leurs-armes/> (Accessed 25/07/2021).

Etame Loe G., Yinyang J., Okalla Ebongue C., Makondo Bv. , Ngaba Gp. , Mpondo Mpondo E., Dibong Sd., 2018. Étude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn, *J. Appl. Biosci.*, vol 120 (2017).

- Fabiani G. et Christof A., 2002. Mémoires de la lavande. Barbentane, Edit. Equinoxe, 131 pages.
- FAO, Organization Food and Agriculture, of the U. N. TURMERIC : Post-Harvest Operations; 2004.
- Fennane M., Ibn Tattou M., 2009. Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. Palerme: Herbarium Mediterraneum Panormitanum.
- Ferenci P., Scherzer T.M., Kerschner H., Rutter K., Beinhardt S., H. Hofer, Schöniger-Hekele M., Holzmann H., Steindl-Munda P., 2008. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy, *Gastroenterology*, 135 (5), pp. 1561-1567.
- Fernandes A., Sousa A., Mateus N., Cabral M., De Freitas V., 2011. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC-DAD/ESI-MS, *Food Chemistry*, vol 125, p1398-1405.
- Fernández LF., Palomino OM., Frutos G., 2014. Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. *J Ethnopharmacol* ;151: 509–16.
- Ferreira T., Moreira C., Cária N., Victoriano G., Silva Jr W., Magalhães, 2014. J. Phytotherapy: An Introduction To Its History, Use And Application. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2014, 16, 290–298.
- Fiore C., Eisenhut M., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D., Bielenberg J., 2008. Antiviral effects of *Glycyrrhiza* species, *Phytother Res.* : PT, 22 (2), pp. 141-148.
- Fournier P., 1999. Les Plantes médicinales. Collection Agronomie, Médecine. (Réédition) Lechevalier. Paris.
- François-Xavier W., 2009. Salmonella : Epidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue francophone des laboratoires*, Supplément au N° 409, 25-35.
- Frattani FS., Assafim M., Casanova LM., de Souza JE., Chaves DSA., Zingali RB., 2021. Oral treatment with a chemically characterized parsley (*Petroselinum crispum* var. neapolitanum Danert) aqueous extract reduces thrombiformalion in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* Volume 11, Issue 3, Pages 287-291.
- Frazier JM., 1999. Critères scientifiques de validation d'essais in vitro. Document préparé pour l'OCDE.
- Freeman T. and Swartz TH., 2020. Targeting the NLRP3 Inflammasome in severe COVID-19. *Front. Immunol.* 2020, 11, 1518.
- Gachet C., 2013. Les mécanismes moléculaires de l'activation, *Bull. Acad. Natle Méd.*, 197, no 2, 361-373.
- Gangarapu K., Karthik L., Shree Devi MS., Sathiyarajeswaran P., Kanakavalli K., Kumar KM., Ramesh Kumar D., 2022. In silico computational screening of Kabasura Kudineer – Official Siddha Formulation and Jacom against SARS-CoV-2 spike protein, *J Ayurveda Intgr Med.*

Ghanbari H., Saghravanian N., Zakery M., Mahdavi S. N., Baradaran N. E., Zareian J. M. & Parsaei H., 2008. Histological evaluation of Curcuma longa-ghee formulation and hyaluronic acid on gingival healing in dog. Journal of Ethno pharmacology 120: 335-341.

Ghanmi M, Aafi A, Satrani B, Aberchane M, Ismaili M.R, AL-Abed A, 2009. Diversité et valorisation des principales plantes aromatiques et médicinales (PAM) de l'écosystème cédraie au Maroc, Annales de la Recherche forestière au Maroc, vol 2009, Issue 41, p190-207.

Ghildiyal R., Prakash V., Chaudhary V.K., Gupta V., Gabrani R., 2020. Phytochemicals as Antiviral Agents: Recent Updates, In: Swamy M., editor. Plant-Derived Bioactives. Springer; Singapore.

The Global Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS). 2021. US Vaccine Adverse Events Reporting System (VAERS) as of June 11 2021, this is in the updated guidance from GACVS.

Goncalves F., Correia P., Silva S.P., Almeida-Aguiar C., 2016. Evaluation Of Antimicrobial Properties Of Cork. FEMS Microbiol. Lett. 2016, 363, Fnv231.

Gow N.A.R., Veerdonk, F.L., Van De Brown A.J.P., and Netea M.G., 2011. Candida albicans morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. Nature 10, 112-122.

Guillon Y., 2012. Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre Lavandula : aspects évolutifs et physiologiques, Thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie végétale. Saint-Etienne-Jean. 2012, 253p.

Guliyev V.B, Gul M. and Yildirim A., 2004. Hippophae rhamnoides L. : Chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. Journal of chromatography B, 812(1-2), 291-307.

Gullon B., Lù-Chau T.A., Moreira MT., Lema JM., Eibes G., 2017. Trends in Food Science & Technology, vol 67, pages 220-235.

Güllüce, M.; Adıgüzel, A.; Ögütçü, H.; Şengül, M.; Karaman, I.; Şahin, F., 2004. Antimicrobial Effects Of Quercus Ilex L. Extract. Phytother. Res. Int. J. Devoted Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv., 18, 208–211.

Guo L and Rondina MT., 2019. The era of thromboinflammation: platelets are dynamic sensors and effector cells during infectious diseases, Front Immunol. 10:2204.

Halim I., El Kadioui F., Soussi Abdallaoui M., 2013. Les onychomycoses à Casablanca (Maroc). Journal of medical mycology, vol 23 – N°1, p 9-14, mars 2013.

Hamliche V, Merad R, Azzouz M., 2013. Plantes Toxiques à Usage Médicinal du Pourtour Méditerranéen. SpringerVerlag: Paris, France.

Hammoudi A., 2002. Suberaie et biodiversité du paysage. Colloque Vivexpo, Inst. Médit. Du liège, France.

Harper M.T. and Poole AW., 2010. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. J Thromb Haemost 8(3): 454-462.

- Hassikou R., Oulladi H., Arahou M., 2014. Activité antimycosique des extraits du chêne-liège *Quercus suber* sur *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans*. *Phytothérapie* 12, 206-212.
- Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte contre la Désertification, 2017. « Le Maroc forestier – Les Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc ; Première partie : Les Principales Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc.
- Hegazy AM., Abdel-Azeem AS., Zeidan HM., Ibrahim KS., Sayed EE., 2018. Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. *Hum Exp Toxicol.* 37: 420–30.
- Hodgson E., 2004. A textbook of modern toxicology. 3th edition. USA : Wiley Interscience. pp. 525-541.
- Hoefler C., 1994. Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* L., et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques, Thèse de Doctorat (Université de Marseille).
- Hombourger C., 2010. Le Curcuma, de l'épice au médicament. Thèse Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Faculté de pharmacie. Université Henri Poincaré, Nancy 1. 222 pages.
- Hottz, E.D., Azevedo-Quintanilha GI., Palhinha L., Barreto E.A., Pão CRR., Righy C., Franco S., Souza TML., Kurtz P., Bozza FA., Bozza PT. 2020. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*, 136(11): p. 1330-1341.
- Hsieh CL., Peng CH., Chyau CC., Lin YC., Wang HE., Peng RY., 2007. Low-density lipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosemarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. *J Agric Food Chem* ; 55:2884–91.
- Hui DS., Azhar EI., Madani TA, Ntoumi F., Kock R., Dar O., Ippolito G., McHugh T., Memish ZA., Drosten C., Zumla A., Petersen E., 2020. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 Novel coronavirus outbreak in Wuhan, China.”, *International journal of infectious diseases*, vol. 91: 264-266.
- Hurtel J. M., 2007. Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles. *Art. Revue NAFAS. Edition de santé.* 5(1): 3-26.
- Huang, C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Yi H., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223): p. 497-506.
- Irfan M ., Lee Y., Lee KJ., Kim SD., Rhee MH., 2022. Comparative antiplatelet and antithrombotic effects of red ginseng and fermented red ginseng extracts. *Journal of Ginseng Research*, Volume 46, Issue 3, May 2022, Pages 387-395.
- Jacobsen I.D., Niemiec M.J., Kapitan M., Polke M., 2021. *Encyclopedia of Mycology*, Volume 1, 2021, Pages 507-525.
- Jilani G. & Saxena R. C., 1990. Repellent and feeding deterrent effects of turmeric oil, sweetflag oil, neem oil and a neem-based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera: Bostrychidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 629-634.

- Joshi B., Panda S.K., Jouneghani R.S., Liu M., Parajuli N., Leyssen P., Neyts J., Luyten W., 2020. Antibacterial, antifungal, antiviral, and anthelmintic activities of medicinal plants of Nepal selected based on ethnobotanical evidence. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2020, Article ID 1043471, 14 pages.
- Jourdan JP., 2015. Curcuma et curcumine : de l'histoire aux intérêts thérapeutiques. *Sciences pharmaceutiques* (ffdumas-01517353).
- Kamou, KR., Nanga YZ., Ouattara A., Kambou SP., Gnahoué G., Calixte B., Coulibaly A., 2017. Superficial anticandidotic activity of leaves of *Combretum racemosum* P. Beauv.(combretaceae) extracts. *J. of Drug Deliv.& Ther.* 2017, 7, 53–60.
- Karimi N., Rashedi J., Mahdavi Poor B., Arabi S., Ghorbani M., Tahmasebpour N., 2017. Cytotoxic effect of rosemary extract on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 10:102–7.
- Karthik D., Viswanathan P., Anuradha CV., 2011. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* ; 58 :514–21.
- Kayashima T., Matsubara K., 2012. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Biosci Biotechnol Biochem.*76:115–9.
- Khan AU. and Gilani AH., 2009. Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx, *J. Ethnopharmacol.*, 126 (3), pp. 480-486.
- Khan T., Khan MA., Mashwani Z-u-R, Ullah N., Nadeem A., 2021. Therapeutic potential of medicinal plants against COVID-19 : The role of antiviral medicinal metabolites, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, volume 31, 101890.
- Khan, M.K., Paniwnyk, L., Hassan, S., 2019. Polyphenols As Natural Antioxidants: Sources, Extraction And Applications In Food, Cosmetics And Drugs. In *Plant Based “Green Chemistry 2.0”*; pp. 197–235.
- Khia A., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M, Quaboul B., Chaouch A., Amusant N. & Charrouf Z., 2014. Effect of provenance on the chemical and microbiological quality of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. in Morocco, *Phytothérapie* volume 12, pages341–347.
- Khurram M., Hameed A., Khan M.U., Hassan M., Ullah N., Manzoor W., Qayum A., Bilal M., Najeeb U., Khan F.A., 2012. Antibacterial potentials of *Quercus baloot* Griff. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 6 (7), p 1244-1249.
- Kim M. K., Choi G. J. & Lee H. S., 2003. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in greenhouse. *J.Agric. Food chem.* 51: 1578-1581.
- Kocaadam B. and Sanlier N., 2017. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(13): p. 2889-2895.
- Kojic E.M. and Darouiche R.O., 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clinic Microbiology Reviews.*

Kokaré C.R, Chakraborty S., Khopade AN and Mahadik KR, 2009. Biofilm : Importance and applications. Indian Journal of Biotechnology, vol 8, April 2009, pp 159-168.

Kontogianni VG., Tomic G., Nikolic I., Nerantzaki AA., Sayyad N., Stosic-Grujicic S., 2013. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. Food Chem.;136:120–9.

Koupenova, M., Milka Koupenova , Corkrey H., Vitseva O., Tanriverdi K., Somasundaran M., Liu P., Soofi S., Bhandari R., Godwin M., Parsi KM., Cousineau A., Maehr R., Wang JP., Cameron SJ., Rade J., Finberg RW., Freedman JE., 2021. SARS-CoV-2 Initiates Programmed Cell Death in Platelets. Circ Res,129(6): p. 631-646.

Kporou EK., Koffi Adou Kra M., Guede-Guina O et F., 2010. Évaluation de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber*, une rubiaceae codifiée MISCA sur *Candida glabrata*, Thérapie 65 3: 271–274.

Lahlimi-Alami, Q., Layachi, R., Hassikou, R., Benjelloun, J., Guennoun, N., Zaid, Y., Bouzroud, S., 2021. Anticandidosic Activity and Acute Toxicity of *Quercus suber* L. Bark Extracts. Preprints 2021090117 (doi: 10.20944/preprints202109.0117.v1).

Lalami A., El-Akhal F. , Ouedrhiri W. , Ouazzani Chahdi F. , Guemmouh R., Greche H., 2013. Thymus essential oils (*Thymus vulgaris* and *Thymus satureioidis*) from center of Morocco: chemical composition and antimicrobial activity. Les technologies de laboratoire, volume 8, n°31.

Lamaison JL., Petitjean-Freytet C., Carnat A., 1990. Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivative contents and antioxidant activity of medicinal Apiaceae, Boraginaceae and Lamiaceae, Annales Pharmaceutiques Françaises, 1990, 48:103–108.

Lamponi S., 2021. Activity and Their Potential Role in the Treatment of Thrombotic Disorders. Life 2021, 11(10), 1095.

Lapointe G., 2004. Notions de Toxicologie. 2nd ed. Commission de la santé et de la sécurité du travail (Québec, Canada) : 16-20.

Lau KM., Lee KM., Koon CM., Cheung CSF., Lau CP., Ho HM., Lee MYH., Au SWN., Cheng CHK., Lau CBS., Tsui SKW., Wan DCC., Waye MMY., Wong KB., Wong CK., Lam CWK., Leung PC., Fung KP., 2008. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*, J. Ethnopharmacol., 118 (1), pp. 79-85.

Lax SF, Skok K, Zechner P, Kessler H., Kaufmann N., Koelblinger C., Vander K., Bargfrieder U., Trauner M., 2021. Pulmonary Arterial Thrombosis in COVID-19 with Fatal Outcome: Results from a Prospective, Single-center, Clinicopathologic Case Series Annals of Internal Medicine, Letters.

Limami, Y., Khalki L., Zaid N., Khyatti M., El Turk J., Ammara M., Mtairag M., Oudghiri M., Naya A., Taberkant M., Zaid Y., 2021. Oxford-AstraZeneca ChAdOx1 COVID-19 Vaccine Does Not Alter Platelet Aggregation. Semin Thromb Hemost.;48:109–111.

Leplat M., 2017. Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue Provençale, Thèse d'état (Université d'Aix-Marseille, Faculté de pharmacie, 229p.

- Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D., Parisey M., Wicky P-H, Behilil S., Gaymard A., Bouscambert-Duchamp, Donati F., Le Hingrat Q., Enouf V., Houhou-Fidouh N., Valette M., Mailles A., Lucet J-Ch., Mentre F., Descamps D., Malvy D., Timsit J-F., Lina B., van-der-Werf S., Yazdanpanah Y., 2020. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series, *Lancet Infect Dis*, vol 20.
- Lin CW., Tsai FJ., Tsai, CH., Lai CC., Wan L., Ho T Y., Hsieh CC., Chao P-DL., 2005. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds, *Antiviral Research*; 68 (1), 36–42.
- Lin LT., Hsu WC., Lin CC., 2014. Antiviral natural products and herbal medicines, *Journal of traditional and complementary medicine*, 4 (1), pp. 24-35.
- Lipipun V., Kurokawa M., Suttisri R., Taweechoitipatr P., Pramyothin P., Hattori M., Shiraki K., 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo, *Antivir. Res.*, 60 (3), pp. 175-180.
- Lonchamp E., 2002. *Curcuma domestica* V. (Zingibéracées), *Sciences pharmaceutiques*, dumas-01398325.
- López-Martínez R., 2010. Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 178-184.
- Mahady GB., Pendland SL., Stoia A., Hamill FA., Fabricant D., Dietz BM., Chadwick LR., 2005. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders, *Phytother Res*; 19(11) :988-91.
- Luyen LH, Thom VT, Huong LT, Huong DT, Anh NT, 2020. Inhibitory effect on human platelet aggregation, antioxidant activity, and phytochemicals of *Canna warszewiczii* (A. Dietr) Nb. tanaka. *Phcog Res.*;12:47-52.
- Manne BK., Denorme F., Middleton EA., Portier I., Rowley JW., Stubben C., Petrey AC., Tolley ND., Guo L., Cody M., Weyrich AS., Yost CC., Rondina MT., Campbell RA., 2020.
- Platelet gene expression and function in patients with COVID-19 ; *blood®* volume 136, number 11.
- Mekonnen A., Tesfaye S., Christos SG., Dires K., Zegeye N., Shiferaw Y., Lukelal E., 2019. Evaluation of skin irritation and acute and subacute oral toxicity of *Lavandula angustifolia* essential oils in rabbit and mice. *J Toxicol.* 2019 Jan 27;2019:5979546. doi: 10.1155/2019/5979546.
- Mendonça A., Santos H.Franco-Duarte R., Sampaio P., 2022. Fungal Infections Diagnosis – Past, Present and Future. *Res Microbiol.*;173(3).
- Mhirit et Blerot, 1999. *Le grand livre de la forêt marocaine*. Edition Pierre Mardaga, p95-96.
- Mikolo B., Etou Ossibi AW., Miamb LR., Abena AA., 2020. Evaluation des toxicités aigüe et subaigüe de l'extrait aqueux des feuilles de *Tetracera potatoria* Ex. G. Don chez les rongeurs. *Journal of animal & Plant sciences*, Vol 45(3) : 7980-7991.
- Mirzaei N.and Mirzaei A., 2013. Acute And Chronic Toxicity Of Iranian Jaft An Oak Fruit Component. *IJBPAS* 2, 610–619.

Mizar P., Arya R., Kim T., Cha S., Ryu KS., Yeo WS., Bae T., Kim DW., Park KH, Kim KK., and Lee SS., 2018. Total Synthesis of Xanthoangelol B and Its Various Fragments: Toward Inhibition of Virulence Factor Production of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (23), 10473-10487.

Moon T., Wilkinson JM. and Cavanagh HM., 2006. Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol Res.* 99(6): p. 722-8.

Mrityunjaya M., Pavithra V., Neelam R., Janhavi P., Halami PM., Ravindra PV., 2018. Immune-Boosting, Antioxidant and Anti-inflammatory Food Supplements Targeting Pathogenesis of COVID-19. *Front Immunol* 11 : 570122.

Murugappan, S., Tuluc F., Dorsam RT., Shankar H., Kunapuli SP., 2004. Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *J Biol Chem*, 2004. 279(4): p. 2360-7.

Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S., 2006. Medicinal Plants Used By Traditional Healers In Kancheepuram District Of Tamil Nadu, India. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* 2, 1–10.

Nalefski E.A. and Newton AC., 2001. Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain, *Biochemistry* 40(44): 13216-13229.

Naz S., Irshad F., Mawani Hina, 2018. *Curcuma longa* against carbon tetrachloride induced liver injury : a biochemical and histopathological experimental study, *The Professional Medical Journal*, vol 25, N° 07.

Neffati M. et Sghaier M., 2014. Développement et valorisation des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au niveau des zones désertiques de la région MENA.

Negaoui H., Grar H., Kaddouri H., Kheroua O., Saïdi D., 2022. Effet curatif du *curcuma longa* après induction d'inflammation chez la souris Balb/c. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, vol 36, Issue 1, Supplément, page 574.

Nobile, CJ., Schneider, H.A., Nett J.E, Sheppard D.C., Filler S.G, Andes D.R, and Mitchell AP., 2015. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* 18, 1017-1024.

Nolkemper S., Reichling J., Stintzing FC., Carle R., Schnitzler P., 2006. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med.*;72:1378–82.

OCDE (2018), Essai n° 413 : Toxicité subchronique par inhalation : 90 jours, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070813-fr>. (s.d.).

OCDE (2018), Essai n° 452 : Études de toxicité chronique, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071216-fr>. (s.d.).

OCDE, 2002. Essai n° 423 : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071018-fr>. (s.d.).

OCDE, 2008. Essai n° 407 : Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070691-fr>. (s.d.).

Ogbole OO., Akinleye TE., Segun PA., Faleye TC., Adeniji AJ., 2018. In vitro antiviral activity of twenty-seven medicinal plant extracts from Southwest Nigeria against three serotypes of echoviruses, *Viol. J.*, 15 (1), p. 110.

Ouédraogo, S.; Belemnaba, L.; Traoré, A.; Bucher, B.; Guissou, I., 2011. Etude de la Toxicité Et Des Propriétés Pharmacologiques De l'extrait Aqueux De *Anogeissus Leiocarpus* (Dc) Guill. Et Perr (COMBRETACEAE). *Pharmacopée Médecine Tradit. Afr.*, 15.

Paniagua-Zambrana NY. et Bussmann Editors, 2020. *Ethnobotany of the Andes*, ISBN 303028932X, 1986p.

Park MY. & Mun ST., 2013. Dietary carnosic acid suppresses hepatic steatosis formation via regulation of hepatic fatty acid metabolism in high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research and Practice*, 7(4), 294.

Petersen, E., Koopmans M., Go U., Hamer DH., Petrosillo N., Castelli F., Storgaard M., Al Khalili S., Simonsen L., 2020. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis*, 20(9): p. e238-e244.

Pellegrini, D., Kawakami R., Guagliumi G., Sakamoto A., Kawai K., Gianatti A., Nasr A., Kutys R., Guo L., Cornelissen A., Faggi L., Mori M., 2021. Microthrombi as a Major Cause of Cardiac Injury in COVID-19: A Pathologic Study. *Circulation*, 2021. 143(10): p. 1031-1042.

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English ed.). Guangzhou, Guangdong Science and Technology Press, 1992..

Piccilo G., Mondati E., Moro P., 2002. Six clinical cases of *Mandragora autumnalis* poisoning: diagnosis and treatment. *Eur. J. Emerg. Med.* 9(4):342- 7.

Poissy J, Goutay J, Caplan M, Parmentier E., Duburcq T., Lassalle F., Jeanpierre E., Rauch A., Labreuche J., Susen S., 2020. Pulmonary embolism in patients with COVID-19: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation* ;142(2):184-186.

Polèse JM., 2006. *La culture des plantes aromatiques*, Editions Artemis Eds, ISBN 2844164188.

Portes E., 2008. Synthèses et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle, Thèse de Doctorat en Chimie Organique (Université Bordeaux I).

Posadas SJ., Caz V., Largo C., De la Gándara B., Matallanas B., Reglero G., 2009. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol.*;44:383–9.

Poulain D., 2013. *Candida albicans*, plasticité et pathogénie. *Rev Francoph Lab.* mars 2013; 2013(450):37-46.

Quézel P. et Médail F., 2018. *Ecologia Mediterranea*, vol 44(2)-2018.

- Qureshi S., Shah AH., Ageel AM., 1992. Toxicity studies on *Alpina galanga* and *Curcuma longa*. *Planta Med*; 58(2): 124-127.
- Radi FZ., Zekri N., Drioiche A., Zerkani H., Boutakiout A., Bouzoubaa A., Zair T., 2022. Volatile and non-volatile chemical compounds and biological power of the genus *Lavandula* : case of two Moroccan lavenders *Lavandula angustifolia* and *Lavandula pedunculata*, Egypt. *J. Chem.* Vol 65, N° 3 pp273-294 .
- Rapkiewicz AV., Mai X., Carsons S., 2020. Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series. *EClinicalMedicine*, 2020. 24: p. 100434.
- Ramadan KS., Khalil OA., Danial EN., Alnahdi HS., Ayaz NO., 2013. Hypoglycemic and hepatoprotective activity of *Rosmarinus officinalis* extract in diabetic rats. *J Physiol Biochem.*; 69:779–83.
- Regnault-Roger, C.; Philogène, B.J.; Vincent, C., 2002. *Biopesticides D'origine Végétale*; Editions Tec & Doc; ISBN 2-7430-0527-0.
- Rejdali M., 1996. La flore du Maroc : Etat actuel et perspectives de conservation. *Diversité biologique et valorisation des plantes médicinales*. Actes Edition, 17-22.
- Rensen E., Pietropaoli S., Mueller F., Weber C., Souquere S., Sommer S., Isnard P., Rabant M., Gibier J-B., Terzi F., Simon-Loriere E., Rameix-Welti M-A., Pierron G., Barba-Spaeth G., Zimmer C., 2022. Sensitive visualization of SARS-CoV-2 RNA with CoronaFISH. *Life science alliance*; 5(4).
- Rhalem N, Khattabi A, Soulaymani A, Ouammi L. and Soulaymani-Bencheikh R., 2010. Étude rétrospective des intoxications par les plantes au Maroc: Expérience du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (1980- 2008). *Toxicologie Maroc* 5: 5-8.
- Ribeiro-Santos R., Carvalho D., Cavaleiro C., Albuquerque TG., Castilho C., Ramos F., Melo NR., Sanches-Silva A., 2015. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*. 45(2): p. 355-368.
- Richet H., Andremont A., Roux P., Dechamp C., Esnault Y., 2002. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 405-412.
- Rigopoulos D., Katsiboulas V., Koumantaki E., Emmanouil P., 1998. Epidemiology of onychomycosis in southern Greece, *International Journal of Dermatology* 37, n° 12 (décembre 1998): 925-928.
- Rubon C., 2005. Intérêt des résultats pré-cliniques dans l'information des prescripteurs en médecine humaine : l'exemple de la prévention de l'ostéoporose. Thèse de doctorat d'état (Université Paul-Sabatier de Toulouse).
- Ruhnke M., 2006. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non- *Candida albicans* yeasts. *Current Drug Targets*, 7(4), 495-504.
- Ryan, K.J. and Ray, C.G., 2004. *Candida*, *Aspergillus*, and Other Opportunistic Fungi. *Sherris Medical Microbiology* 4th ed., pp. 659-668.

Ryu YB., Jeong HJ., Kim JH., Kim YM., Park JY., Kim D., Naguyen TTH., Park SJ., Chang JS, Park KH., Rho MC., Lee WS., 2010. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CLpro inhibition, *Bioorg. Med. Chem.*, 18 (22), pp. 7940-7947.

Salehi B., Kumar N.V.A., Sener B., Sharifi R., Kilic M., Mahady GB., Vlaisavljevic S., Iriti M., Kobarfard F., Setzer WN., Ayatollahi SA., Ata A., Sharifi J., 2018. Medicinal plants used in the treatment of human immunodeficiency virus, *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (5).

Salokhe SS., Kolhe SU., Tembhurne SV., Hanmghar D., 2020. 28 days repeated oral toxicity study of *Rosmarinus officinalis* in Wistar rats. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 10(6) : 67-74.

Sanchez-Camargo AdP and Herrero M., 2017. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient : recent scientific evidence, *Current Opinion in Food Science*, volume 14, pages 13-19.

Sankhadip Bose, Rana Datta, and Ward G. Kirlin, 2021. Toxicity Studies Related to Medicinal Plants, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2021 S. C. Mandal et al. (eds.), Evidence Based Validation of Traditional Medicines.

Sarwar, R.; Farooq, U.; Khan, A.; Naz, S.; Khan, S.; Khan, A.; Rauf, A.; Bahadar, H.; Uddin, R., 2015. Evaluation Of Antioxidant, Free Radical Scavenging, And Antimicrobial Activity Of *Quercus Incana* Roxb. *Front. Pharmacol.*, 6, 277.

Satoh,T, Trudler D., Oh C-K. and Lipton SA., 2022. Potential Therapeutic Use of the Rosemary Diterpene Carnosic Acid for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Long-COVID through NRF2 Activation to Counteract the NLRP3 Inflammasome. *Antioxidants*, 11, 124.

Schechtman D. and Mochly-Rosen D., 2001. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction, *Oncogene* 20(44): 6339-6347.

Scherrer, A.M.; Motti, R.; Weckerle, C.S., 2005. Traditional Plant Use In The Areas Of Monte Vesole And Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *J. Ethnopharmacol.* 10; 97(1):129-43.

Schorderet, M., 1998. Des Concepts Fondamentaux Aux Applications Thérapeutiques. Ed. Frison-Rocheparis Slatkine Genève, 569–589.

Sellam A. et Whiteway M., 2016. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. *Research* 2016, 5:2582.

Sen-Crowe B., Sutherland M., McKenney M., Elkbuli A., 2021. A closer look into global hospital beds capacity and resource shortages during the COVID-19 pandemic, *J Surg Res.* 260:56-63.

Sener B., 2020. Antiviral Activity of Natural Products and Herbal Extracts *Gazi Medical Journal* 31(3):474-7.

Senhaji O., Faïd M., Elyachioui M., Dehhaoui M., 2005. Antifungal activity of different cinnamon extracts. *Mycologie médicale, Elsevier*.

Seo S.G., Ahn YJ., Jin MH., Kang NG., Cho HS, 2021. Curcuma longa enhances IFN-gamma secretion by natural killer cells through cytokines secreted from macrophages, J Food Sci. 86(8): p. 3492-3504.

Serrano JJ., 1990. Toxicopharmacologie expérimentale des plantes médicinales. Actes du 1er colloque européen d'ethnopharmacologie. Office de la recherche scientifique d'outre-mer (ORSTOM). pp. 210-218.

Sharma S. and Kumari A., 2018. Protective of curcuma longa administration on lung of mice exposed to cadmium. Asian Journal of pharmaceutical and Clinical Research 11(10):536-540.

Shin HB., Choi MS., Ryu B., Lee NR., Kim HI, Choi HE., Chang J., Lee KT., Jang DS., Inn KS, 2013. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus, Virol. J., 10 (1), p. 303.

Sijelmassi A., 2011. Les plantes médicinales du Maroc. 8ème édition du Fennec, p 93.

Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D., Azeredo J., 2012. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):288-305.

Simeon JO., Tosin JO., Zubairu SA., Daniel MF., 2022. Toxicological evaluation of Lavandula stoechas on heart and blood of wistar rat. International Journal of Advances in Engineering and Management, vol 4, Issue 4, pp :1233- 1241.

Singh S., Sankar B., Rajesh S., Sahoo K., Subudhi E. & Nayak S., 2011. Chemical Composition of Turmeric Oil (Curcuma longa L. cv. Roma) and its Antimicrobial Activity against Eye Infecting Pathogens. Journal of Essential Oil Research, 23: 11-18.

Sinkovic A., Suran D., Lokar L., Fliser E., Skerget M., Novak Z., 2011. Rosemary extracts improve flow-mediated dilatation of the brachial artery and plasma PAI-1 activity in healthy young volunteers. Phytother Res., 25:402–7.

Sofowora A., 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Editions Karthala (Académie Suisse des Sciences Naturelles).

Söhretoglu, D., Ekizoglu, M., Kiliç, E., Sakar, M.K., 2007. Antibacterial And Antifungal Activities Of Some Quercus Species Growing In Turkey. FABAD J. Pharm. Sci., 32, 127.

Şöhretoğlu, D. and Renda, G. The Polyphenolic Profile Of Oak (Quercus) Species, 2020. A Phytochemical And Pharmacological Overview. Phytochem. Rev, 19, 1379–1426.

Sonia A.O. Santos., Paula C.R.O Pinto, Armando J.D. Silvestre, Carlos Pascoal Neto, 2010. Standard of ASEAN herbal medicine, Vol. 1. Jakarta, ASEAN Countries, 1993).

Stefanini L and Bergmeier W., 2016. RAP1-GTPase signaling and platelet function. J Mol Med (Berl); 94(1): 13–19.

Sun, Z.G., Li Z-N, Miao X-W., Li S., Zhu H-L., 2021. Recent Advance in Natural Products with Antiviral Activities. Mini Rev Med Chem, 2021.

Tabassum N., Hamdani M., 2014. Plants used to treat skin diseases. Pharmacogn Rev.;8:52–60.

- Tabuti J.R.S., Lye K.A. & Dhillon S.S., 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration, *J. Ethnopharmacol.* 88: 19-44.
- Talaa S., 2009. Etude ethnopharmacologique des plantes aphrodisiaques : Enquête effectuée dans la région Casablanca – Rabat durant la période entre 01/09/2008 et 30/03/2009. Thèse de médecine, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat.
- Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., 2012. Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 155-161.
- Tang W. & Eisenbrand G., 1992. Chinese Drugs of Plant Origin. Ed. Springer-Verlag, 401-415.
- Teodoro, G.R.; Ellepola, K.; Seneviratne, C.J.; Koga-Ito, C.Y., 2015. Potential Use Of Phenolic Acids As Anti-Candida Agents: A Review. *Front. Microbiol.* 6, 1420.
- Théraud M., Bédouin Y., Guoguen C. and Gangneux J., 2004. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 53(10), 1013-1018.
- Timbrell J., 2000. Principles of biochemical toxicology. Taylor et Francis. (3):1-390.
- Toldo S., Bussani R., Nuzzi V., Bonaventura A., Mauro AG., Cannatà A., Pillappa R., Sinagra G., Nana-Sinkam P., Sime P., 2020. Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. *Inflamm. Res.* 2020, 70, 7–10.
- Toninoli F. et Meglioli V., 2013. Huiles Essentielles, L'encyclopédie (Edit. JUDENA, France), ISBN 2369170093, p 37,38 et 202.
- Touati N., 2019. Activités biologiques de *Lavandula stoechas* et *Rosmarinus officinalis*. Editions Universitaires Européennes, Juillet 2019.
- Uddin M., Mustafa F., Rizvi TA., Loney T., Suwaidi HA., Al-Marzouqi AHH., Eldin AK., Alsabeeha N., Adrian TE., Stefanini C., 2020. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral genomics, epidemiology, vaccines, and therapeutic interventions. *Viruses*, 12, 526.
- Upton TM. et Jury SL., 2002. A revision of native Moroccan species of *Lavandula* L. section *Pterostoechas* Ging. (Lamiaceae), Volume 51, n°2, p. 309-327.
- Veilleux MP., 2019. Effets de fractions d'écorce de cannelle sur *Candida albicans* et les cellules épithéliales buccales. Mémoire, Université Laval, Québec.
- Vergara-Salinas, J.R.; Pérez-Jiménez, J.; Torres, J.L.; Agosin, E.; Pérez-Correa, J.R., 2012. Effects Of Temperature And Time On Polyphenolic Content And Antioxidant Activity In The Pressurized Hot Water Extraction Of Deodorized Thyme (*Thymus Vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, 60, 10920–10929.
- Veyan R., 2000. Lavandes lavandins : parfum d'histoire. Association pour la promotion des plantes à parfum aromatiques et médicinales (APPAM), 131p.
- Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., 2020. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China ; *JAMA*. 323(11):1061–1069.

Wepierre J., 1981. Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire. 2eme édition Masson Paris ; p203.

Whitehead A., Simpson C., Willcox M., Webley F., Hay AD., Butler C., Yao L., Wrixon E., Bell M., Bostock J., Little P., Griffiths G., Moore M., 2019. A study of Pelargonium sidoides root extract EPs®7630 (Kaloba®) for the treatment of acute cough due to lower respiratory tract infection in adults—study protocol for a double blind, placebo-controlled randomised feasibility trial, Pilot and Feasibility Studies, 5 (1), p 98.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data WHO monographs on selected medicinal plants, Vol. 1, 2, 3, 4. I. WHO Consultation on Selected Medicinal Plants (4th: 2005: Salerno-Paestum, Italy) World Health Organization. (ISBN 978924154705).

Wichtl M. & Anton R., 2003. Plantes thérapeutiques-Tradition, Pratique officinale, science et thérapeutique. Ed. Tec et Doc et EMI.

ZEKKOUR, M. (2008). Les risques de la phytothérapie, Monographies des plantes toxiques les plus usuelles au Maroc. Royaume Du Maroc, Université Mohamed V-Souissi, Faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat, Thèse.

Yacoub, D., Théorêt J-F., Villeneuve L., Abou-Saleh H., Mourad W., Alle BG., Merhi Y., 2006. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. J Biol Chem, 281(40): p. 30024-35.

Yang Y, Islam MS, Wang J, Li Y, Chen X, Traditional Chinese Medicine in the Treatment of Patients Infected with New Coronavirus (SARS-CoV-2), 2020. A Review and Perspective, Int J Biol Sci., 16(10): 1708-1717.

Yapar N., 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Ther Clin Risk Manag. 2014; 10: 95–105.

Zaid Y., 2016. Rôle de la PKC delta dans la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine via le récepteur GPIIb/IIIa (Thèse de doctorat, Université de Montréal).

Zaid, Y., Senhaji N., Naya A., 2015. PKCs in thrombus formation. Pathol Biol (Paris), 2015. Vol 127(11): p. 268-71.

Zaid, Y., Puhm F., Allaeyes I., Naya A., Oudghiri M ;, Khalki L., Limami Y., Zaid N., Sadki K., 2020. Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. Circ Res,1404-1418.

Zambounis A., Sytar O., Valasiadis D., Hilioti Z., 2020. Effect of photosensitisers on growth and morphology of Phytophthora citrophthora coupled with leaf bioassays in pear seedlings. Plant Protect. Sci.;56:74–82.

Zanella CA., Treichel H., Cansian RL., Roman SS., 2012. The effect of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 48, n° 3.

Zeggwagh AA, Lahlou Y, Bousliman Y. and Ousliman Y., 2013. Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fès, Maroc. Pan African Medical Journal 14(125): 1-6.

Zhang H., Penninger J.M., Li Y., Zhong N., Slutsky A.S., 2020. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.*;46(4):586–590.

Zhang S., Liu Y., Wang X., Yang L., Li H., Wang Y., Liu M., Zhao X., Xie Y., Yang Y., Zhang S., Fan Z., Dong J., Yuan Z., Ding Z., Zhang Y., Hu L., 2020. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol*, 13(1):120.

Zhu N., Zhang D., Wang M.D.W., Li X., M.D., Yang, M.S., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P, Zhan F., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019, *N Engl J Med*; 382:727-733.

Zhu W. and Filler S.G., 2010. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* 12, 273-282.

Zine El Alaoui M., Guy A., Khalki L., Limami Y., Benomar, A. Zaid N., Cherrah Y., Mekhfi H., Cadi R., Zaid Y., 2020. Current antiplatelet agents, new inhibitors and therapeutic targets,

Zufferey A, Speck ER, Machlus KR, Aslam R., Guo L., Mc Vey MJ., Kim M., Kapur R., Boilard E., Italiano JE., Semple JW., 2017. Mature murine megakaryocytes present antigen-MHC class I molecules to T cells and transfer them to platelets. *Blood Adv.*:1773-1785.

Zukervar P., Dabin G., Secchi T., Petiot-Roland A., 2011. Étude des onychomycoses en médecine de ville dans la région lyonnaise. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 21, no. 2 (juin 2011): 118– 122.

ANNEXES

Publications et communications récentes

1. Evaluation of the ethanolic extract of some medicinal plants on platelet function in COVID-19 patients

Qamar Lahlimi-Alami, Rajaa Layachi, Rachida Hassikou, Basma Aghoutane, Chaimae Rais, Jalila Benjelloun, Hamid Khamar and Younes Zaid

International Journal of Chemical and Biochemical Sciences (ISSN 2226-9614)

JCBS, 21(2022): 73-78

2. Anticandidosic Activity and Acute Toxicity of Quercus Suber L. Bark Extracts

Qamar Lahlimi-Alami, Rajaa Layachi, Rachida Hassikou, Jalila Benjelloun, Lamiae Amallah, Naima Guennoun, Younes Zaid, Sarah Bouzroud

J. Med. Chem. Sci. 2022, 5(5) 769-778

3. Aspirin use Reduces Platelet Hyperreactivity and Degranulation in COVID-19 Patients

Younes Zaid, **Qamar Lahlimi**, Loubna Khalki, Nabil Zaid, Mounia Oudghiri, Amine Cheikh, Abdallah Naya, Yahye Merhi, Fadila Guessous

Y.Z. and Q.L. contributed equally to this article

Semin Thromb Hemost. 2022 Mar 7

DOI: 10.1055/s-0042-1744281

4. Silicon- and Phosphate-Solubilizing Pseudomonas alkylphenolica PF9 Alleviate Low Phosphorus Availability Stress in Alfalfa (Medicago sativa L.)

Ahmed El Moukhtari, Nadia Lamsaadi, Omar Farssi, Aziz Oubenali, Ismail El Bzar, **Qamar Lahlimi Alami**, Zine El Abidine Triqui, Mohamed Lazali and Mohamed Farissi

Front. Agron., 02 March 2022

<https://doi.org/10.3389/fagro.2022.823396>

5. Warm stratification improves embryos development and seed germination of *Cycas revoluta*

J. Benjelloun, S. Bouzroud (*) , Z.E. Triqui, **Q. Lahlimi Alami**, R. Layachi, A. Smouni, A. Guedira

Adv. Hort. Sci., 2021 35(1): 9196

6. Improvement of in vitro germination of *Cycas revoluta* zygotic embryos using gelrite as gelling agent

J. Benjelloun, A. Taoufyq, Z. El Abidine Triqui, **Q.L. Alami**, R. Layachi, A. Smouni, S. Bouzroud (*) , A. Guedira

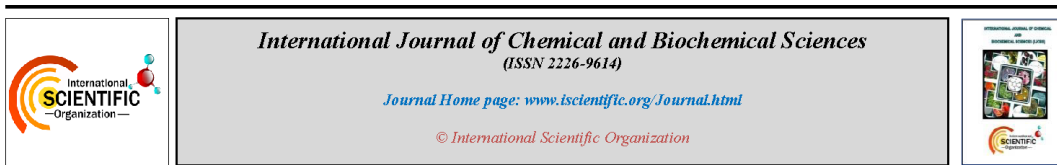
Adv. Hort. Sci., 2020 34(3): 349354

7. Multiplication in vitro par organogénèse de trois variétés marocaines de lavandin (communication orale)

Qamar Lahlimi Alami, Rajae Layachi, Jalila Benjelloun, Souad Cherkaoui, Hassan Ghazal, Meriem Mdarhri Alaoui

7ème Symposium International sur les plantes Aromatiques et Médicinales

Faculté des Sciences El Jadida - Université Chouaib Doukkali, Du 18 au 20 Avril 2019



Evaluation of the ethanolic extract of some medicinal plants on platelet function in COVID-19 patients

Qamar Lahlimi-Alami¹, Rajaa Layachi¹, Rachida Hassikou², Basma Aghoutane², Chaimae Rais³, Jalila Benjelloun¹, Hamid Khamar⁴ and Younes Zaid^{2,5,6,7*}

¹Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales, Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat, 10000 Rabat, Morocco, ²Botany Laboratory, Biology Department, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, 10000 Rabat, Morocco, ³Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques, ⁴Department of Botany and Plant Ecology, Scientific Institute, University Mohammed V, Rabat, Morocco, ⁵Immunology and Biodiversity Laboratory, Department of Biology, Faculty of Sciences, Hassan II University, 20000 Casablanca, Morocco, ⁶Research Center of Abulcasis University of Health Sciences, 10000 Rabat, Morocco and ⁷Laboratory of Materials, Nanotechnology and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

Abstract

Coronavirus disease-2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 is an ongoing viral pandemic marked by dysfunctional platelet responses resulting in increased risk of thrombotic events. Indeed, platelet hyper-reactivity has been shown to be common in COVID-19 patients. The antiviral effect of a few natural products has been documented by several studies, but none have focus on their effect on platelet function in COVID-19 patients. The aim of this work was to evaluate *in vitro* the effect of some medicinal plants on platelet activation and aggregation in COVID-19 patients and the possible mechanism. Platelet hyper-reactivity was assessed by measurements of aggregation and translocation/phosphorylation of PKC δ on Tyr³¹¹ following stimulation by collagen, while *C. Longa* ethanolic extract failed to inhibit platelet hyper-reactivity observed in COVID-19 patients. The present study reports that ethanolic extracts of *L. Angustifolia* and *R. Officinalis* could significantly reduce platelet response to low concentrations of collagen. These findings confirmed the link between the traditional medicinal plants used and the results of the scientific research studies. In order to explore, maximum benefits of the present study, it is suggested to conduct further scientific studies using randomized controlled trials.

Keywords: Platelets; COVID-19; *C. Longa*; *L. Angustifolia*; *R. Officinalis*; PKC delta

Full length article *Corresponding Author, e-mail: y.zaid@um5r.ac.ma

1. Introduction

The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) is an outbreak caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), still spreading and has led to unprecedented health emergency all over the world. It is characterized by an acute respiratory distress syndrome (ARDS) accompanied with clinical pathologies, including various coagulopathies that may be associated by hyper-coagulation and platelet hyper-activation [1]. Therefore, the involvement of platelet function in the pathophysiology of COVID-19 is well documented.

While vaccination campaign is underway, only few treatments showed efficacy against SARS-CoV-2 which is

probably the biggest challenge for public health systems in most countries [2].

The effective antiviral activities of natural products have been proved in different studies [3, 4]. *Curcuma Longa*, named "Kharkoum" in Morocco, a rooted plant in the ginger family, has a long history of medicinal use in different folklore and traditional medicine [5] and has become the first choice for alternative medicine due to its anti-inflammatory and antioxidant effects [6].

Recently, it has been shown that *Curcuma longa* enhances the secretion of IFN- γ , a key regulator of human immune system, suggesting its potential use as an immune-boosting functional food ingredient [7]. In Colombia, it is traditionally consumed as a circulatory stimulant and pro-thrombosis [8]. *Lavandula angustifolia* "Khouzama", a plant

found in many countries, is known for its anti-fungal, antimicrobial, and anti-protozoan qualities [9, 10]. *Rosmarinus Officinalis* L. "Azir" is a widely known species for its medicinal uses. *Rosmarinus Officinalis* L., that are largely distributed in habitats from Southern and Northern Africa, Western Asia, Anatolia and the Mediterranean basin [11]. Its leaves have significant therapeutic potential against a wide range of diseases such as diabetes mellitus, stomach disorders, respiratory and inflammatory diseases [12]. In folk medicine Rosemary is used for the prevention and the treatment of diabetes and cardiovascular diseases [13].

To the best of our knowledge, no studies have evaluated the effect of medicinal plant extracts on platelet function in COVID-19 patients.

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and a written consent form was signed by all patients included or their trusted relatives at the time of enrolment (SARCODO 2020-A01048-31A, NCT04624997). All included patients, hospitalized or not, presented a confirmed diagnosis of COVID-19, using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay on nasopharyngeal swab samples as previously described.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

Three medicinal/food plants were selected in this study known for their higher phenolics contents, antioxidant capacity and lower or inexistent toxicity. The plant species were botanically authenticated by Prof. Hamid Khamar (Department of Botany and Plant Ecology, Scientific Institute, Mohammed V University, Rabat, Morocco). The results of spectrophotometric analysis of these plant extracts are shown in Table 1. The voucher numbers of the plants are as follows: RAB112424: *Lavandula Angustifolia*, RAB112425: *Rosmarinus Officinalis* L., and RAB112426: *Curcuma Longa*.

2.2. The preparation of the plant extracts

The samples were coarsely powdered and packed into a Soxhlet column and extracted with 70% v/v ethanol in water at 75–79°C for 15 hours. The extract obtained was evaporated at 45°C. Afterwards, the ethanol extract was successively separated by a series of increasing polar solvents (hexane, ethyl acetate, butanol and distilled water) according to the method previously published [14].

2.3. Patients

The inclusion criteria included patients, hospitalized or not, presented a confirmed diagnosis of COVID-19, using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay on nasopharyngeal swab samples who were admitted to Cheikh Zaid Hospital from December 7, 2020 to March 8, 2021. The exclusion criteria included incomplete medical records.

The recruitment was approved by the Ethics Committee of Cheikh Zaid Hospital (CEFCZ/PR/2020/PR04) and complies with the Declaration of Helsinki. All participants gave their written informed consent. Table 2 describes the clinical characteristics of COVID-19 patients.

2.4. Confocal Microscopy Studies

The platelets were stimulated with collagen in the presence of ethanolic extract or its vehicle for 5 minutes at 37°C, fixed for 30 minutes with 2% (v/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline, washed twice, and allowed to immobilize on poly-L-lysine-coated coverslips overnight at 4°C. Adhered platelets were permeabilized for 20 minutes with 0.1% Triton X-100 containing 2% bovine serum albumin. The platelets were then incubated for 3h with the rabbit anti-human polyclonal anti-PKC δ antibody (Abcam) and the mouse anti-human monoclonal antibody against α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology), washed and labelled with anti-rabbit IgG Alexa-555 and anti-mouse IgG Alexa-488 secondary antibodies for 1h at room temperature. Coverslips were mounted on microscopic slides and series of fluorescent confocal images (Z-stacks) were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.5. PKC δ Phosphorylation

The platelets were stimulated with collagen in the presence of ethanolic extract or its vehicle for 5 minutes under shear conditions at 37°C. The reaction was stopped by adding the appropriate volume of 4 $\times$ Laemmli buffer. The platelet lysates were heated for 5 minutes at 95°C and then stored at -20°C for further analysis by SDS-PAGE. Proteins were resolved in 8% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% non-fat dry milk for 1 hour, washed three times with TBS/Tween (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 7.4, 0.1% Tween-20) and incubated overnight at 4°C with antibodies against phospho-PKC δ Tyr311 (Cell Signaling Technology). Following washing steps, membranes were labelled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour, washed and bound peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences).

To assess equal amounts of protein loading, membranes were stripped and blotted for total PKC δ (Cell Signaling Technology).

the addition of an appropriate concentration of collagen and recorded until trace stabilization and light transmission was measured at the time of maximum aggregation.

2.6. Platelet aggregation assay

Aggregation was monitored on an eight-channel optical aggregometer (SD Medical Innovation, Frouard, France) at 37°C under stirred conditions as previously described [15-17]. Briefly, the samples were stimulated with collagen (Chrono-Log, USA) at concentrations of 0.5 and 5 μ g/mL. The platelet aggregation was monitored following

2.7. Statistical analysis

The results are presented as mean $\pm$ SD of at least 3 independent experiments. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by a Dunnett's test for comparison against a single group. Data with $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Table 1: Phenolic content of methanolic extracts of the studied medicinal and food plants

Medicinal Plant	Total phenols (mg GAE g ⁻¹ DW)	Ortho-diphenols (mg GAE g ⁻¹ DW)	Flavonoids (mg CATE g ⁻¹ DW)	Tannins (mg ECE g ⁻¹ DW)
<i>R. Officinalis</i>	48.48 $\pm$ 0.13	133.88 $\pm$ 1.78	49.14 $\pm$ 0.83	18.10 $\pm$ 0.77
<i>C. Longa</i>	13.26 $\pm$ 1.77	39.16 $\pm$ 0.93	45.39 $\pm$ 1.06	95.27 $\pm$ 0.16
<i>L. Angustifolia</i>	41.92 $\pm$ 0.64	108.84 $\pm$ 0.67	35.72 $\pm$ 0.70	23.58 $\pm$ 0.44

Values are presented as mean $\pm$ SD (n = 3) for each phenolic group.
Values in bold represent the highest for each parameter assessed.

Table 2: Clinical characteristics of COVID-19 patients

Index	Healthy donors	COVID-19 patients	p value
N° of patients	10	10	
Female/Male	5/5	5/5	--
Age, years	50.32 $\pm$ 12.24	53 $\pm$ 16.27	0.82
Weight, kg	79.44 $\pm$ 26.82	82.67 $\pm$ 13.94	0.94
Platelet number $\times 10^9$ /L	238 $\pm$ 75.59	187.5 $\pm$ 96.61	0.21
Lymphocyte number $\times 10^9$ /L	1.19 $\pm$ 0.87	1.08 $\pm$ 0.53	0.36
ALT, U/L	20.54 $\pm$ 5.43	34.22 $\pm$ 15.48	0.01
AST, U/L	19.62 $\pm$ 4.40	36.17 $\pm$ 14.81	0.01
LDH, U/L	362.89 $\pm$ 134.37	616.30 $\pm$ 192.36	0.01
C-reactive protein, mg/L	8.39 $\pm$ 4.11	22.64 $\pm$ 12.43	0.05
D-dimers, mg/L	0.56 $\pm$ 0.38	1.46 $\pm$ 0.62	0.01

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase. Statistical analysis: unpaired Student t test was used to calculate p values. Bold numbers indicate statistical significance at ≤ 0.05

Figure 1

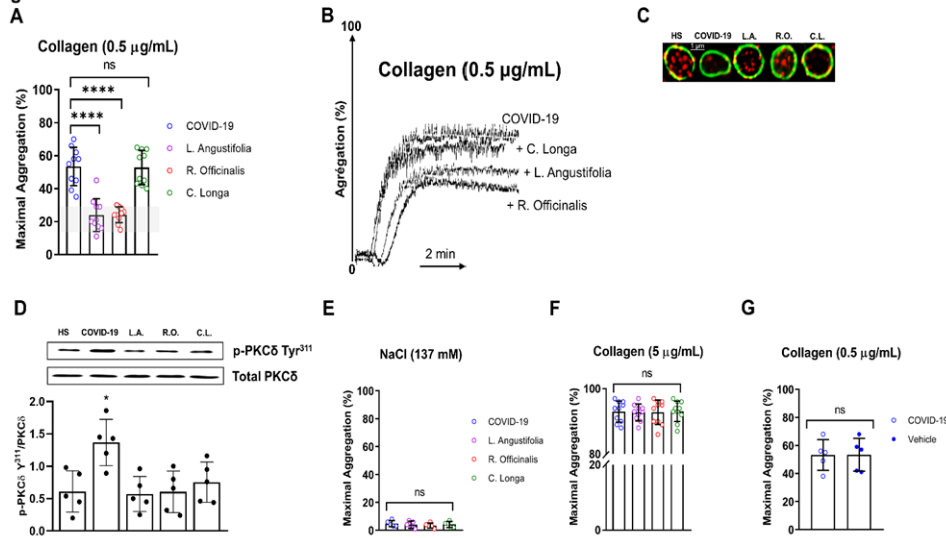


Fig. 1: *L. Angustifolia* and *R. Officinalis*-treatment reduce platelet hyper-reactivity to collagen. Platelets were isolated from Healthy Donors (n=10) and severe COVID-19 patients (n=10, blue dots). Quantification of maximal aggregation of platelets from COVID-19 patients pre-treated (or not) with ethanolic extract of *L. Angustifolia* (n=10, mauve dots), *R. Officinalis* (n=10, red dots) and *C. Longa* (n=10, green dots) for 5 min at 37°C in response to low (A) and high (F) doses of collagen. Quantification of Healthy Controls is shown as grey overlay. (B) Representative aggregation traces under continuous stirring at 37°C. (C) *L. Angustifolia* and *R. Officinalis* inhibit membrane translocation of PKCδ observed in platelets from COVID-19 patients in response to a low dose of collagen. Representative confocal microscopy images showing platelets double stained for PKCδ (red) and α-tubulin (green) taken at 63X magnification. (D) PKCδ phosphorylation on Tyr³¹¹ residue is increased in response to collagen in patients with severe COVID-19 and pretreatment of platelets with ethanolic extracts of *L. Angustifolia*, *R. Officinalis* and *C. Longa* for 5 min at 37°C. Platelet lysates were analyzed by SDS-PAGE for P-PKCδ Tyr³¹¹. Total PKCδ was evaluated in each condition. Immunoblot (upper) representative of 5 donors. Densitometric (lower) analysis of P-PKCδ Tyr³¹¹ normalized to total PKCδ was performed, data were expressed as relative Optical Density (n=5). Quantification of maximal aggregation of platelets preincubated with NaCl (n=5) (E) and complete buffer/vehicle (n=5) (G). Data are represented as mean ± SD. Statistical analysis: One-way ANOVA with subsequent Dunnett's-t-test for comparison against a single group. *P<0.05 and ****P<0.0001

3. Results & Discussion

Several study groups [18-20] including ours [15, 21, 22] have reported increased platelet activation, aggregation and platelet-leukocyte aggregates in COVID-19 compared with those in healthy blood donors. Other studies reported the presence of platelets in thrombi found in multiple organs of COVID-19 autopsy cases [23, 24] while a recent study has shown the presence of SARS-CoV-2 virions in platelets [25]. These studies demonstrate that platelet reactivity is enhanced during SARS-CoV-2 infection and posit that platelet hyper-reactivity may be a primary driver of thrombosis in patients with severe COVID-19, contributing to organ failure and death. Whether platelet hyper-reactivity can be reversed following treatment

with ethanolic extract of some medicinal plants was addressed in our study. The present study demonstrated the in vitro efficacy of *C. longa*, *L. angustifolia* and *R. officinalis* in the inhibition of platelet hyper-reactivity during SARS-CoV-2 infection.

These findings confirm that platelets from patients with COVID-19 are hyper-activated (Figure 1A) in response to a suboptimal collagen concentration (0.5 µg/mL). This phenomenon has disappeared at a higher concentration of collagen (5 µg/mL) (Figure 1F).

The platelet activation depends on signalling pathways which are regulated essentially by several isoforms of PKC family. PKC delta isoform is one of the most important members of this family since it is a key

regulator of platelet adhesion, activation, secretion and aggregation [26-29].

The present study shows that PKC delta translocates to the membrane and is phosphorylated on Tyr³¹¹ in COVID-19 patients. Pre-treatment of platelets with ethanolic extracts of *L. angustifolia* and *R. officinalis* inhibits translocation of PKC delta (Figure 1C) while pre-treatment with all three ethanolic extracts prevents its phosphorylation on Tyr³¹¹ residue (Figure 1D). No spontaneous aggregation of platelets in the presence of 137 mM NaCl was observed while the complete (the solution in which the platelets are reconstituted/vehicle) showed no effect (Figures 1E,G).

The present work shows that ethanolic extract of medicinal plants can reduce platelet hyper-reactivity observed in COVID-19 patients. These data provide an attractive and promising drug candidate for anti-SARS-CoV-2.

Author contributions

QLA, RL, RH and YZ have designed the study. QLA, RL, RH and YZ have analysed the data. BA, CR and JB performed experiments and helped with data extraction. All the listed authors have read and approved the submitted manuscript.

Funding statement

This study was funded by the Cheikh Zaid Foundation-Rabat awarded to YZ.

Ethics statement

All donors provided written consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Cheikh Zaid Hospital (CEFCZ/PR/2020/PR04)

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare that they have no competing financial interests.

Data availability

The data used in this study are included within the article.

References

- [1] Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y. and Cao, B. (2020). Clinical features of patients

- infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The lancet. 395(10223): 497-506.
- [2] Petersen, E., Koopmans, M., Go, U., Hamer, D.H., Petrosillo, N., Castelli, F. and Simonsen, L. (2020). Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. The Lancet infectious diseases. 20(9): 238-244.
- [3] Arakawa, T., Yamasaki, H., Ikeda, K., Ejima, D., Naito, T. and Koyama, A.H. (2009). Antiviral and virucidal activities of natural products. Current medicinal chemistry. 16(20): 2485-2497.
- [4] Sun, Z.G., Li, Z.N., Miao, X.W., Li, S. and Zhu, H.L. (2021). Recent Advances in Natural Products with Antiviral Activities. Mini reviews in medicinal chemistry. 21(14): 1888-1908.
- [5] Ayati, Z., Ramezani, M., Amiri, M.S., Moghadam, A.T., Rahimi, H., Abdollahzade, A. and Emami, S.A. (2019). Ethnobotany, phytochemistry and traditional uses of *Curcuma* spp. and pharmacological profile of two important species (*C. longa* and *C. zedoaria*): a review. Current Pharmaceutical Design. 25(8): 871-935.
- [6] Kocaadam, B. and Şanlıer, N. (2017). Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. Critical reviews in food science and nutrition. 57(13): 2889-2895.
- [7] Seo, S.G., Ahn, Y.J., Jin, M.H., Kang, N.G. and Cho, H.S. (2021). *Curcuma longa* enhances IFN- γ secretion by natural killer cells through cytokines secreted from macrophages. Journal of Food Science, 86(8): 3492-3504.
- [8] Bussmann, R.W., Paniagua Zambrana, N.Y., Romero, C. and Hart, R.E. (2018). Astonishing diversity—the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. Journal of ethnobiology and Ethnomedicine. 14(1): 1-47.
- [9] Cavanagh, H.M.A. and Wilkinson, J.M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. Phytotherapy research. 16(4): 301-308.
- [10] Moon, T., J.M. Wilkinson and H.M. Cavanagh. (2006). Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. Parasitological Research. 99(6): 722-8.
- [11] Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M.D., Biqiku, L., Bramucci, M., Caprioli, G. and Maggi, F. (2017). *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. Food chemistry. 218: 78-88.
- [12] Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.Ü., Ülgen, S.G. and Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. Journal of Ethnopharmacology. 116(1): 64-73.

- [13] Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Castilho, M. C. and Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Trends in Food Science and Technology. 45(2): 355-368.
- [14] Marhoume, F.Z., Aboufatima, R., Zaid, Y., Limami, Y., Duval, R.E., Laadraoui, J. and Bagri, A. (2021). Antioxidant and polyphenol-Rich ethanolic Extract of *Rubia tinctorum* L. Prevents Urolithiasis in an ethylene glycol Experimental Model in Rats. Molecules. 26(4): 1005.
- [15] Zaid, Y., Guessous, F., Puhm, F., Elhamdani, W., Chentoufi, L., Morris, A. C. and Flamand, L. (2021). Platelet reactivity to thrombin differs between patients with COVID-19 and those with ARDS unrelated to COVID-19. Blood advances. 5(3): 635-639.
- [16] Marhoume, F.Z., Laaradia, M.A., Zaid, Y., Laadraoui, J., Oufquir, S., Aboufatima, R. and Bagri, A. (2019). Anti-aggregant effect of butanolic extract of *Rubia tinctorum* L., on platelets in vitro and ex vivo.
- [17] Zaid, Y., Marhoume, F., Senhaji, N., Kojok, K., Boufous, H., Naya, A. and Bagri, A. (2016). Paraphenylene diamine exacerbates platelet aggregation and thrombus formation in response to a low dose of collagen. The Journal of Toxicological Sciences. 41(1): 123-128.
- [18] Shen, S., Zhang, J., Fang, Y., Lu, S., Wu, J., Zheng, X. and Deng, F. (2021). SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism. Journal of hematology & oncology. 14(1): 1-5.
- [19] Zhang, S., Liu, Y., Wang, X., Yang, L., Li, H., Wang, Y. and Hu, L. (2020). SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. Journal of hematology and oncology. 13(1): 1-22.
- [20] Hottz, E.D., Azevedo-Quintanilha, I.G., Palhinha, L., Teixeira, L., Barreto, E.A., Pão, C.R. and Bozza, P.T. (2020). Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. Blood. 136(11): 1330-1341.
- [21] Zaid, Y., Puhm, F., Allaey, I., Naya, A., Oudghiri, M., Khalki, L. and Boilard, E. (2020). Platelets can associate with SARS-Cov-2 RNA and are hyper-activated in COVID-19. Circulation research. 127(11): 1404-1418.
- [22] Limami, Y., Khalki, L., Zaid, N., Khyatti, M., El Turk, J., Ammara, M. and Zaid, Y. (2022). Oxford-AstraZeneca ChAdOx1 COVID-19 vaccine does not alter platelet aggregation. In Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 48(1): 109-111.
- [23] Rapkiewicz, A.V., Mai, X., Carsons, S.E., Pittaluga, S., Kleiner, D.E., Berger, J.S. and Reynolds, H.R. (2020). Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: a case series. Clinical Medicine. 24: 100434.
- [24] Pellegrini, D., Kawakami, R., Guagliumi, G., Sakamoto, A., Kawai, K., Gianatti, A. and Finn, A.V. (2021). Microthrombi as a major cause of cardiac injury in COVID-19: a pathologic study. Circulation. 143(10): 1031-1042.
- [25] Koupenova, M., Corkrey, H.A., Vitseva, O., Tanriverdi, K., Somasundaran, M., Liu, P. and Freedman, J.E. (2021). SARS-CoV-2 initiates programmed cell death in platelets. Circulation research. 129(6): 631-646.
- [26] Murugappan, S., Tuluc, F., Dorsam, R.T., Shankar, H. and Kunapuli, S.P. (2004). Differential role of protein kinase C δ isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. Journal of Biological Chemistry. 279(4): 2360-2367.
- [27] Zaid, Y., Senhaji, N., Darif, Y., Kojok, K., Oudghiri, M. and Naya, A. (2016). Distinctive roles of PKC delta isozyme in platelet function. Current Research in Translational Medicine. 64(3): 135-139.
- [28] Zaid, Y., Senhaji, N., Naya, A., Fadainia, C. and Kojok, K. (2015). PKCs in thrombus formation. Pathologie Biologie. 63(6): 268-271.
- [29] Yacoub, D., Théorêt, J.F., Villeneuve, L., Abou-Saleh, H., Mourad, W., Allen, B.G. and Merhi, Y. (2006). Essential role of protein kinase C δ in platelet signaling, α Ib β 3 activation, and thromboxane A2 release. Journal of Biological Chemistry. 281(40): 30024-30035.



Original Article

Anticandidosic Activity and Acute Toxicity of *Quercus Suber L.* Bark ExtractsQamar Lahlimi-Alami^{1,*}, Rajaa Layachi¹, Rachida Hassikou², Jalila Benjelloun¹, Lamiae Amallah², Naima Guennoun², Younes Zaid², Sarah Bouzroud¹¹Laboratory of Plant Biotechnology and Physiology, Center for Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco²Botany and Valorization of Plant Resources Team, Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment Research Center, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Article history

Received: 2022-01-23

Received in revised: 2022-02-24

Accepted: 2022-03-26

Manuscript ID: JMCS-2201-1401

Checked for Plagiarism: Yes

Language Editor:

Dr. Behrouz Jamalvandi

Editor who approved publication:

Dr. Ali H. Jawad Al-Taie

DOI:10.26655/JMCHMSCI.2022.5.11

KEY WORDS

Acute Toxicity

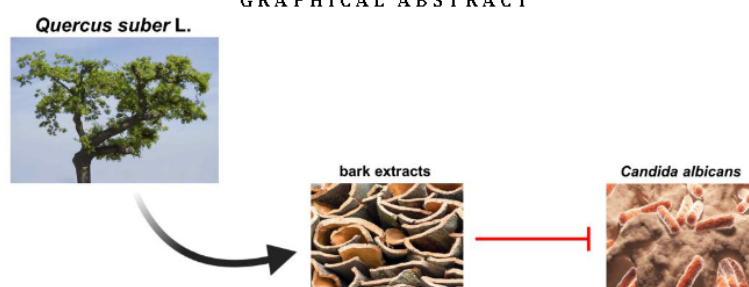
Anticandidosic

Quercus suber L.

ABSTRACT

The cork oak (*Quercus suber L.*) is commonly used in traditional pharmacopoeia. The main objective of this work is to contribute to the valorization of this plant species through the study of the anticandidosic activity of cork oak (*Quercus suber*) bark extracts stemming from decoction, maceration and Soxhlet methods of extraction. The anticandidosic potential of the elaborated extracts was tested on five different *Candida albicans* strains. Our results showed that all tested extracts tested displayed an inhibitive activity against the five strains. The study of the acute toxicity showed that the lethal dose is 1150 mg/kg in mice, which remained moderately toxic according to Hodge and Sterner classification scale. Taken together, these results underline the antifungal potential of cork oak bark extracts against *Candida albicans* strains, suggesting a prospective use of these extracts for candidiasis treatment.

GRAPHICAL ABSTRACT



* Corresponding author: Qamar Lahlimi-Alami

✉ E-mail: Email: y.zaid@um5r.ac.ma

© 2022 by SPC (Sami Publishing Company)

Introduction

Candida species are among the most common opportunistic pathogens causing fungal infections with high mortality and morbidity [1]. With nearly 150 species, *Candida* species account for many species that are endosymbionts of humans and responsible of serious superficial and invasive infections mainly in immunosuppressed hosts [2]. *Candida* genus comprises yeast pathogenic isolated from skin, mouth, intestinal tract, and vagina [1]. Over the past few decades, candidiasis incidence has substantially increased [3,4]. *Candida albicans* infection represents around 80% of candidiasis infections while the remaining 20% are mainly due to *Candida* non-*albicans* infections including *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida dubliniensis* [5].

Recently, increased resistance of *Candida* species to antifungal agents such as azoles, due to drug pressure, has been widely reported [6]. Thus, the search and identification of new alternative anticandidotic formulations is crucial to deal with *Candida* infections. Phytotherapy represents a more efficient and less toxic alternative than chemical drugs for anticandidotic treatments [7,8]. Phytotherapy focuses on the use of plant-derived substances or drugs mostly extracted from medicinal plants in disease prevention and treatment [9].

For a long time, medicinal plants have widely been used as drugs to treat several pathogens. According to the World Health Organization (WHO), around 65-80% of the world population in developing countries, mostly depend on traditional herbal medicines for their primary health care, due to poverty and lack of access to modern medicine [10]. Thus, despite the progress of pharmacology and the remarkable advances in synthetic organic chemistry of the twentieth century, more than 25% of drugs prescribed in industrialized countries come directly or indirectly from plants [11-13].

Morocco is known for the abundance and diversity of its flora that constitutes a true phyto-genetic reservoir, with approximately 4500 species and subspecies of vascular plants, of which two-thirds are endemic to Morocco. Aromatic and medicinal plants represent 8,69% and 14,28% of the total

Moroccan flora, respectively [14]. Given its large diversity of flora, Morocco occupies a distinctive place among the Mediterranean countries, having a long medical history and a traditional know-how based on medicinal plants [15].

Cork oak (*Quercus suber* L.) is an endemic species of the Mediterranean region [16]. In Morocco, Cork oak is frequently used in traditional medicines to treat many diseases. Recent studies have shown that Cork oak displays high antimicrobial activities. For instance, suberin film extracted from cork showed a bactericidal property against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains [17]. This bactericidal activity was mainly attributed to phenolic compounds [18]. Cork oak bark is rich in polyphenolic substances so it can confer great curative and preventive properties [19]. To prompt the use of natural products for medical purposes and to assess the medicinal potential of the Mâamora forest Cork oak bark, the present work aimed to study the anticandidotic activity and the acute toxicity of methanolic extracts of cork oak (*Quercus suber*) bark powder.

Materials and Methods

Plant material and the extract preparations

The bark of the stem of *Quercus suber*, belonging to the Fagaceae family, was collected from the forest of Mâamora « canton A », Rabat, Morocco. Three different extractions were made for aqueous extract (AE) and the dried powder (5g/500 mL) of the cork oak bark was decocted with distilled water while the methanolic extracts (ME_M) were prepared. On the one hand, 2 g of dried powder was macerated with 500 ml of methanol with agitation for 24 h. After filtration through Whatman paper, the residue was re-extracted in 500 ml of methanol for 24 hours; this same operation was repeated two more times (24 hours for each). On the other hand, the second methanolic extract (ME_S) was obtained by Soxhlet extraction of 100g of aerial parts for 32 h. The extracts were filtered and concentrated using a rotary evaporator to obtain a dry extract. All extracts were stored at 4°C.

For each extraction, the extraction yield (yield of extracts) was calculated using the following equation: $Y = W_e / W_i \times 100$ with Y (%): yield of

extract, We: weight of the recovered extract (mg) and Wi: initial weight of dry plant matter (mg).

Antifungal activity

Fungi tested and growth medium

Five *Candida albicans* (Robin) Berkhout strains, opportunistic fungi largely responsible for candidiasis, were tested for antifungal activity including *Candida albicans* L13 (IHEM 15835), *Candida albicans* L2 (IHEM 15824), *Candida albicans* L5 (IHEM 15827), *Candida albicans* L14 (IHEM 15836) and *Candida albicans* (L12) (IHEM 15834).

The strains were obtained from the Moroccan Coordinated Collections of Microorganisms (CCMM), Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), National Center for Scientific and Technical Research (CNRST), Morocco. The five *Candida albicans* were cultivated on Sabouraud dextrose agar at °C for hours couleur.

Candida albicans colonies count

A range of successive dilutions, going 10^{-1} to 10^{-7} , was carried out. Each dilution required a 9 ml tube of physiological water plus 1 ml of suspension of the five strains. From each dilution, a volume of 1 ml was taken and then added by the streaking technique to the surface of Sabouraud Dextrose Agar medium. Three biological replicates were performed for each dilution. The cultures are then incubated at 30°C, for 48 hours. The counting was based on the concept of CFU (Colony Forming Units). The CFU of each strain was calculated according to the following equation: $N = \frac{\sum \text{colonies}}{V (1 + 0,1 n2) \times dl}$ where: N= Number of CFU per gram or per ml, $\sum$ colonies = Sum of the colonies, V= Volume of solution deposited (1 ml), n1: Number of boxes considered at the first selected dilution; n2: Number of boxes considered at the second selected dilution and dl: Factor of the first retained dilution.

Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungistatic Concentration

Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined in sterile 96 well microplates according to CLSI protocol M27 - A3.

Briefly, overnight liquid cultures of *Candida albicans* strains grown on Sabouraud liquid medium were enumerated according to Gassaaja, (2002) [20]. A series of concentrations varying from 25 to 50 mg/mL were prepared. 200 µL of Sabouraud liquid medium and extract (1:1;v/v) was distributed in all test wells, then 10 µl of yeast suspensions was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 48 hours and the MIC was defined as the lowest concentration that prevented visible growth. Fungizone (1µg/ml) was used as a positive control.

To conclude, the Minimum Fungistatic Concentration (MFC) value, 100 (unity) of broth from the no-growth wells, was inoculated and incubated at 37°C for 24 hours. The minimum fungistatic concentration (MFC) was determined as the lowest concentration of cork oak bark extract that allow the development of yeast strain.

Acute toxicity test

Experimental animals

Balb/c type mice aged between 3 and 4 months old and weighting 20 – 30 g, obtained from the Faculty of Sciences of Rabat – Animal Physiology Lab, Morocco, were used for the study. Housed individually in cages, maintained under 12 hours' light/ dark cycle at a temperature $23 \pm 3^\circ\text{C}$ and relative humidity range of 50 - 60%, the animals were fed with standard diet and water through the whole experiments time.

Toxicity test of methanolic extract

The oral acute toxicity (LD_{50}) of methanolic extract of cork bark was evaluated in animals described above. Indeed, mice were divided into three groups (n=4 for each lot): Animals of the first group (control), which received a volume of 20 ml/mg IP of physiological water NaCl 0.9% **intraperitoneal (IP)**. The second group received a dose of 300 mg/kg of the methanolic extract of cork oak bark in a volume of 20 ml/kg IP. The mice of the third group received a dose of 2000 mg/kg of methanolic extract of *Quercus suber* in a volume of 20 ml/kg IP for 15 days.

An animal was picked at a time, weighted, and dosed with the equivalent volume of extract. The extract was administered orally using gastric feeding tube. During this period, for each group, a

number of parameters were observed including the body weight, signs of toxicity and the number of deaths. The LD50 was calculated using the method of Dragstedt and Lang (1944) [23], using the following equation:

$$LD50 = \frac{50(X2 - X1) + X1Y2 - Y1X2}{Y2 - Y1}$$

With Y1: Percentage of mortality corresponding to X1, Y2: Percentage of mortality corresponding to X2, X1: lower dose surrounding the LD and X2: higher dose surrounding the LD.

Statistical analysis

All tests were done in triplicates. Values of each experiment were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical comparisons were performed using a one-way ANOVA, followed by a Dunnett's-t-test for comparison against a single group. The statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software (Version 8).

Table 1: Cork oak bark extracts yields obtained using maceration of Soxhlet extraction techniques. The yield of each extract was expressed in percentage. Unpaired Student t-test was used to calculate P values

	Decoction (Extract 1)	Maceration (Extract 2)	Soxhlet (Extract 3)
Plant material weight (g)	5	200	100
Crude extract weight (g)	0.96	32	17.5
Extraction yield (%)	19.2	16	17.5

Antifungal activity of extracts against *Candida albicans*

Colonies enumeration was performed to determine the concentration of yeast present in the initial preparation. For this purpose, the number of colonies forming units (CFU) was determined using the dilution.

Figure 1 illustrates the CFU for the five *Candida albicans* strains. The CFU determination revealed a large variation between the different strains. For instance, we noticed that L2 and L12 strains

Differences (between groups) were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussions

Extraction yield

Quercus Suber extracts were obtained using water and methanol as solvents. As summarized in Table 1, the aqueous extract (AE) showed the highest extraction yield (19.2 %) than the methanolic extracts. A slight difference was recorded between the two methanolic extracts in term of the extraction yield. Indeed, we found that by macerating 200g of plant material in methanol, the yield of extract was by 16 %. Meanwhile, with half quantity of cork oak bark material, the yield of extract reached 17.5 %. This difference, mostly linked to the extraction method, underlined the efficiency of Soxhlet over maceration, which allowed the depletion of plant material in only few cycles, resulting in a better yield.

reached the greatest CFU number; 11.10^7 and 14.10^6 CFU/ml, respectively, followed by L14 and L13 strains, with 17.10^5 and 16.10^5 CFU/ml, respectively. However, the lowest CFU value of 8.10^4 CFU/ml was recorded in L5 strain (Figure 1). Given the fact that the five tested strains with different origins belong to the same species (*Candida albicans*) and were cultivated under the same culture conditions, the huge difference in CFU values can be attributed to the difference in the original substrate of each strain.

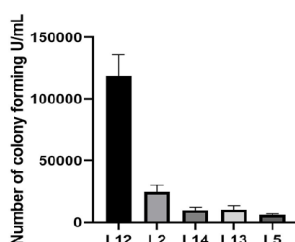


Figure 1: Colony forming units of *Candida albicans* strains isolated from fingernail (L2, L5); oral swab (L13); umbilical catheter (L12) and toenail (L14). Values are mean $\pm$ SD of three biological replicates

The antifungal activities of extracts were estimated by the absence or the presence of staining at wells' level (Figure 2). Our results showed that all the tested strains are sensitive to the three different extracts with varying degrees. L14 strain, isolated from a sample of toenail, was shown to be more sensitive than the others. L2 and L5 strains from fingernail infections showed the same degree of sensitivity to AE and the ME_M. Moreover, we noticed a difference in extract efficiency depending on the dilutions of each extract and the method of extraction from which it is derived. Yet, an absence of staining was recorded at the first dilution for the five tested strains while no strain was able to develop in the

presence of highest concentrations (50 mg/ml and 25 mg/ml) for both methanolic extracts. At a concentration of 3,12 mg/ml, all the tested extracts were found to be inactive on all the studied strains while ME_S was inactive on L14 strain at a concentration of 1,56 mg/ml. Also, L12 and L13 strains from neonatal infection and from oral sample, respectively, were sensitive to both methanolic extracts. However, the AE was less efficient regarding all the tested strains. An inhibition of *Candida albicans* strains growth was recorded at the MIC 50 mg/ml for L12 strain, at 25 mg/ml for L2, L5 and L13 strains and at 12,5 mg/ml for L14 strain.

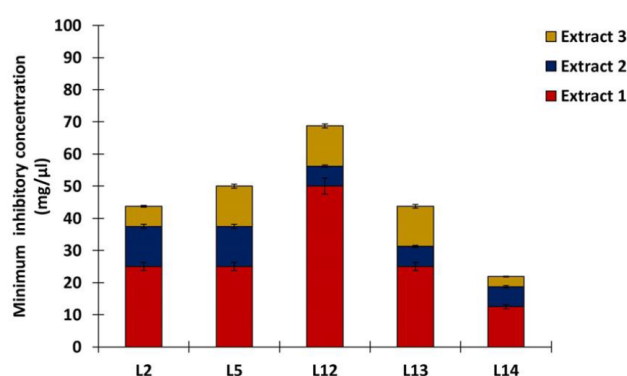


Figure 2: Minimum inhibitory concentrations MIC of the extracts of *Quercus suber* L. tested according to the five strains of *Candida albicans*. L2: Strain taken from fingernail; L13: Oral swab strain; L5: Strain take from fingernail; L12: Sample strain from umbilical catheter; L14: Toenail sample strain. Values are mean $\pm$ SD of three biological replicates

The Fungizone efficiency to inhibit *Candida albicans* growth was also tested. Our results showed that this product was not able to inhibit L13 strain growth (Table 2). However, it was more efficient on L2, L5, L12 and L14 strains, suggesting

that L13 strain was resistant to fungizone. Thus, given the fact that all the tested strains were sensitive to the three different extracts, we can conclude that these extracts can be used for *Candida albicans* treatment.

Table 2: Fungicide effect of fungizone on *Candida albicans* strains growth

	L2	L5	L12	L13	L14
Fungizone (1μg/ml)	-	-	-	+	-

L2: Strain taken from fingernail; L13: Oral swab strain; L5: Strain take from fingernail; L12: Sample strain from umbilical catheter; L14: Toenail sample strain. (+) Positive culture; (-) negative culture

The fungicide effect of extracts was evaluated for all the different extracts obtained from the three different extraction methods. The results revealed

that the methanolic extract (ME_S) obtained by Soxhlet has a fungicidal effect on all the five tested strains of *Candida albicans* at different

concentrations, and a fungistatic effect on L14 strain at 3,12 mg/ml (Table 3). The other methanolic extract (MEM) (obtained by maceration) displayed fungistatic activity on all

strains and fungicidal activity on L12 strain at 50 mg/ml. As for the aqueous extract, all five strains exhibited a MIC which it's equal to the minimum fungistatic concentration.

Table 3: Fungicidal (MFC) and fungistatic (CFS) effect of cork oak bark extracts (Aqueous and methanolic extracts) on the five strains of *C. albicans*.

	L2		L5		L12		L13		L14	
	MFC	CFS	MFC	CFS	MFC	CFS	MFC	CFS	MFC	CFS
Extract 1 (decoction)	-	25	-	25	-	50	-	25	-	12.5
Extract 2 (maceration)	-	12.5	-	12.5	50	6.25	-	6.25	-	3.12
Extract 3 (Soxhlet)	6.25	-	12.5	-	12.5	-	12.5	-	6.25	3.12

MFC: Minimum fungicidal concentration; CFS: Minimum fungistatic concentration; L2 and L5: Strains taken from the fingernail; L12: Sample strain taken from the umbilical catheter; L13: Oral swab strain; L14: Toenail sample strain

Sub-acute and acute toxicity test of the methanolic extract of cork oak bark

The sub-acute toxicity test revealed that the intraperitoneal administration of 300 mg/kg dose of methanolic extract (MEs) disturbed at short time mice behavior. Indeed, within the extract injection, a slight depression and sedation along with a decrease in mice reflex have been recorded (Table 4). Nonetheless, the animals recovered

quickly and resumed their normal habits after 5 - 10 minutes. The acute toxicity test performed with the administration of a single 2000 mg/kg dose of the same extract negatively affected mice physical activity and usual behavior. A decrease in mice mobility, sedation, breathing difficulties, loss of appetite leading to refusal to eat as well as paralysis of the hind limbs and reduced sensitivity to pain and noise were detected in treated mice.

Table 4: Clinical signs observed during the first 24 hours following the treatment application. + indicated a positive response, - indicated a negative response

	Control	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
Mice grouping after 5 minutes	+	-	-
Sedation effects after 5 minutes	-	+	+
Immobility	-	+	+
Feeding	+	+	-
Accelerated breathing	-	-	+
Hind limb paralysis	-	-	+

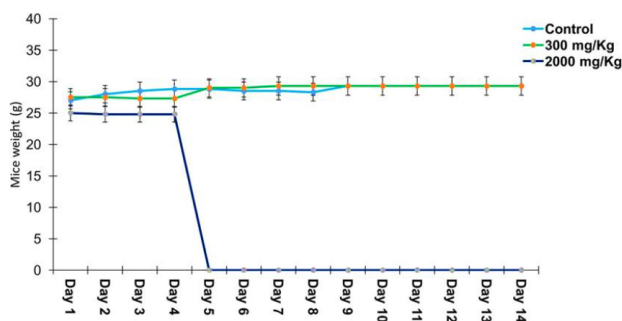


Figure 3: Weight evolution of 4 mice after injection of 300 mg/Kg and 2000 mg/Kg dose of methanolic extract of cork oak bark (*Quercus suber* L.). Values are mean $\pm$ SD of three biological replicates

The Lethal Dose 50 of the methanolic extract of cork oak bark (*Quercus suber* L.) was then calculated according to Dragstedt and Lang (1944). A linear regression was observed between the methanolic extract's doses and the lethality

percentage, as shown in Figure 4. The LD50 was estimated to be around 1150 mg/Kg, which can be slightly toxic to mice according to Hodge and Sterner Toxicity Scale.

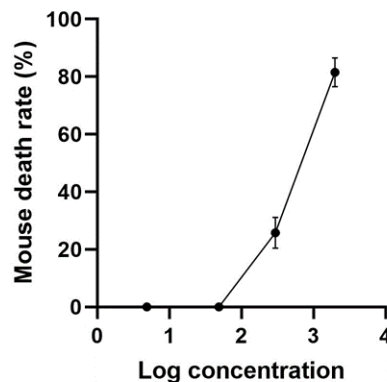


Figure 4: Acute toxicity curve of the methanolic extract of *Quercus suber* L. (obtained by Soxhlet) on mice, according to the method of Dragstedt and Lang (1944). Values are mean $\pm$ SD of three biological replicates

Candidiasis is an infection by *Candida albicans* strains that can affect intestinal walls, mouth, vagina, and skin. The current study aimed to evaluate the anticandidal effectiveness *Quercus suber* extracts. Water and methanol solvents, maceration, decoction and Soxhlet extractions techniques were used to investigate their effects on the yield and bioactive extracted compounds. Yield of extract calculation revealed that the AE obtained by decoction displayed the highest yield as compared with methanolic extracts. Similar findings were reported by Dhanini *et al.* (2017) [20]. These results may be attributed to water polarity and temperature parameters [21]. Vergara-Salinas *et al.* (2012) showed that the increment of solvent temperature improves plant particles wetting by decreasing surface tension that ultimately results in higher extraction yield [22]. The two methanolic extraction obtained by maceration and Soxhlet also showed a good extraction yield percentage. A yield of 16% and 17.6% was recorded with maceration and Soxhlet, respectively. In previous work, cork oak bark extracts were only obtained with the Soxhlet. Thus, for the first time, we were able to perform successful extraction using maceration. Moreover,

by using Soxhlet, the yield of extract was by 17.6%, which was significantly higher than that of reported by Castola *et al.* (2005) [23]. The use of Soxhlet although gave the best yield (17.6%) for a period of 32 hours and with less consumption of plant material and solvent. Extractions by maceration gave an almost similar yield, but it requires more time, more plant material and solvent. Thus, Soxhlet can be considered as more efficient compared with the maceration.

The antifungal activities study revealed that plant extracts exert an important anticandidal effect against *Candida albicans* tested with a variable degree. This inhibitory property varies depending on the extract nature and the tested strain. For instance, methanolic extracts obtained by maceration and Soxhlet displayed an inhibitory effect against *Candida* strains with a MIC reaching 6.25 and 3.12 mg/ml, respectively. Previous studies have underlined a high antimicrobial activity of cork oak against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains [24]. Akroum (2017) showed that acetone extract of the powder of *Quercus suber* has an active effect on *Candida albicans* [25]. Güllüce *et al.* (2004) reported an antimicrobial activity of methanolic extract of

Quercus ilex L. leaves against *Candida albicans* L. due to the fact the MIC (125 µg/ml) was lower than the MIC of the conventional drug (500 µg/ml) [26]. This antifungal activity against *Candida* genus was also reported with Methanolic extracts of the leaves of *Q. suber*, *Q. cerris*, *Q. pubescens* and *Q. coccifera* [27,28].

Minimum fungicidal concentrations are among various *in vitro* microbiological parameters used to determine the fungicidal activity of antimicrobial agents. The fungicidal profile of the three extracts was variable depending on the extraction method. The best fungicidal effect against the five *Candida* strains was recorded with the methanolic extract obtained by Soxhlet. This extract also displayed a great fungistatic effect on L14. The other methanolic extract (obtained by maceration) displayed a fungistatic effect on the five tested strains and a fungicidal activity against L12 strain at 50 mg/ml. The fungistatic effect of the aqueous extract and the other methanolic extract demonstrated a temporary action of these extracts on the pathogens development without eliminating them completely [29]. These differences in the fungicidal profile between the three different extracts can be due to the difference in the chemical composition of the extracts.

The acute toxicity of ME did not show any significant difference in mice weight injected with 300 mg/kg of the methanolic extract while, a significant decrease in weight was recorded in mice treated with 2000 mg/kg of methanolic extract. The lethal dose LD50 was determined based on the logarithm of Soxhlet extract doses and the percentage of lethality. This parameter was estimated to be around 1150 mg/kg in male mice when administrated intraperitoneally, which can be considered as slightly dangerous based on previous report [30]. The LD50 value in our work was lower than that advanced by Milrzaei and al, in 2013, which shows that the LD50 dose of the *Quercus suber* fruit powder aqueous extract administrated intraperitoneally to mice was clearly greater than 5000 mg/kg [31]. This difference can be linked to the plant material (part) used, which suggest that the *Quercus suber* fruit extracts are less toxic than those obtained

from the bark [32]. Also, the LD50 value of *Quercus suber* remains higher than those found in *Anogeissus leiocarpus* and *Mansonia altissima*, whose LD50s were 290,81 and 186,5 mg/kg of body weight, respectively [33].

Conclusion

This work has therefore contributed to the discovery of the antimicrobial potential of cork oak bark extracts against *Candida* genus. By exploring the antifungal activity of the aqueous and the two methanolic extracts through the determination of the MIC and the MFC, we found that the extracts displayed an anticandidosis activity against the five *Candida albicans* tested strains, which remained different depending on the method of extraction (decoction, maceration and Soxhlet) and the nature of the solvent used for the extraction (water or methanol). The Soxhlet extract proved to be the best, offering in addition to a strong anticandidosis activity even at high concentrations, a good yield in a short time and with less consumption of plant material and solvent. This process could therefore be extended at an industrial scale and can be proposed as an alternative solution to synthetic pharmaceutical products that are today against fungal infections caused by *Candida albicans*. Moreover, the identification of the active molecules of the methanolic extracts would also be promising to explain the anticandidosis activity of cork oak bark extracts. Further analysis should be conducted to identify the biologically active compounds present in the methanolic extracts of cork oak bark responsible for the anticandidosis activity that has been demonstrated in this work.

Funding

We thank Mohammed V University (awarded to QLA) for the financial support.

Authors' contributions

QLA, RL, RH, JB and NG designed the research. QLA, RL, RH, YZ and SB performed the research and statistical analyses. QLA, YZ and SB analyzed the data. All authors contributed to writing the paper.

Data Availability Statement

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Conflict of Interest

We have no conflicts of interest to disclose.

References

- [1]. Kporou E.K., Koffi M., Ouattara S., Guede-Guina F., *Th  rapie*, 2010, **65**:271 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [2]. Kamou K.R., Ouattara A., Kambou S.P., Calixte B., Coulibaly A., *J. Drug Deliv. Ther.*, 2017, **7**:53 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [3]. Chowdhary A., Sharma C., Meis J.F., *PLOS Pathog.*, 2017, **13**:1 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [4]. Lockhart S.R., Etienne K.A., Vallabhaneni S., Farooqi J., Chowdhary A., Govender N.P., Colombo A.L., Calvo B., Cuomo C.A., Desjardins C.A., Berkow E.L., Castanheira M., Magobo R.E., Jabeen K., Asghar R.J., Meis J.F., Jackson B., Chiller T., Litvintseva A.P., *Clin. Infect. Dis.*, 2017, **64**:134 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [5]. Manual M., *The Merck manual of diagnosis and therapy*. 2006 [[Google Scholar](#)]
- [6]. Arendrup M.C., Cuenca-Estrella M., Lass-Fl  rl C., Hope W.W., *Drug Resist. Updat.*, 2013, **16**:81 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [7]. Alves C.T., Ferreira I.C., Barros L., Silva S., Azeredo J., Henriques M., *Future Microbiol.*, 2014, **9**:139 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [8]. Teodoro G.R., Ellepola K., Seneviratne C.J., Koga-Ito C.Y., *Front Microbiol.*, 2015, **6**:1420 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [9]. Ferreira T.S., Moreira C.Z., C  ria N.Z., Victoriano G., Silva Jr W.F., Magalhães J.C., *Rev. Bras. Plantas Med.*, 2014, **16**:290 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [10]. Muthu C., Ayyanar M., Raja N., Ignacimuthu S., *India. J. Ethnobiol. Ethnomedicine*, 2006, **2**:1 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [11]. Rates S.M.K., *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2001, **11**:57 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [12]. CARVALHO A.N.A.C.B., Nunes D.S.G., Baratelli T.G., Shuqair NSMSAQ M.N.E., TC Amaz. 2007, **5**:26 [[Google Scholar](#)]
- [13]. Calixto J.B., *J. Ethnopharmacol.*, 2005, **100**:131. [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [14]. Hmamouchi M., 2001 [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [15]. Scherrer A.M., Motti R., Weckerle C.S., *J. Ethnopharmacol.*, 2005, **97**:129 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [16]. Silva S.P., Sabino M.A., Fernandes E.M., Correlo V.M., Boesel L.F., Reis R.L., *Int. Mater. Rev.*, 2005, **50**:345 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [17]. Garcia H., Ferreira R., Martins C., Sousa A.F., Freire C.S., Silvestre A.J., Kunz W., Rebelo L.P.N., Pereira C.S., *Biomacromolecule*, 2014, **15**:1806 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [18]. Goncalves F., Correia P., Silva S.P., Almeida-Aguiar C., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2016, **363**:231 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [19]. Burlacu E., Nisca A., Tanase C., *Forests*, 2020, **11**:904 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [20]. Dhanani T., Shah S., Gajbhiye N., Kumar S., *Arab. J. Chem.*, 2017, **10**:S1193 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [21]. Khan M.K., Paniwnyk L., Hassan S., *Plant Based "Green Chemistry 2.0"*. Springer, Singapore, 2019, 197 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [22]. Vergara-Salinas J.R., Pérez-Jiménez J., Torres J.L., Agosin E., Pérez-Correa J.R., *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**:10920 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [23]. Castola V., Marongiu B., Bighelli A., Floris C., Lai A., Casanova J., *Ind. Crops Prod.*, 2005, **21**:65 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [24]. Sarwar R., Farooq U., Khan A., Naz S., Khan S., Khan A., Rauf A., Bahadar H., Uddin R., *Front. Pharmacol.*, 2015, **6**:277 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [25]. Akroum S., *J. Mycol. Med.*, 2017, **27**:83 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [26]. Güllüce M., Adig  zel A.,   g  t   H., Seng  l M., Karaman I.,   ahin F., *Phytother. Res. Int. J. Devoted Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, 2004, **18**:208 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [27].    hreto  lu D., Renda G., *Phytochem. Rev.*, 2020, **19**:1379 [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]

- [28]. Söhretoglu D., Ekizoglu M., Kiliç E., Sakar M.K., *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2007, **32**:127 [[Google Scholar](#)], [[Publisher](#)]
- [29]. Regnault-Roger C., Philogène B.J., Vincent C., Biopesticides d'origine végétale. *Editions Tec. Doc.*, 2002 [[Google Scholar](#)]
- [30]. Diezi J., *Pharmacol. Fundam. Princ. Prat.*, 1989, 33 [[Google Scholar](#)]
- [31]. Mirzaei N., Mirzaei A., *IJBPA*, 2013, **2**:610 [[Google Scholar](#)]
- [32]. Schorderet M., *Ed Frison-RocheParis Slatkine Genève*, 1998, 569 [[Google Scholar](#)]
- [33]. Ouédraogo S., Belemnaba L., Traoré A., Bucher B., Guissou I., *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 2011, 15 [[Google Scholar](#)]

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Qamar Lahlimi-Alami, Rajaa Layachi, Rachida Hassikou, Jalila Benjelloun, Lamiae Amallah, Naima Guennoun, Younes Zaid, Sarah Bouzroud. Anticandidotic Activity and Acute Toxicity of *Quercus Suber L.* Bark Extracts, *J. Med. Chem. Sci.*, 2022, 5(5) 769-778
<https://doi.org/10.26655/JMCHEMSCI.2022.5.11>
 URL: http://www.jmchemsci.com/article_147295.html

Résumé

Les virus et les champignons sont, à côté des bactéries et des parasites, les microorganismes les plus souvent mis en cause dans le cas des infections et des mycoses, et leur traitement par des agents chimiques conduit régulièrement à l'apparition d'effets secondaires et à la sélection de souches résistantes. Cette situation incite les chercheurs à proposer des alternatives accessibles qui garantissent efficacité et innocuité. Le présent travail s'inscrit dans cette dynamique et vise un double objectif. Il s'agit de mettre en lumière les propriétés thérapeutiques de quatre plantes médicinales marocaines communément utilisées en médecine traditionnelle en évaluant l'activité antivirale des extraits de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* et de *Curcuma longa* L. sur l'activation plaquettaire des patients COVID-19, l'activité anticandidosique des extraits de l'écorce de *Quercus suber* L. sur la croissance de cinq souches de *Candida albicans* ainsi que la toxicité aigüe des quatre plantes testées. Les résultats ont démontré l'efficacité *in vitro* des extraits éthanoliques de *L. angustifolia*, *R. officinalis* et *C. longa* L. dans l'inhibition de l'hyperactivité plaquettaire lors d'une infection par le SARS-CoV-2 ainsi que l'effet anti-agrégant de *R. officinalis* et *L. angustifolia* inhibant ainsi la phosphorylation de la PKC δ . Concernant l'activité antifongique de l'écorce de *Quercus suber*, nos résultats montrent qu'elle varie selon la technique d'extraction et le solvant utilisés. Le meilleur effet fongicide contre les cinq souches de *Candida* a été enregistré avec l'extrait méthanolique obtenu par Soxhlet. Les essais de toxicité à des fins d'évaluation ont pour objectifs de déterminer les possibles effets indésirables et d'obtenir des informations pour définir le rapport exposition-réponse. Notre travail a donc mis en évidence l'innocuité des extraits de *R. officinalis*, *L. angustifolia* et *C. longa* L., *in vitro* alors que l'extrait de l'écorce de *Q. suber* L. s'est avéré modérément toxique, selon la classification admise.

Mots-clés : Activité antivirale – *Rosmarinus officinalis* – *Lavandula angustifolia* – *Curcuma longa* L. – Hyperactivation plaquettaire – COVID-19 – Activité antifongique – *Quercus suber* L. – *Candida albicans* – Toxicité aigüe

Abstract

Viruses and fungi are, as well as bacteria and parasites, the microorganisms most often implicated in the case of infections and mycoses, and their treatment with chemical agents regularly leads to the appearance of side effects and selection of resistant strains. This situation encourages researchers to propose accessible alternatives that guarantee efficacy and safety. The present work is part of this dynamic and has a double objective. It is a question of highlighting the therapeutic, antiviral and antifungal properties of four Moroccan medicinal plants commonly used in traditional medicine by evaluating the antiviral activity of extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia* and *Curcuma longa* L. on the platelet activation of COVID-19 patients, the anticandidal activity of extracts from the bark of *Quercus suber* L. on the growth of five strains of *Candida albicans* and the acute toxicity of the four plants tested. The results demonstrated the *in vitro* efficacy of ethanolic extracts of *L. angustifolia*, *R. officinalis* and *C. longa* L. in inhibiting platelet hyperactivity during SARS-CoV-2 infection as well as the anti-aggregating effect of *L. angustifolia* and *R. officinalis* thus inhibiting the phosphorylation of PKC δ . Regarding the antifungal activity of the bark of *Quercus suber*, our results show that it varies according to the extraction technique and the solvent used. The best fungicidal effect against the five strains of *Candida albicans* was recorded with the methanolic extract obtained by Soxhlet. Toxicity testing for evaluation purposes aims to determine possible adverse effects and to obtain information to define the exposure-response relationship. Our work has therefore demonstrated the safety of extracts of *R. officinalis*, *L. angustifolia* and *C. longa* L., *in vitro*, while the extract of the bark of *Q. suber* L. has proven to be slightly toxic, according to the accepted toxicity classification.

Keywords : Antiviral activity – *Rosmarinus officinalis* – *Lavandula angustifolia* – *Curcuma longa* L. – COVID-19 – Platelet hyperactivation – Antifungal activity – *Quercus suber* L. – *Candida albicans* – Acute toxicity