

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mustapha Stambouli
Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي
معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques
Laboratoire de Géo Environnement et Développement des Espaces

THESE de DOCTORAT

Spécialité: Biotechnologie Microbienne

Intitulé:

Recherche des inhibiteurs de quorum sensing de *Candida albicans* à partir des plantes médicinales locales

Présentée par: Mlle BENMESSAOUD Amel

Le 10/04/2025

Devant le jury:

Président	DJADOUNI Fatima	Prof.	Université de Mascara
Examineur	BENDAHA Mohammed El Amine	MCA	Université de Mascara
Examineur	SIDE LARBI Khadidja	MCA	Université de Mascara
Examineur	ZABOURI Younes	MCA	Université d'USTO-MB
Encadrant	YEZLI Wassim	MCA	Université de Tiaret
Co-encadrant	NAIR Samira	MCA	Université de Mascara

Année Universitaire: 2024-2025

Remerciement

Je rends grâce à Allah, qui m'a accordé le privilège de poursuivre mes études et de rencontrer des personnes d'une grande valeur, qu'il s'agisse de mes professeurs, collègues ou proches. Leur soutien, leurs connaissances et leur bienveillance ont été des sources inestimables d'inspiration et de formation tout au long de mon parcours.

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à l'ancien Vice-Recteur, Pr. **Benmeriem Khaled**, pour son soutien, notamment au début de ma formation doctorale. Son appui et ses encouragements ont été déterminants pour m'aider à avancer sereinement.*

*Une grande partie des travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de Tiaret. Mes remerciements chaleureux vont à M. **Sassi**, doyen de la faculté, pour m'avoir accordé l'accès au laboratoire et pour son soutien.*

*Je tiens également à remercier l'équipe du Laboratoire de Géo-Environnement et Développement des Espaces de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mustapha Stambouli-Mascara, dirigée par Pr. **Harizia**.*

*Je suis profondément reconnaissante envers mon directeur de thèse, M. **Yezli Wassim**, pour son encadrement précieux, sa rigueur scientifique et son soutien indéfectible qui ont guidé l'avancement de ce travail. J'exprime également ma reconnaissance envers mon ancien directeur de thèse, Pr. **Bahira Belkacem** dont les nombreux conseils et qualités humaines m'ont profondément marquée, que Dieu le protège. Mes remerciements s'étendent à ma co-directrice de thèse, Mme **Nair Samira**, pour son apport à ce travail.*

Je remercie vivement les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en évaluant ce travail :

- Pr. **Djaadouni Fatima**, Présidente, Université de Mascara,
- Dr. **Mohammed El Amine Bendaha**, Examineur, Université de Mascara,
- Dr. **Side Larbi Khadidja**, Examinatrice, Université de Mascara,
- Dr. **Zabouri Younes**, Examineur, Université USTO-MB.

*Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à Pr. **Yefsah Said** et Pr. **Houali Karim**, enseignants-chercheurs à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour leur soutien et leurs précieux conseils.*

*Mes remerciements particuliers vont à Dr. **Saadi Sidahmed**, Dr. **Bensaid Mohamed Wassini**, Dr. **Mansouri Dou Elkefel**, Dr. **Driche El Hadj**, Dr. **Selles Sidi Mohammed Ammar**, Pr. **Ait Hammou Mohamed**, Pr. **Benchohra Maamar**, Dr **Affaf Nehila** et Dr. **Ait Abderrahim Leila** pour leur contribution précieuse à ce travail. Leur expertise et leur soutien ont grandement enrichi ma recherche.*

*Je suis reconnaissante envers les techniciens du laboratoire de la faculté SNV de Tiaret Notamment **Safa Zahra**, **Smail Leila**, **Said Kadi**, **Mekki Amel**, **Semmar Fatima**, **Radouan et Madjid**, pour leur aide et leur disponibilité.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude envers tous mes amis, **Braik Hanen**, **Chokhbi Ilhem**, **Hadjab Khadidja**, **Zerrouki Samira**, **Belhziel Amel**, **Ouldrabah Sadek**, **Boudaoud Djamel**, **Bayoud Karim**, **Beldjoher Billal**, **Bensfia Djallel** et **Salah Omar**, pour leurs encouragements constants qui m'ont permis de mener à bien cette étude.*

*Mes remerciements vont également aux **doctorants** de Mascara et de Tiaret. Nos encouragements mutuels, notre esprit de collaboration et notre solidarité ont été des sources précieuses de motivation tout au long de ce parcours.*

*Je remercie sincèrement tout le personnel de la **post-graduation** pour leur disponibilité et leur accompagnement tout au long de mon parcours.*

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la bonne réalisation de cette thèse par leurs conseils, encouragements et soutien

Dédicace

À ma famille, pour leur amour, leur soutien indéfectible et leur présence constante, sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible.

À mes parents, vos sacrifices et votre amour m'ont permis de rester sur la bonne voie. Merci pour les sacrifices que vous avez endurés tout au long de mes longues années d'études. Vos conseils et votre aide resteront toujours un trésor inestimable. Recevez l'expression de mon total dévouement et de tout mon amour.

À mes sœurs, Lynda (ainsi que son mari, Saadi Samir) et Saliha, pour leur soutien infailible et leur affection.

À la mémoire de ma grand-mère, qui a marqué ma vie de sa tendresse et de sa force silencieuse. Son absence est immense, mais son amour continue de m'accompagner à chaque étape.

À tous mes cousins : Houria, Makhlouf, Houcin, Lounis, Rayan, Tarik et Belkacem, pour leur encouragement et leur présence chaleureuse.

À mes très chères tantes : Karima et Nadia, pour leur amour et leur bienveillance.

À mes oncles Mahmoud et Mustapha, pour leur soutien et leur sagesse.

Une dédicace spéciale à mon très cher Da. Hcen Ait Kaci, pour son aide précieuse tout au long de ce parcours.

À Kahina, Lamia et Yacine Ait Mohamed, pour leur aide dans le choix des plantes et leur soutien durant ma recherche.

À mes professeurs et directeurs de recherche, pour leur savoir, leurs conseils avisés et leur encadrement sans faille.

À tous mes amis et collègues, qui ont été des sources d'inspiration, d'encouragement et de soutien moral pendant ces années, et sans qui ce chemin n'aurait pas été aussi enrichissant.

Résumé

Les plantes médicinales, largement utilisées par les populations, représentent une source prometteuse de nouveaux composés bioactifs. Cette étude explore le potentiel des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* L. et de *Mentha pulegium* L. contre *Candida albicans*, en évaluant leur activité antifongique et leur impact sur les facteurs de virulence liés au quorum sensing.

Des isolats cliniques de *C. albicans*, prélevés sur des muqueuses buccales et vaginales, ont été identifiés par des méthodes phénotypiques. La capacité de formation de biofilms a été évaluée en quantifiant la biomasse et l'activité métabolique des isolats, à l'aide des techniques de coloration au violet de gentiane et de réduction des sels de tétrazolium. Les huiles essentielles ont été testées pour leurs activités antifongiques en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et antibiofilm par la méthode de microdilution. De plus, des analyses de leur interaction avec la nystatine ont été menées à l'aide de la méthode de checkerboard. Les composés actifs des huiles ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS).

Parmi les 120 isolats de *Candida* analysés, *C. albicans* était la souche prédominante (85%), suivie de *C. glabrata* (12,5%), *C. dubliniensis* (1,67%) et *C. tropicalis* (0,83%). La formation de biofilm était plus élevée chez les *Candida* non-*albicans*, avec une corrélation entre la biomasse et l'activité métabolique. L'évaluation de la sensibilité antifongique a révélé une susceptibilité des isolats au fluconazole (93,3%) et à l'amphotéricine B (79,2%). Les huiles ont montré des actions fongicides avec des CMI variant de 620 à 5000 µg/ml. *O. vulgare* a présenté la plus grande efficacité en inhibant la formation de tubes germinatifs (92%) et en réduisant significativement le taux d'adhésion cellulaire (58%). De plus, son effet sur les biofilms a été similaire, avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (MBIC_{80%}) et de concentration minimale éradicatrice (MBEC_{80%}) allant de 1250 à 2500 µg/ml et de 2500 à 10000 µg/ml, respectivement. La combinaison de la nystatine avec l'huile d'*O. vulgare* a montré une activité synergique contre les formes planctoniques et sessiles de *C. albicans*. Une investigation utilisant un microscope électronique à balayage a confirmé ces résultats. Ces données suggèrent que les huiles testées ont un potentiel thérapeutique significatif contre *C. albicans*, en agissant sur les cellules planctoniques et les biofilms, avec des effets synergiques potentiels lorsqu'elles sont combinées à la nystatine.

Mots clés : Huile essentielle, *Origanum vulgare* L., *Mentha pulegium* L., *Candida albicans*, biofilm.

Abstract

Medicinal plants, widely used by populations, represent a promising source of new bioactive compounds. This study aims to evaluate the potential of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Mentha pulegium* L. as therapeutic alternatives against *Candida albicans*, by assessing their antifungal activity and impact on virulence factors related to quorum sensing.

Clinical isolates of *C. albicans* were collected from oral and vaginal mucosae and identified using classical phenotypic methods. The biofilm formation capacity was assessed by quantifying biomass and metabolic activity of the isolates, using gentian violet staining and tetrazolium salt reduction techniques. The essential oils were tested for their antifungal effects by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) and antibiofilm activity using the microdilution method. Additionally, their interaction with nystatin was analyzed using the checkerboard method. The active compounds in the oils were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Among the 120 *Candida* isolates analyzed, *C. albicans* was the predominant strain (85%), followed by *C. glabrata* (12.5%), *C. dubliniensis* (1.67%), and *C. tropicalis* (0.83%). Non-*C. albicans* strains exhibited the highest biofilm formation capacity, significantly correlated with its metabolic activity. Antifungal susceptibility testing revealed high susceptibility of the isolates to fluconazole (93.3%) and amphotericin B (79.2%). The oils showed fungicidal activity, with MIC ranging from 620 to 5000 µg/ml. *O. vulgare* demonstrated the highest efficacy in inhibiting germ tube formation (92%) and significantly reducing cell adhesion (58%). Additionally, its effect on biofilms was similar, with minimum biofilm inhibitory concentrations (MBIC_{80%}) and minimum biofilm eradication concentrations (MBEC_{80%}) ranging from 1250 to 2500 µg/ml and from 2500 to 10000 µg/ml, respectively. The combination of nystatin with *O. vulgare* oil showed synergistic activity against both planktonic and sessile forms of *C. albicans*. Scanning electron microscopy further confirmed these results. The findings indicate that the tested oils have significant therapeutic potential against *C. albicans*, acting on both planktonic cells and biofilms, with potential synergistic effects when combined with nystatin.

Keywords: Essential oil, *Origanum vulgare*, *Mentha pulegium*, *Candida albicans*, biofilm.

الملخص

النباتات الطبية، التي تُستخدم على نطاق واسع من قبل السكان، تمثل مصدرًا واعدًا للمركبات البيولوجية النشطة الجديدة. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم إمكانات الزيوت الأساسية من *Mentha pulegium* و *Origanum vulgare* L. كبدائل علاجية ضد *Candida albicans*، من خلال تقييم نشاطها المضاد للفطريات وتأثيرها على عوامل الفوعة المرتبطة بالـ quorum sensing .

تم جمع عزلات سريرية من *C. albicans* من الأغشية المخاطية الفموية والمهبلية وتم تحديدها باستخدام الطرق التقليدية *phénotypiques*. تم تقييم قدرة تكوين الأغشية الحيوية من خلال قياس الكتلة الحيوية والنشاط الأيضي للعزلات باستخدام تقنيات تلوين Gentian violet واختزال أملاح tetrazolium. تم اختبار الزيوت الأساسية لتأثيراتها المضادة للفطريات من خلال تحديد التركيزات المثبطة الدنيا (CMI) والنشاط المضاد للأغشية الحيوية باستخدام طريقة microdilution. بالإضافة إلى ذلك، تم تحليل تفاعلاتها مع nystatine باستخدام طريقة checkerboard. تم تحديد المركبات النشطة في الزيوت باستخدام chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS).

من بين 120 عزلة من *Candida* تم تحليلها، كانت *C. albicans* هي السلالة الأكثر انتشارًا (85%)، تليها *C. glabrata* (12.5%)، *C. dubliniensis* (1.67%)، و *C. tropicalis* (0.83%). أظهرت *non Candida* أعلى قدرة على تكوين الأغشية الحيوية، وكانت مرتبطة بشكل كبير بنشاطها الأيضي. أظهر اختبار مقاومة فطريات *Candida* ضد المضادات الحيوية أن العزلات كانت تتمتع بحساسية عالية تجاه fluconazole (93.3%) و amphotericin B (79.2%). أظهرت الزيوت تأثيرات مضادة للفطريات مع قيم CMI تتراوح من 620 إلى 5000 ميكروغرام/مل. أظهر *O. vulgare* أعلى فعالية في تثبيط تكوين الأنابيب النباتية (tubes germinatifs) (92%) وتقليل الـ adhésion cellulaire بشكل كبير (58%). بالإضافة إلى ذلك، كانت تأثيراته على الأغشية الحيوية مشابهة، مع قيم تركيز المثبط الأدنى للأغشية الحيوية (MBIC₈₀) وتركيز الإزالة الأدنى للأغشية الحيوية (MBEC₈₀) تتراوح من 1250 إلى 2500 ميكروغرام/مل ومن 2500 إلى 10000 ميكروغرام/مل على التوالي. أظهر التفاعل بين nystatine و زيت *O. vulgare* نشاطًا تآزريًا ضد الأشكال planctonique والأغشية الحيوية لـ *C. albicans*. أكدت الملاحظات باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح هذه النتائج.

تشير النتائج إلى أن الزيوت التي تم اختبارها لديها إمكانات علاجية كبيرة ضد *C. albicans*، من خلال تأثيرها على كل من الخلايا الـ planctonique والأغشية الحيوية (Biofilm)، مع تأثيرات تآزرية محتملة عند دمجها مع nystatine.

الكلمات المفتاحية : زيت أساسي، *Origanum vulgare*، *Mentha pulegium*، *Candida albicans*، أغشية حيوية.

Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations	iv
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Candida albicans*

I.	<i>Candida albicans</i>	4
I.1	<i>Candida albicans</i> : Historique	4
I.2	Taxonomie	4
I.3	Caractères morphologiques et habitat	5
I.4	Les candidoses humaines.....	6
I.4.1	Facteurs favorisant la candidose	6
I.5	Epidémiologie et prévalence du genre <i>Candida</i>	7
I.5.1	Prévalence de la candidose chez les patients atteints du SIDA	8
I.5.2	Prévalence de la candidose chez les femmes enceintes	8
I.5.3	Prévalence de la candidose chez les patients diabétiques	9
I.6	Mécanismes de pathogénicité	9
I.6.1	Adhérence aux surfaces	9
I.6.2	Polymorphisme	11
I.6.3	Formation de biofilm.....	12
I.6.4	Mécanismes de régulation transcriptionnelle de la formation du biofilm	14
I.6.4.1	Architecture des biofilms.....	14
I.6.4.2	Biofilm et communication cellulaire	14
I.6.4.3	Biofilm dans la cavité buccale	15
I.6.4.4	Biofilm dans la cavité vaginale.....	16
I.7	Sécrétion d'enzymes.....	16
I.8	Diagnostic biologique.....	18
I.8.1	Examen clinique.....	18
I.8.2	Prélèvement	18
I.8.3	Examen direct	18
I.8.4	Culture	19
I.8.5	Identification de <i>Candida</i>	20

I.8.6	Identification de <i>C. albicans</i>	20
I.8.6.1	Examen macroscopique	20
I.8.6.2	Formation de tube germinatif.....	20
I.8.6.3	Formation de chlamydospores	21
I.8.6.4	Identification de <i>Candida non albicans</i>	22
I.9	Traitement.....	23
I.9.1	Les polyènes.....	23
I.9.2	Les azolés.....	24
I.9.3	La 5-fluorocytosine	25
I.9.4	Les échinocandines	25
I.9.5	Traitement alternatif.....	25

Chapitre II : Quorum sensing chez *Candida albicans*

II.	Quorum sensing chez <i>Candida albicans</i>	27
II.1	Découverte du quorum sensing.....	27
II.2	Farnésol	28
II.2.1	Effet physiologique du farnésol sur la filamentation	29
II.2.2	Effet sur la formation de biofilm.....	31
II.2.3	Effet sur le stress oxydatif	31
II.2.4	Effet sur la résistance aux médicaments.....	32
II.3	Tyrosol.....	32
II.3.1	Effet du tyrosol sur la formation des biofilms	34
II.3.2	Effet sur le stress oxydatif	34
II.3.3	Effet antimicrobien.....	34
II.4	Rôle du quorum sensing dans les infections fongiques.....	35

Chapitre III: Les plantes médicinales locales

III.	Les plantes médicinales locales	37
III.1	Les substances naturelles	37
III.2	Les plantes médicinales	37
III.2.1	Métabolites secondaires.....	38
III.2.1.1	Les polyphénols	38
III.2.1.1.1	Les flavonoïdes	39
III.2.1.1.2	Les tanins	40
III.2.1.2	Les terpénoïdes	41
III.2.1.3	Les alcaloïdes.....	42

III.2.2	Les huiles essentielles.....	43
III.2.2.1	Localisation des huiles essentielles	44
III.2.2.2	La composition chimique des huiles essentielles.....	44
III.2.2.3	Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	45
III.2.2.3.1	Entrainement à la vapeur	45
III.2.2.3.2	Hydrodistillation	45
III.2.2.3.3	Extraction par solvant.....	46
III.2.2.3.4	Extraction par fluide supercritique	46
III.2.2.3.5	Extraction assistée par micro-ondes.....	47
III.2.2.3.6	Enfleurage.....	47
III.2.2.4	Domaine d'utilisation des huiles essentielles	47
III.2.2.5	Activités biologiques des huiles essentielles	48
III.2.2.5.1	Activité antibactérienne	48
III.2.2.5.2	Activité antifongique	49
III.2.2.5.3	Activité anti-inflammatoire.....	50
III.2.2.5.4	Activité antioxydante	50
III.2.2.6	Action toxique.....	51
III.3	Monographie des plantes choisies.....	51
III.3.1	<i>Origanum vulgare</i> L.....	51
III.3.1.1	Origine et aspect botanique.....	51
III.3.1.2	Classification.....	52
III.3.1.3	Composition chimique.....	53
III.3.1.4	Utilisations et activité antimicrobienne	53
III.3.2	<i>Mentha pulegium</i> L.	54
III.3.2.1	Origine et aspect botanique.....	54
III.3.2.2	Classification.....	55
III.3.2.3	Composition chimique.....	56
III.3.2.4	Utilisation et activité antimicrobienne	56

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.	Matériel et méthodes	57
I.1	Objectif	57
I.2	Lieu d'étude	57

I.3	Partie I : Isolement, identification et évaluation des propriétés pathogéniques des souches de <i>Candida</i>	57
I.3.1	Isolement et identification des souches de <i>Candida</i>	57
I.3.1.1	Prélèvements	59
I.3.1.2	Examen direct	59
I.3.1.3	Examen des cultures fongiques.....	60
I.3.1.3.1	Examen macroscopique	60
I.3.1.3.2	Examen microscopique	60
I.3.1.4	Identification rapide de <i>Candida albicans</i>	60
I.3.1.4.1	Résistance à l'actidione (Cycloheximide)	60
I.3.1.4.2	Test de filamentation (blastèse)	60
I.3.1.4.3	Test de Chlamydosporulation	60
I.3.1.4.4	Identification sur milieu chromogénique.....	61
I.3.1.5	Identification des espèces de <i>Candida non albicans</i>	61
I.3.1.5.1	Assimilation des glucides	61
I.3.1.5.2	Fermentation des glucides	62
I.3.1.5.3	Test de tolérance à la température de 45°C	62
I.3.1.6	Identification moléculaire	62
I.3.1.6.1	Extraction de l'ADN	62
I.3.1.6.2	Amplification de l'ADN ribosomal (ADNr)	63
I.3.1.6.3	Electrophorèse et révélation.....	63
I.3.1.6.4	Purification et séquençage des produits de la PCR	63
I.3.2	Évaluation des propriétés pathogéniques des souches de <i>Candida</i>	64
I.3.2.1	Test de sensibilité des souches de <i>Candida</i> aux agents antifongiques.....	64
I.3.2.2	Evaluation de la capacité des souches de <i>Candida</i> à former des biofilms	64
I.3.2.2.1	Quantification des biofilms.....	65
I.4	Partie II : Étude phytochimique et activité antifongique.....	66
I.4.1	Matériel végétal.....	66
I.4.2	Extraction des huiles essentielles	67
I.4.2.1	Traitement des huiles essentielles	68
I.4.2.2	Calcul du rendement.....	68
I.4.3	Caractérisation chimique par CG/MS et CG/FID	69
I.4.4	Évaluation de l'activité antioxydante	69

I.4.4.1	Évaluation du pouvoir de réduction du fer : FRAP	69
I.4.4.2	Évaluation de l'activité anti-radicalaire par piégeage du radical DPPH	70
I.4.5	Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles	71
I.4.5.1	Aromatogramme	71
I.4.5.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrices	71
I.4.5.3	Détermination des concentrations minimales fongicides	73
I.5	Partie III : Évaluation de l'effet des huiles sur les facteurs de virulence associés au Quorum Sensing	73
I.5.1	Inhibition du tube germinatif	73
I.5.2	Effet anti-adhésion	73
I.5.3	Effet inhibiteur du biofilm	74
I.5.4	Effet éradicateur du biofilm	74
I.5.5	Synergie entre les huiles essentielles et la nystatine	75
I.5.6	Observation des biofilms au microscope électronique à balayage	76
I.6	Analyses statistiques	76

Chapitre II : Résultat et discussion

II.	Résultats et discussion	77
II.1	Partie I : Isolement des <i>Candida</i>	77
II.1.1	Examen direct	77
II.1.2	Purification et identification des espèces de <i>Candida</i>	78
II.1.2.1	Examen des cultures	78
II.1.2.1.1	Examen macroscopique	78
II.1.2.1.2	Examen microscopique	78
II.1.3	Culture sur CHROMagar <i>Candida</i> et analyse morphologique	79
II.1.4	Poursuivre l'identification des autres espèces de <i>Candida</i> non <i>albicans</i>	80
II.1.4.1	Répartition des espèces isolées de <i>Candida</i>	81
II.1.5	Identification moléculaire	82
II.1.6	Évaluation de la sensibilité antifongique des isolats de <i>Candida</i>	83
II.1.7	Évaluation de la formation des biofilms	83
II.1.7.1	Catégories des biofilms	84
II.1.7.2	Évaluation de la capacité de formation de biofilm des souches de <i>Candida</i> résistantes aux antifongiques	86
II.1.8	Discussion	86

II.1.9	Conclusion	89
II.2	Partie II : Plantes médicinales	90
II.2.1	Rendement et caractérisation organoleptique des huiles essentielles	90
II.2.2	Analyse chimique par GC-MS	90
II.2.3	Activité antioxydante	93
II.2.4	Activité antifongique	93
II.2.4.1	Aromatogramme	93
II.2.4.2	Détermination des CMI et CMF	94
II.2.5	Discussion	96
II.2.6	Conclusion	98
III.	Partie III : Évaluation de l'activité anti-Quorum Sensing.....	98
III.1	Inhibition de la formation des tubes germinatifs	98
III.2	Adhésion des cellules	100
III.3	Effet inhibiteur des biofilms	102
III.4	Effet éradicateur des biofilms	102
III.5	Effet synergique entre les huiles et la nystatine contre les formes planctoniques et sessiles de <i>C. albicans</i>	103
III.6	Observation des biofilms au microscope électronique à balayage	103
III.7	Discussion	105
III.8	Conclusion	107

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives.....	109
Reference	111
Annexe	128
Publication	

Liste des tableaux

Tableau 1: Nombres de prélèvements collectés, sexe et signes cliniques présentés par le patient.	59
Tableau 2: Catégories de formation des biofilms.....	66
Tableau 3: Caractéristiques géographiques et étage bioclimatique de la station de récolte.	67
Tableau 4: Résultats positifs et négatifs des espèces de <i>Candida</i> à partir des prélèvements. ..	77
Tableau 5: Identification des espèces de <i>Candida</i> par des tests phénotypiques.	80
Tableau 6: Distribution des espèces de <i>Candida</i> spp.	81
Tableau 7: Identification moléculaire des souches isolées de <i>C. albicans</i>	82
Tableau 8: Sensibilité antifongique <i>in vitro</i> des isolats de <i>Candida</i>	83
Tableau 9: Développement des biofilms de <i>Candida</i> spp.	84
Tableau 10: Statut de la formation de biofilm chez les espèces de <i>Candida</i> résistantes à l'amphotéricine B et au fluconazole.	86
Tableau 11: Rendement et caractères organoleptique des huiles essentielles.	90
Tableau 12: Temps de rétention et pourcentage des composés détectés.	90
Tableau 13: Activité antioxydante des huiles essentielles d' <i>O. vulgare</i> et de <i>M. pulegium</i>	93
Tableau 14: Test de sensibilité des huiles essentielles contre <i>C. albicans</i>	94
Tableau 15: Sensibilité antifongique des huiles et de la nystatine contre <i>C. albicans</i>	95
Tableau 16: Effet des huiles essentielles et la nystatine sur la formation des tubes germinatifs.	99
Tableau 17: Effet antibiofilm des huiles essentielles contre <i>C. albicans</i>	102
Tableau 18: Effet de l'interaction entre les huiles essentielles et la nystatine.....	103

Liste des figures

Figure 1: Différentes formes morphologiques de <i>C. albicans</i>	6
Figure 2: Schéma illustrant les étapes de l'infection épithéliale par <i>Candida albicans</i>	10
Figure 3: Les différentes transitions morphologiques les plus étudiées chez <i>C. albicans</i>	12
Figure 4: Schéma présentant les étapes de formation et de développement d'un biofilm	13
Figure 5: Culture de <i>Candida</i> sur milieu Chromogénique (Ann Chai et al., 2010).	20
Figure 6: Tubes germinatif de <i>C. albicans</i> suite à un test de blastèse (Bates, 2018).	21
Figure 7: Formation des chlamydospores sur milieu Rice-Meal-Tween 80 agar	22
Figure 8: Biosynthèse du farnésol à partir du pyrophosphate de farnésol.....	29
Figure 9: Les différentes voies de signalisation du farnésol chez <i>C. albicans</i> impliquées dans la formation d'hyphes (Polke et al., 2018).....	30
Figure 10: Biosynthèse du tyrosol à partir de la tyrosine	33
Figure 11 : Structures chimiques des polyphénols (Manach et al., 2004).	39
Figure 12: Structures chimiques de flavonoïdes (Manach et al., 2004).	40
Figure 13: Structures chimiques des tanins (Bennick, 2002).	41
Figure 14: Structures chimique des terpènes (Cho et al., 2017).	42
Figure 15: Structures chimiques des alcaloïdes (Aniszewski, 2007).	43
Figure 16: <i>Origanum vulgare</i> L.	52
Figure 17: <i>Mentha pulegium</i> L.....	55
Figure 18: Protocole expérimental récapitulatif d'isolement et d'identification de l'agent <i>Candida</i>	58
Figure 19: Observation directe à la surface du milieu gélosé pour le test de chlamydosporulation.	61
Figure 20: Partie aérienne du matériel végétal étudié.	66
Figure 21: Situation géographique des sites d'échantillonnage au niveau de la Wilaya de Tizi-ouzou.	67
Figure 22: Dispositif d'hydrodistillation.	68
Figure 23: Schéma de réduction du DPPH de sa forme radicalaire à sa forme non radicalaire	71
Figure 24: Schéma illustratif de la méthode de microdilution.	72
Figure 25: Examen direct des prélèvements.	77
Figure 26: Examen macroscopique des espèces de <i>Candida</i> après culture.....	78

Figure 27: Examen microscopique des espèces de <i>Candida</i> après coloration simple (G×100).	78
Figure 28: Comparaison des colonies de <i>Candida</i> sur CHROMagar et de leurs structures de tubes germinatifs et de chlamydospores observées au microscope (G×100).	79
Figure 29: Assimilation des sucres ;.....	81
Figure 30: Arbre phylogénétique des isolats de <i>C. albicans</i> généré par MEGA.	82
Figure 31: Pourcentages des catégories de biofilms formés par chaque espèce, évalués par les deux méthodes, coloration au violet de cristal (CV) et réduction du TTC.	85
Figure 32: Diamètre des zones d'inhibition des huiles essentielles vis-à-vis <i>C. albicans</i>	94
Figure 33: Détermination des CMI par la méthode de microdilution.	95
Figure 34: Formation des tubes germinatifs par <i>C. albicans</i> en présence d'huiles essentielles et de nystatine.	99
Figure 35: Inhibition de l'adhésion des souches de référence de <i>C. albicans</i> par les huiles essentielles et la nystatine.	100
Figure 36: Inhibition de l'adhésion des souches d'origine vaginale de <i>C. albicans</i> par les huiles essentielles et la nystatine.	101
Figure 37: Inhibition de l'adhésion des souches d'origine buccale de <i>C. albicans</i> par les huiles essentielles et la nystatine.	101
Figure 38: Images au microscope électronique à balayage d'un biofilm formé par <i>C. albicans</i>	105

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

AmB: Amphotéricine B

ANOVA: Analysis of variance

ATCC: American Type Culture Collection

C.: *Candida*

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMF: Concentration minimale fongicide

CMI: Concentration inhibitrice minimale

CPG/FID: Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur d'ionisation de flamme

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EC₅₀: Concentration Efficace médiane

EPS: Exopolysaccharides

FICI: Fractional Inhibition Concentration Index

FID: Détecteur à Ionisation de Flamme

FLC: Fluconazole

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

IC₅₀: Concentration inhibitrice médiane ou the half maximal inhibitory concentration

ISO: Organisation Internationale de Normalisation

ITS: Internal Transcribed Spacer

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS: Organisation Mondiale de Santé

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymérase Chain Réaction

r: Corrélation

RAT: Riz, Agar, Tween 80

Sp.: Espèces

Spp.: Plusieurs espèces

TTC: Chlorure de 2, 3, 5- triphényl-tétrazolium

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

YPD : Yeast peptone dextrose

Introduction

Introduction

Les espèces de *Candida* sont des champignons ubiquitaires présents naturellement sur les surfaces des muqueuses, notamment dans les tractus gastro-intestinal et génital des individus en bonne santé. Ces micro-organismes opportunistes peuvent passer de leur état commensal à celui de pathogène sous certaines conditions, entraînant diverses affections, surtout chez les personnes immunodéprimées. Les infections à *Candida* sont particulièrement fréquentes dans cette population, qui constitue le principal groupe à risque. Par exemple, plus de 90% des patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) développent des infections fongiques superficielles. Par ailleurs, les personnes diabétiques, dont l'hyperglycémie favorise la colonisation et la prolifération des champignons, ainsi que celles prenant des antibiotiques à large spectre, recevant une chimiothérapie ou consommant des drogues, peuvent favoriser la croissance de *Candida*, conduisant potentiellement à des infections systémiques graves, voire mortelles (Bona et *al.*, 2016 ; Mohammed et *al.*, 2017 ; Atencia-Carrera et *al.*, 2022 ; Czechowicz et *al.*, 2022).

Les infections fongiques dues à *Candida* se manifestent sous diverses formes, allant de proliférations mucocutanées superficielles non létales à des infections invasives susceptibles de toucher plusieurs organes (Lee et *al.*, 2021). L'identification précise des espèces de *Candida* est essentielle pour initier un traitement adapté et garantir une gestion optimale des candidoses. Diverses méthodologies ont été mises en œuvre pour caractériser les espèces de *Candida*, incluant des techniques phénotypiques, telles que les milieux chromogéniques et l'assimilation des glucides, ainsi que des méthodes moléculaires, comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Muadcheingka & Tantivitayakul, 2015).

Candida albicans demeure le pathogène le plus fréquent, représentant environ 70% de ces infections. Cependant, il est important de noter une augmentation de la prévalence des espèces de *Candida* non-*albicans*, telles que *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* et *C. kefyr*, observée ces dernières années dans les cas de candidose humaine (De Toledo et *al.*, 2016 ; Talapko et *al.*, 2021).

Les candidoses vaginales et orales sont les plus courantes, et près de 90% des cas de candidose orale sont causés par ces espèces. Chez les enfants, ces infections se rencontrent dans une fourchette de 22,5% à 83,3%, tant dans les pays développés que dans les pays en développement. Concernant la candidose génitale, environ 75% des femmes en ont souffert au moins une fois dans leur vie, avec un taux de récurrence estimé entre 5% et 8% (Czechowicz et

al., 2022 ; Fang et *al.*, 2021 ; Lu, 2021). Cette hausse de la prévalence des espèces isolées de *Candida* est attribuée à l'utilisation excessive d'antifongiques, qui a également conduit à des résistances dans ces espèces. De plus, l'augmentation du nombre de patients recevant une thérapie immunosuppressive a également contribué à la colonisation de diverses espèces de *Candida* et à l'apparition de différentes candidoses (Cid-Chevecich et *al.*, 2022 ; Sahal & Bilkay, 2018).

Plusieurs facteurs de virulence contribuent à la pathogénicité de *Candida*, parmi lesquels la formation de biofilms, qui constitue l'un des principaux éléments favorisant le développement et la persistance des candidoses. Ces biofilms, dotés d'une architecture tridimensionnelle complexe et composés d'une communauté morphologiquement hétérogène, offrent un environnement protecteur aux micro-organismes (Karygianni et *al.*, 2020 ; Talapko et *al.*, 2021 ; Proškovcová et *al.*, 2021). Malheureusement, ces biofilms confèrent souvent une résistance aux traitements antifongiques standards, rendant les infections subséquentes particulièrement difficiles à traiter. La régulation par des signaux de quorum sensing (QS) peut optimiser la structure et la dynamique de cette communauté tout au long du développement du biofilm. Selon Alem et *al.* (2006), *C. albicans* utilise deux molécules signal pour maintenir le biofilm: le tyrosol, qui favorise la transition des cellules de levure vers des hyphes, augmentant ainsi la sous-population hyphale nécessaire à la maturation du biofilm, et le farnésol, qui joue un rôle clé aux stades tardifs du développement du biofilm, permettant une augmentation de la population de levures. En outre, le quorum sensing joue un rôle central dans d'autres mécanismes de virulence, tels que l'adhésion cellulaire et la formation de tubes germinatifs, contribuant ainsi à l'invasion des tissus hôtes et à l'aggravation des infections.

Le traitement des infections à *Candida* repose fréquemment sur des agents antifongiques tels que les polyènes, les allylamine, les azoles, les fluoropyrimidines et les échinocandines, selon le type d'infection. Parmi ceux-ci, le fluconazole et l'amphotéricine B sont les plus couramment prescrits (Bhattacharya et *al.*, 2020 ; Borman et *al.*, 2020). Cependant, l'efficacité de ces traitements peut être compromise par leur toxicité, en particulier en raison d'effets secondaires indésirables, tels que les lésions rénales causées par l'amphotéricine B, qui ont fait l'objet de nombreuses études (Udawatte et *al.*, 2020). Les azoles, tels que le fluconazole, nécessitent souvent une administration prolongée, ce qui soulève des préoccupations concernant leur coût, leurs effets secondaires indésirables et le risque croissant de résistances (Benitez & Carver, 2019). Il est également crucial de

reconnaître les défis associés au développement de nouveaux antifongiques efficaces qui ne provoquent pas d'effets indésirables. En effet, aucune nouvelle classe d'antifongiques n'a été introduite en clinique depuis le milieu des années 2000 (Lee et *al.*, 2021).

Il est donc nécessaire de développer des stratégies visant à explorer de nouvelles alternatives pharmaceutiques. Les plantes médicinales et leurs composés bioactifs sont utilisées depuis des siècles en médecine traditionnelle pour lutter contre diverses maladies infectieuses, notamment celles causées par *C. albicans* (Bona et *al.*, 2016 ; Proškovcová et *al.*, 2021). Plusieurs extraits de plantes ont été proposés comme traitements potentiels pour les maladies microbiologiques, en particulier ceux provenant de la famille des Lamiacées, qui se caractérisent par une teneur élevée en huiles essentielles et possèdent de puissantes propriétés anti-candidoses (Brum Cleff et *al.*, 2010 ; Boukhebt et *al.*, 2011 ; Baj et *al.*, 2020). *Origanum vulgare* L. et *Mentha pulegium* L. sont parmi les plantes les plus répandues dans la région méditerranéenne, en particulier en Algérie (Meddour et *al.*, 2011 ; Miara et *al.*, 2019). Récemment, leur utilisation par les consommateurs a augmenté en raison de leur coût abordable, de leur accessibilité et de leur efficacité perçue dans le traitement des infections fongiques en comparaison avec les traitements synthétiques (Benziane et *al.*, 2023). Toutefois, il y a eu peu de recherches sur l'activité antifongique des huiles essentielles de ces deux plantes contre les souches résistantes de *C. albicans*, qui présentent un fort potentiel de formation de biofilms.

Cette étude se divise en deux parties : la première visait à identifier différentes souches cliniques de *Candida* isolées de la muqueuse orale et vaginale, à évaluer leur capacité à former des biofilms et à analyser leur sensibilité aux agents antifongiques. La deuxième partie était dédiée à l'étude des propriétés antifongiques des huiles essentielles sélectionnées. Nous avons réalisé une série de tests pour évaluer leur activité antibiofilm, leur capacité à inhiber l'adhésion cellulaire et leur effet sur la formation de tubes germinatifs, dans le but de déterminer leur potentiel en tant qu'alternatives thérapeutiques. En outre, nous avons examiné les interactions synergiques possibles entre ces huiles et un agent antifongique conventionnel, contribuant ainsi à l'élaboration de stratégies novatrices et efficaces pour lutter contre les infections à *Candida*. Nos résultats pourraient non seulement éclairer les mécanismes d'action de ces traitements naturels, mais aussi offrir des perspectives sur leur utilisation clinique dans la lutte contre les infections fongiques résistantes.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I

Candida albicans

I. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure naturellement présente dans le tractus gastro-intestinal et sur d'autres muqueuses humaines, comme la bouche et le vagin. Normalement inoffensive, elle fait partie de notre flore microbienne. Cependant, dans certaines conditions, notamment lorsque le système immunitaire est affaibli, *C. albicans* peut devenir un véritable pathogène opportuniste. Elle est principalement responsable d'infections superficielles telles que les candidoses orales et vulvovaginales, mais peut aussi causer des infections graves, voire mortelles, chez les personnes immunodéprimées. Le genre *Candida* inclut également d'autres espèces pathogènes opportunistes, telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, et *C. krusei*, qui partagent la capacité de provoquer des infections similaires (Bona et al., 2016 ; Mohammed et al., 2017). Ces infections représentent un défi de taille en médecine, d'où l'importance de mieux comprendre les mécanismes par lesquels *C. albicans* passe de commensale à pathogène, ainsi que ses résistances aux traitements actuels.

I.1 *Candida albicans* : Historique

Les infections à *Candida* remontent à l'Antiquité, avec des descriptions du muguet buccal par Hippocrate au IV^e siècle avant J.-C. Cependant, ce n'est qu'au début du XIX^e siècle que la mycologie médicale a réellement pris son essor. En 1839, Langenbeck a été le premier à identifier le champignon responsable du muguet chez l'homme. Parmi les espèces du genre *Candida*, *C. albicans* a été décrite en 1923 par Christine Marie Berkhout, à partir de laquelle le terme "candidose" a été adopté pour désigner les infections qu'elle provoque (Wendy QUEVAREC, 2023).

I.2 Taxonomie

Les espèces du genre *Candida* sont des levures unicellulaires asexuées, classées dans le groupe des *Fungi imperfecti*. Parmi celles-ci, *C. albicans* se distingue comme l'une des espèces les plus étudiées. Selon la taxonomie actuelle, *C. albicans* est classée comme suit : (McManus & Coleman, 2014)

- Règne: Fungi
- Division: Ascomycota
- Classe: Saccharomycetes
- Ordre: Saccharomycetales
- Famille: *Saccharomycetaceae*
- Genre: *Candida*
- Espèce: *Candida albicans*

I.3 Caractères morphologiques et habitat

C. albicans est une levure commensale qui peut également adopter une forme pathogène opportuniste, responsable d'environ 70% des infections fongiques à l'échelle mondiale. Les espèces du genre *Candida* sont en réalité présentes chez tous les humains, faisant partie intégrante de la flore buccale normale. Parmi ces espèces, *C. albicans* est la plus fréquente dans les muqueuses buccales, qu'elles soient saines ou infectées (Talapko et al., 2021 ; Czechowicz et al., 2022).

C. albicans est un champignon unicellulaire eucaryote, dépourvu de chlorophylle. Cette levure se distingue par une capacité d'adaptation exceptionnelle, lui permettant de croître sur une grande variété de milieux de culture, qu'ils soient riches ou pauvres en nutriments tels que les sels, le carbone, l'azote et la biotine. Elle prolifère dans un large éventail de pH, allant de 2 à 8, et présente une température optimale de croissance aux alentours de 37°C. Son temps de génération, dans des conditions optimales, est d'environ 15 min dans un milieu synthétique. En tant qu'anaérobie facultatif, elle est capable de tolérer des concentrations variables de dioxyde de carbone tout au long de son cycle de vie (Odds, 1985).

C. albicans est une levure polymorphique capable d'adopter diverses formes morphologiques distinctes (Figure 1), notamment des cellules unicellulaires de levure (blastosporidies), des tubes germinatifs, des pseudohyphes et de véritables hyphes. Les cellules de levure sont ovales, isolées, et se reproduisent par bourgeonnement, avec des modes axiaux ou bipolaires (Figure 1a). Suite à la division cellulaire des levures, les cellules filles peuvent parfois rester attachées, formant des chaînes plus ou moins ramifiées appelées pseudohyphes (Figure 1b). Contrairement aux pseudohyphes, les hyphes véritables présentent des parois parallèles, une largeur uniforme et des septa dépourvus de constriction (Figure 1c). Une autre forme importante de pathogénicité observée chez *C. albicans* est sa capacité à former des tubes germinatifs (Figure 1d). Ces structures apparaissent dans un milieu riche en sérum et se caractérisent par l'absence de cloisonnement entre la cellule de levure et l'hyphe. Cette capacité de *C. albicans* à alterner entre diverses morphologies représente un facteur déterminant de sa virulence, lui permettant de s'adapter de manière optimale aux fluctuations des conditions physiologiques de l'hôte et de renforcer ses stratégies d'évasion face aux réponses immunitaires (Czechowicz et al., 2022 ; Thompson et al., 2011).

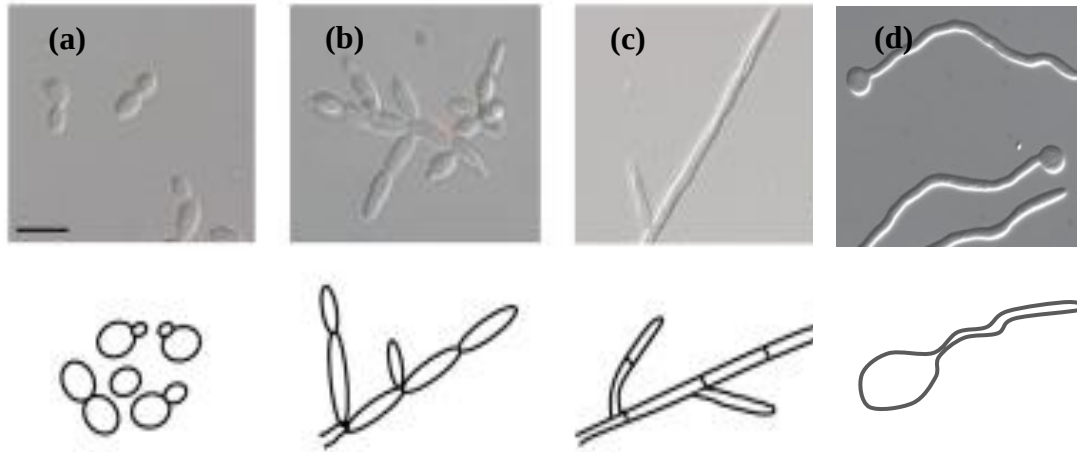


Figure 1: Différentes formes morphologiques de *C. albicans*.

(a) levures, (b) pseudohyphes, (c) hyphes et (d) tubes germinatifs (Thompson et *al.*, 2011).

I.4 Les candidoses humaines

Grâce aux mécanismes permettant à *C. albicans* de passer de l'état commensal à celui de pathogène, principalement en raison de l'affaiblissement du système immunitaire de l'hôte, ce champignon peut provoquer des infections appelées candidoses. Celles-ci peuvent se manifester sous diverses formes cliniques, allant des infections cutanéomuqueuses telles que le muguet buccal et la vaginite, aux infections systémiques graves, comme les candidémies. La transmission interhumaine des infections à *Candida* demeure rare et se manifeste principalement dans les cas de muguet buccal chez les nouveau-nés, souvent acquis lors de l'accouchement de mères présentant des infections vaginales. Des cas de transmission sexuelle entre des patientes souffrant de vaginite à *Candida* et leurs partenaires ont également été documentés (Mohammed et *al.*, 2017). En milieu hospitalier, la transmission horizontale de l'infection peut se produire, notamment par l'intermédiaire des mains du personnel soignant. De plus, les dispositifs médicaux, tels que les cathéters et les solutions intraveineuses contaminés, représentent des vecteurs potentiels favorisant la propagation de l'infection (Sardi et *al.*, 2013).

I.4.1 Facteurs favorisant la candidose

Parmi les facteurs favorisant les candidoses, on distingue les facteurs intrinsèques et iatrogènes. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'hôte et incluent divers éléments physiologiques, tels que l'âge avancé et la grossesse, ainsi que des facteurs pathologiques associés à des maladies chroniques comme le diabète. Cette dernière condition peut entraîner

des modifications dans la salive, notamment une augmentation du taux de glucose, ce qui favorise la prolifération de *Candida* dans la cavité buccale. De plus, la qualité nutritionnelle joue un rôle déterminant dans le risque de candidose. Par exemple, une carence en fer peut favoriser l'apparition d'une candidose cutanéomuqueuse chronique persistante (Javadikasgari et al., 2018 ; van Wyk & Steenkamp, 2011).

Parmi les facteurs iatrogènes qui prédisposent à l'infection, l'utilisation d'antibiotiques se distingue par sa capacité à perturber l'équilibre de la flore microbienne normale. Les traitements immunosuppresseurs, tels que les corticostéroïdes, la thérapie cytotoxique et la radiothérapie, affaiblissent le système immunitaire, augmentant ainsi le risque d'infections. En outre, certaines pratiques médicales, comme la dialyse (en particulier l'hémodialyse), la mise en place de cathéters veineux centraux et de prothèses dentaires, contribuent également à cette vulnérabilité. Enfin, des habitudes de vie telles que le tabagisme et les séjours prolongés en milieu hospitalier jouent également un rôle dans l'augmentation de l'incidence des infections (Pappas et al., 2018 ; van Wyk & Steenkamp, 2011).

I.5 Épidémiologie et prévalence du genre *Candida*

Les infections fongiques sont majoritairement causées par des espèces du genre *Candida*, avec environ 150 souches répertoriées à ce jour. Parmi elles, *C. albicans* est responsable de près de 50% des infections (Mohammed et al., 2017). La distribution des espèces de *Candida* varie considérablement selon les régions géographiques. Bien que *C. albicans* demeure l'espèce la plus prévalente à l'échelle mondiale, *C. glabrata* a progressivement émergé comme un pathogène important aux États-Unis, au Canada et en Europe du Nord. En revanche, *C. parapsilosis* prédomine en Amérique latine, en Europe du Sud et en Asie. De plus, la répartition des espèces de *Candida* varie également en fonction de l'âge des patients. *C. glabrata* est plus fréquemment isolée chez les personnes âgées de plus de 60 ans, tandis que *C. albicans* et *C. parapsilosis* prédominent chez les nouveau-nés (Ghazi et al., 2019).

Aux États-Unis, *C. albicans* est la plus fréquemment isolée dans les échantillons cliniques, représentant 37% des cas. Elle est suivie par *C. glabrata* (27%), tandis que d'autres espèces telles que *C. parapsilosis* (14%), *C. tropicalis* (8%), *C. krusei* (2 %), *C. dubliniensis* (2%), *C. lusitaniae* (2%) et l'espèce émergente *C. auris* sont également fréquemment impliquées dans les infections fongiques, notamment les candidémies (Bhattacharya et al., 2020).

En Algérie, *C. parapsilosis* s'est révélée être l'espèce de levure la plus fréquemment isolée dans les cas de candidémie. Entre 2004 et 2015, elle a constitué 36,6% des infections identifiées au CHU Mustapha d'Alger, suivie par *C. albicans* (31,6%), *C. tropicalis* (23,3%), *C. krusei* (3,3%) et *C. lusitaniae* (1,6%). Cette prédominance de *C. parapsilosis* a également été confirmée à l'hôpital d'Oran, où elle représentait 64% des isolats obtenus à partir des cathéters veineux périphériques. Par ailleurs, au CHU de Tlemcen, 19% des cathéters vasculaires étaient colonisés par des levures, avec une prévalence de 60% pour *C. parapsilosis* (Ghazi et al., 2019 ; Chekiri-Talbi & Denning, 2017).

I.5.1 Prévalence de la candidose chez les patients atteints du SIDA

La candidose, causée principalement par *C. albicans*, est l'infection fongique la plus répandue chez les personnes vivant avec le VIH. Elle peut se manifester sous différentes formes, notamment la candidose oropharyngée (muguet), l'œsophagite, la vaginite et les éruptions cutanées. La prévalence de la candidose buccale dans cette population varie entre 7% et 93%, en fonction du degré d'immunosuppression des patients. Une corrélation significative a été observée entre la charge virale du VIH et la quantité de levures oropharyngées asymptomatiques. De plus, il a été démontré qu'une concentration élevée d'ARN du VIH est associée à une prévalence accrue de candidose buccale (Ruhnke, 2006).

I.5.2 Prévalence de la candidose chez les femmes enceintes

La candidose vulvo-vaginale est une infection courante chez les femmes adultes, avec 70 à 75% d'entre elles touchées par au moins un épisode au cours de leur vie. Environ 90% des cas sont dus à *C. albicans*, tandis que *C. glabrata* est responsable de 5% des infections. Chez les femmes enceintes, l'incidence de la candidose est doublée, notamment au troisième trimestre. Cette récurrence est principalement liée à l'augmentation des taux d'œstrogènes et de corticoïdes durant la grossesse, ce qui affaiblit les défenses vaginales contre les infections opportunistes comme *Candida*. On estime qu'environ 40% des femmes enceintes dans le monde pourraient être colonisées par des espèces de *Candida*, soit un taux de prévalence deux fois supérieur à celui des femmes non enceintes (Mohammed et al., 2017 ; Alo et al., 2012).

En 2020, la candidose vulvo-vaginale a touché environ 6% des femmes âgées de 15 à 50 ans en Algérie. À Alger, dans un service de gynécologie-obstétrique, une enquête effectuée auprès de 100 femmes en âge de procréer, a montré que 62% d'entre elles étaient atteintes de candidose vulvo-vaginale (Aissat & Denning, 2023).

I.5.3 Prévalence de la candidose chez les patients diabétiques

Les personnes diabétiques sont particulièrement sensibles à la colonisation et à la prolifération des champignons en raison de l'hyperglycémie. Ce facteur joue un rôle crucial dans le déséquilibre de l'hôte, favorisant la transition de *Candida* sp. du statut de commensal à celui de pathogène, ce qui conduit au développement de l'infection (Czechowicz et *al.*, 2022). Des études ont rapporté que jusqu'à 54% des patients diabétiques pouvaient être porteurs de levures, *C. albicans* étant responsable de 25 à 69% des isolats (Abu-Elteen et *al.*, 2006). Par ailleurs, des taux de colonisation plus élevés par l'espèce *Candida* ont été observés chez les patients atteints de diabète de type 1 par rapport à ceux souffrant de diabète de type 2, avec respectivement 84% et 68% de colonisation. En comparaison, le taux de colonisation chez les individus non diabétiques s'élève à environ 27% (Rodrigues et *al.*, 2019).

I.6 Mécanismes de pathogénicité

Plusieurs facteurs de virulence ont été reconnus comme des contributeurs essentiels à la pathogénicité de *C. albicans* :

I.6.1 Adhérence aux surfaces

Grâce à sa capacité d'adhésion, *C. albicans* peut initier la colonisation des surfaces et favoriser le développement de l'infection. Cette capacité repose dans un premier temps, sur des interactions non spécifiques, principalement dues à l'hydrophobicité des cellules et aux forces électrostatiques. Dans un second temps, elle s'appuie sur l'expression de protéines spécifiques, appelées adhésines, qui permettent à *C. albicans* de se lier à d'autres cellules fongiques, à des micro-organismes, à des surfaces abiotiques, ainsi qu'aux cellules hôtes (Talapko et *al.*, 2021 ; Czechowicz et *al.*, 2022).

Les adhésines de *C. albicans* les plus étudiées appartiennent à la famille des protéines ALS (Agglutinin-Like Sequence), qui comprend huit membres (Als1-7 et Als9). Ces glycoprotéines de surface, codées par les gènes *ALS*, sont ancrées à la membrane cellulaire par le glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui leur permet d'interagir efficacement avec l'environnement. Ces adhésines se lient à divers ligands, tels que les protéines du complément, le fibrinogène et la fibronectine (Mayer et *al.*, 2013). Parmi elles, Als3, exprimée lors de la formation des hyphes, joue un rôle central dans l'adhésion. Contrairement aux formes de levures, les hyphes de *C. albicans* déclenchent l'endocytose par les cellules épithéliales humaines, en particulier dans la cavité buccale (Figure 2). Ce processus est rendu possible grâce à l'interaction spécifique entre l'adhésine hyphale Als3 et l'E-cadhérine des

cellules de l'hôte, facilitant ainsi la pénétration et la colonisation des tissus par le champignon (Noble et *al.*, 2018).

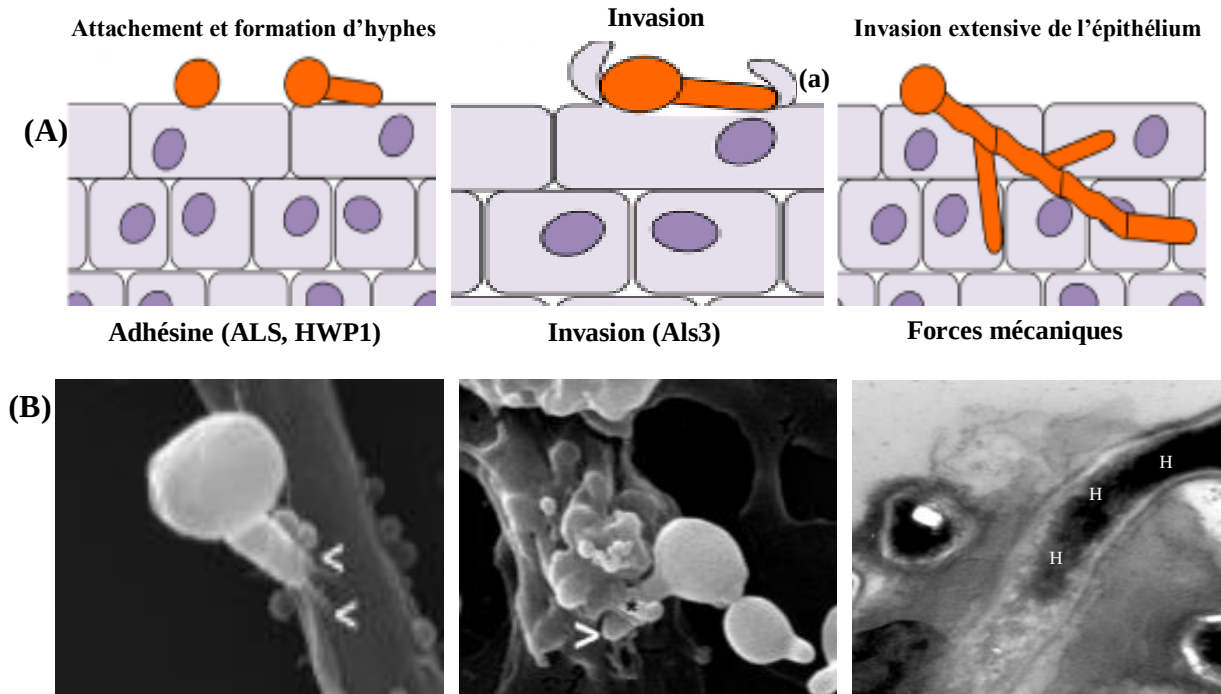


Figure 2: Schéma illustrant les étapes de l'infection épithéliale par *Candida albicans*.

(A) : Première étape consiste à l'adhésion et à la formation d'hyphes grâce aux adhésines comme Als et Hwp1. Suivis d'une invasion de l'épithélium par le mécanisme d'endocytose (a) induite par l'hôte (Wilson et *al.*, 2016).

(B) : Figure en microscopie électronique à balayage illustrant le processus de pénétration.

(<) : Début de l'endocytose ; (H) Croissance d'un hyphe traversant plusieurs couches cellulaires (Lossinsky et *al.*, 2006).

Une autre adhésine associée à la forme hyphale, qui a été largement étudiée et qui joue un rôle crucial dans l'adhésion des cellules fongiques à l'épithélium, est Hwp1 (hyphal wall protein). Cette protéine a un domaine d'ancrage GPI, similaire à celui des adhésines Als. Elle interagit avec les cellules épithéliales grâce à des enzymes appelées transglutaminases, permettant ainsi à la cellule fongique de se lier à diverses protéines sur la surface de l'épithélium de l'hôte (Mayer et *al.*, 2013). Hwp1 et Als3 contribuent également à la formation du biofilm en agissant comme adhésifs complémentaires. Des études ont démontré que Hwp1 interagit avec d'autres protéines d'adhésion, telles que Als1 et Als3 de *C. albicans*. Cette interaction favorise l'auto-adhésion entre les blastospores et les hyphes, ainsi qu'entre les

hyphes elles-mêmes, ce qui est essentiel pour le développement et la stabilité du biofilm (Czechowicz et *al.*, 2022).

Les adhésines protéiques, indépendante de la morphologie, peuvent également être décrites. Parmi celles-ci figurent des protéines liées au GPI, telles que Eap1, Iff4 et Ecm33. D'autres protéines présentes dans la paroi cellulaire incluent Mp65, une β -glucanase putative, et Phr1, une β -1,3-glucanosyl transférase. De plus, des protéases de surface, comme Sap9 et Sap10, ainsi que la protéine Int1, qui présente des similitudes avec une intégrine, sont impliquées. *C. albicans* se distingue par sa capacité à exploiter plusieurs mécanismes d'adhésion, facilitant ainsi son invasion des cellules hôtes et la formation de biofilms (Mayer et *al.*, 2013).

I.6.2 Polymorphisme

Le polymorphisme est l'une des caractéristiques principales de *C. albicans*, lui permettant de se développer sous diverses formes, telles que les levures bourgeonnantes, les pseudohyphes et les hyphes véritables. D'autres morphologies peuvent également être observées, notamment les cellules blanches et opaques, qui se forment lors de la commutation, ainsi que les chlamydospores (Figure 3) (Noble et *al.*, 2017). Le dimorphisme de *C. albicans* peut être déclenché par divers facteurs environnementaux, induisant la transition de la forme blastospore à la forme hyphale. Cette transition, facilitée par la commutation phénotypique en réponse aux signaux externes, permet à *Candida* de s'adapter à son environnement.

Des études ont montré que la forme blastospore est principalement impliquée dans la colonisation et la dissémination au sein de l'organisme hôte. En revanche, la forme hyphale est considérée comme invasive, capable d'adhérer aux tissus, de sécréter des enzymes protéolytiques et de causer des dommages aux tissus. Parmi les mécanismes pathogéniques associés, la candidalysine, une toxine spécifique produite par les hyphes, est considérée comme un facteur clé dans l'établissement d'infections systémiques et dans le risque de mortalité qui y est associé (Talapko et *al.*, 2021). En outre, contrairement aux blastospores, les filaments peuvent survivre à l'intérieur des macrophages et montrent une résistance face aux agents antifongiques habituellement efficaces contre les formes levures (Czechowicz et *al.*, 2022).

Les hyphes de *C. albicans* expriment également divers facteurs de virulence, incluant des adhésines telles que la protéine de la paroi hyphale 1 (Hwp1), les protéines de type agglutinine-like 3 (Als3), Als10, le facteur activé 2 (Fav2) et Pga55. Ils produisent des enzymes dégradant les tissus, comme les protéases aspartyl sécrétées (Sap4, Sap5, Sap6), des protéines de défense antioxydantes, telles que le superoxyde dismutase 5 (Sod5), ainsi qu'un cytotéroïde (extent of cell elongation protein 1 (Ece1)), récemment identifié, impliqué dans l'élongation cellulaire, jouent un rôle crucial dans la virulence (Mayer et *al.*, 2013 ; Noble et *al.*, 2017).

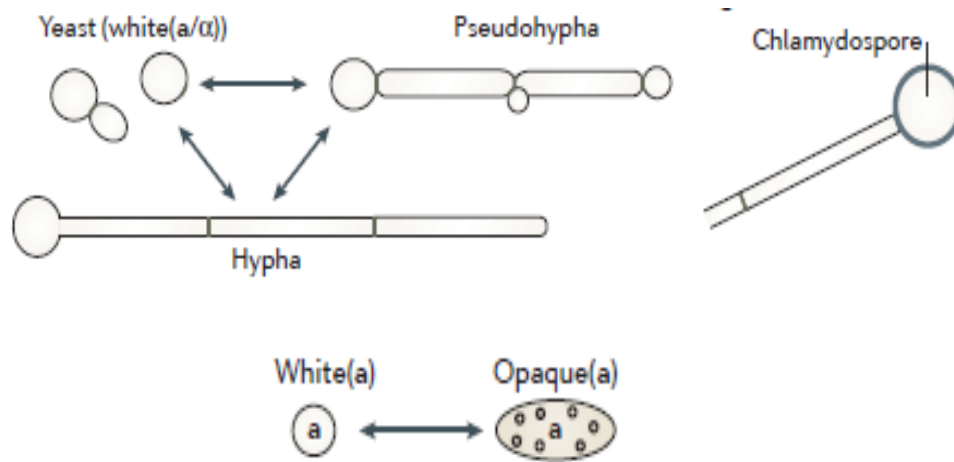


Figure 3: Les différentes transitions morphologiques les plus étudiées chez *C. albicans* (Noble et *al.*, 2017).

I.6.3 Formation de biofilm

Un autre facteur de virulence majeur de *C. albicans* est sa capacité à former des biofilms. Des études récentes révèlent que la majorité des infections liées à *C. albicans* sont associées à la croissance de ces biofilms, qui se développent aussi bien sur des surfaces biotiques, telles que les muqueuses, que sur des surfaces abiotiques, comme les dispositifs médicaux implantés (cathéters, prothèses). Ces biofilms confèrent à *C. albicans* une résistance accrue non seulement aux antifongiques, mais aussi aux défenses immunitaires de l'hôte, compliquant ainsi considérablement le traitement des infections (Talapko et *al.*, 2021).

Les biofilms sont des structures complexes constituées de communautés de cellules microbiennes, pouvant être composées d'une seule espèce ou d'espèces mixtes. Leur développement s'effectue en quatre étapes distinctes (Figure 4). Dans un premier temps, les cellules de levure adhèrent au substrat par le biais d'interactions non spécifiques, telles que les

forces hydrophobes et électrostatiques, ainsi que des liaisons adhésine-ligand (Sardi et *al.*, 2013). Cette phase est suivie d'une prolifération, au cours de laquelle les cellules commencent à se différencier en hyphes, marquant ainsi le début de la formation du biofilm. Ce changement morphologique permet aux cellules d'envahir les muqueuses de l'hôte ou des surfaces inertes grâce à la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, telles que les protéinases, les hémolysines et les phospholipases (Pereira et *al.*, 2021).

L'assemblage des hyphes initie la phase de maturation, accompagnée de la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS). Les biofilms matures de *C. albicans* affichent une résistance considérablement accrue aux agents antimicrobiens et aux réponses immunitaires de l'hôte par rapport aux cellules planctoniques (Mayer et *al.*, 2013). Cette résistance est principalement attribuée à la présence de β -1,3-glucane dans la matrice du biofilm, bien qu'il constitue un composant minoritaire. D'autres polysaccharides, tels que l' α -mannane et le β -1,6-glucane, contribuent également à la complexité et à l'intégrité des EPS (Pereira et *al.*, 2021). La phase finale du processus de formation de biofilm implique la dispersion des cellules non adhérentes, favorisant ainsi la formation de nouveaux biofilms. Des études ont montré que cette dispersion est directement liée à la virulence de *C. albicans*, les cellules de levure libérées du biofilm mature étant plus virulentes, ce qui renforce leur capacité à provoquer des infections (Mayer et *al.*, 2013).

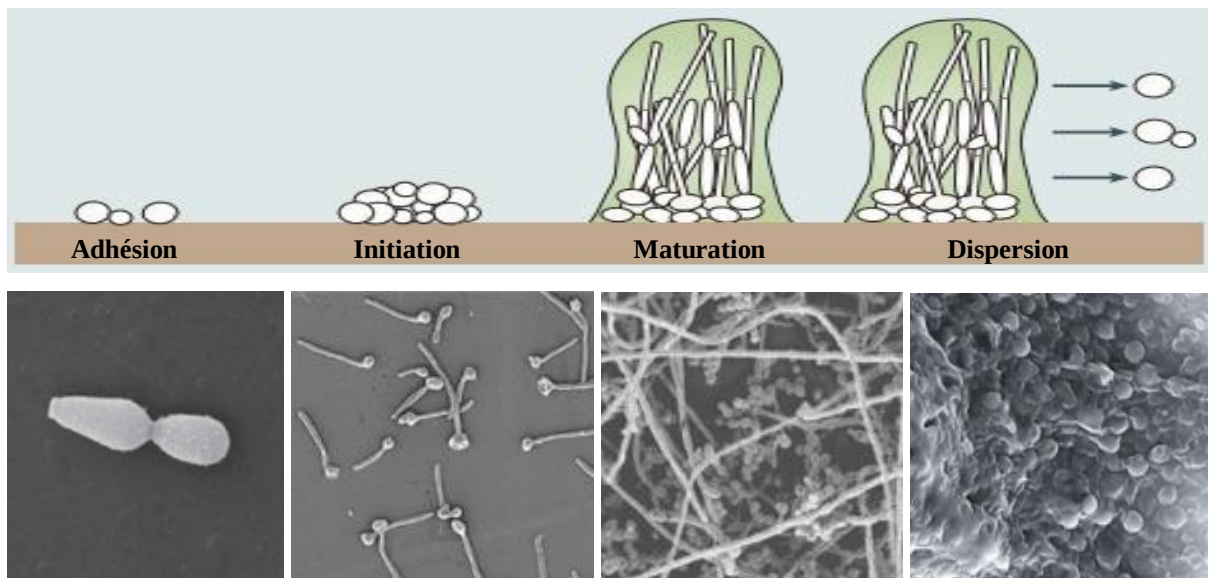


Figure 4: Schéma présentant les étapes de formation et de développement d'un biofilm (Noble et *al.*, 2017), avec l'imagerie électronique correspondante à chaque phase (Baktir et *al.*, 2012; Ramage et *al.*, 2009).

I.6.4 Mécanismes de régulation transcriptionnelle de la formation du biofilm

La formation du biofilm chez *C. albicans* est contrôlée par plusieurs facteurs de transcription, notamment Bcr1, Tec1, Efg1, Ndt80, Rob1, et Brg1. Ces facteurs sont essentiels pour l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et la morphogenèse de *C. albicans*. Une étude menée par Nobile et al. (2012) a révélé un réseau transcriptionnel complexe régulant la formation des biofilms, montrant que la suppression de l'un de ces régulateurs (BCR1, TEC1, EFG1, NDT80, ROB1 ou BRG1) entraîne une altération de la formation du biofilm. D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de la production de la matrice extracellulaire. Par exemple, ZAP1 inhibe la production de β -1,3-glucane, tandis que des enzymes telles que les glucoamylases (Gca1 et Gca2), les glucane transférases (Bgl2 et Phr1), ainsi que l'exo-glucanase Xog1, favorisent cette synthèse. Les gènes *GCA1* et *GCA2* sont régulés par ZAP1, alors que les gènes *BGL2*, *PHR1* et *XOG1* fonctionnent indépendamment de ce régulateur (Mayer et al., 2013).

I.6.4.1 Architecture des biofilms

L'architecture du biofilm mature, ainsi que le développement des différentes phases et leur durée, dépendent de l'espèce de *Candida* et des conditions environnementales, notamment la nature de la surface d'adhésion et la disponibilité des nutriments. Les biofilms de *C. albicans* présentent une architecture tridimensionnelle, avec une couche inférieure constituée de cellules en forme de levure, tandis que les hyphes et les pseudohyphes forment la couche supérieure, conférant à l'ensemble un aspect bi-phasique. Des analyses génétiques révèlent que tant les cellules de levure que les hyphes jouent un rôle essentiel dans la formation du biofilm (Sardi et al., 2013). Les différentes couches du biofilm sont enveloppées dans une matrice extracellulaire, offrant une protection aux cellules contre les facteurs externes défavorables. Cette matrice, composée principalement de polysaccharides, assure non seulement la structure du biofilm, mais permet également de réguler les échanges de nutriments et de molécules à travers des canaux hydriques, facilitant la survie des cellules dans des conditions environnementales hostiles. *C. albicans* produit généralement des biofilms plus grands et plus complexes que les autres espèces, ce qui renforce sa capacité à persister dans divers environnements (Malinová et al., 2023).

I.6.4.2 Biofilm et communication cellulaire

La formation et le maintien d'une taille optimale des biofilms chez *C. albicans* sont régulés par un mécanisme de communication intercellulaire connu sous le nom de quorum sensing. Ce processus repose sur la production de molécules de signalisation, appelées

autoinducteurs, qui modulent la densité de la population cellulaire. Lorsque la concentration de ces molécules atteint un seuil critique, elles se lient à des récepteurs spécifiques, inhibant ainsi l'expression de gènes cibles et permettant le contrôle de la densité du biofilm. Ce mécanisme favorise l'émergence de phénotypes virulents, renforçant ainsi la résistance et l'agressivité du biofilm (Talapko et *al.*, 2021).

I.6.4.3 Biofilm dans la cavité buccale

La cavité buccale constitue un environnement propice à la colonisation microbienne sessile, où *Candida* joue un rôle majeur dans le développement des candidoses buccales. L'acidité de cet environnement favorise la croissance fongique par rapport à celle des bactéries. De plus, les levures ont une capacité exceptionnelle à adhérer à diverses surfaces, qu'elles soient naturelles ou artificielles, comme les dents, les obturations dentaires, les prothèses, les appareils orthodontiques, les bijoux de langue ou les tubes endotrachéaux. Si ces surfaces ne sont pas nettoyées régulièrement, elles peuvent devenir des réservoirs de levures et des sources potentielles d'infection. Sur ces supports, *Candida* forme rapidement des biofilms complexes, qui sont résistants aux traitements antimicrobiens et souvent associés à une inflammation importante des muqueuses (Rautemaa & Ramage, 2011).

La candidose érythémateuse chronique est la forme de candidose buccale la plus étroitement associée à un biofilm de *Candida*. Dans ce type de candidose, la surface d'ajustement de la prothèse sert de réservoir aux cellules infectieuses, qui, en raison de leur proximité avec la muqueuse palatine, sont bien positionnées pour déclencher une infection locale. En temps normal, la surface muqueuse constitue une barrière efficace contre les infections; toutefois, une prothèse mal ajustée peut causer une irritation par frottement de la muqueuse palatine, facilitant ainsi l'invasion de *Candida* dans les couches superficielles de l'épithélium (Williams et *al.*, 2011).

Une autre forme de candidose buccale, liée à la formation de biofilms, peut être observée chez des patients atteints de diabète de type 1, en particulier chez ceux dont le contrôle glycémique est déficient. Dans ces cas, les isolats de *C. albicans* présentent une corrélation positive avec l'activité protéinase. Cette activité enzymatique favorise l'invasion des muqueuses en dégradant les protéines des tissus hôtes (Rautemaa & Ramage, 2011).

Il convient également de noter que la plupart des surfaces naturelles de l'hôte, telles que les muqueuses buccales, présentent un risque moindre de colonisation par *Candida* et de

formation de biofilms par rapport aux biomatériaux implantés. Cela est dû à l'efficacité de la réponse immunitaire innée ainsi qu'au renouvellement constant de l'épithélium buccal. Toutefois, si l'hôte est affaibli, un déséquilibre peut favoriser la croissance de *Candida* (Williams et *al.*, 2011).

I.6.4.4 Biofilm dans la cavité vaginale

Dans la candidose vaginale, deux types de biofilms peuvent être impliqués: les biofilms abiotiques, qui se forment sur des surfaces inertes comme les dispositifs intra-utérins (DIU), et les biofilms biotiques, qui s'établissent directement sur l'épithélium vaginal. Les biofilms biotiques sont particulièrement importants dans les infections récurrentes, car de nombreuses patientes souffrent de candidoses persistantes même sans DIU ou après son retrait. Une situation analogue se présente en présence de biomatériaux dans l'environnement vaginal, tels que les DIU, où le biofilm constitue la cause et la source primordiale des infections fongiques (Czechowicz et *al.*, 2022 ; Wu et *al.*, 2020).

Cependant, il existe une différence entre les biofilms formés sur des surfaces muqueuses et abiotiques, ainsi qu'entre les études menées *in vivo* et *in vitro*, la majorité des travaux de recherche étant réalisés dans des conditions *in vitro*. Dans ces études, la phase initiale de formation des biofilms de *C. albicans* dure environ 11 h, suivie d'une phase intermédiaire durant laquelle la production des EPS et la formation d'une bicouche composée de levures et d'hyphes se produisent, s'étalant sur une période de 12 à 30 h. La maturation du biofilm, qui peut s'étendre sur 38 à 72 h, aboutit à la formation d'un réseau dense d'EPS. Enfin, la phase de dispersion. En revanche, *in vivo*, le processus de formation du biofilm est accéléré, nécessitant seulement 8 h pour établir un biofilm, avec une phase de maturation observée en 24 h (Rodríguez-Cerdeira et *al.*, 2019).

La présence d'un biofilm au sein de la muqueuse vaginale, qui constitue une structure hautement résistante et imperméable à de nombreux antimicrobiens, peut expliquer l'inefficacité des traitements antifongiques. Ce biofilm peut également servir de réservoir de cellules persistantes, contribuant ainsi aux récives des candidoses vaginales (Czechowicz et *al.*, 2022).

I.7 Sécrétion d'enzymes

La section sur les enzymes de *C. albicans* met en avant des facteurs de virulence clés, notamment les aspartylprotéases (SAP) et les phospholipases, qui facilitent l'invasion des

tissus et neutralisent les défenses immunitaires de l'hôte. Les SAP, en particulier, sont liées à la formation des hyphes et permettent la dégradation de plusieurs protéines de défense de l'hôte, telles que les immunoglobulines, l' α -macroglobuline, la lactoperoxydase, ainsi que des structures comme le collagène, la créatine, la mucine, la fibronectine et les protéines du complément (Czechowicz et *al.*, 2022).

Les SAP sont une famille de 10 enzymes protéolytiques, divisées en trois groupes selon la spécificité du substrat et la similarité des séquences d'acides aminés. Les Sap1-3, produites par les blastospores, sont principalement associées aux infections des muqueuses, tandis que les Sap4-6 sont produites aux extrémités des hyphes et impliquées dans la candidose systémique. Les Sap9 et Sap10, quant à elles, sont des endopeptidases ancrées à la surface cellulaire avec une liaison au GPI, jouant un rôle dans l'intégrité et l'adhésion de la paroi cellulaire. Ces enzymes ont une activité optimale dans des conditions acides, avec un pH maximal de 4, ce qui explique leur rôle majeur dans les candidoses vulvo-vaginales (VVC), où le pH est naturellement acide. Toutefois, leur action ne se limite pas à ces infections, car des études ont également montré leur implication dans les candidoses orales (Czechowicz et *al.*, 2022 ; Gabrielli et *al.*, 2016; Naglik et *al.*, 2003).

Les phospholipases représentent un groupe d'enzymes hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides des membranes cellulaires. Cette activité enzymatique favorise la lyse des cellules hôtes, facilitant ainsi une invasion plus profonde dans les tissus. Les phospholipases se classifient en quatre catégories: A, B, C et D. *C. albicans* possède la capacité de synthétiser des phospholipases de chacune de ces classes. Bien que leur étude soit moins avancée que celle d'autres enzymes, telles que les aspartyl-protéases, les phospholipases attirent un intérêt croissant dans la recherche en raison de leur rôle crucial dans la progression des infections fongiques (Naglik et *al.*, 2003).

Parmi les autres enzymes impliquées dans la virulence de *C. albicans*, on trouve les lipases, qui interviennent dans l'hydrolyse et la synthèse des triacylglycérols. Leur activité pourrait renforcer l'adhésion de la levure aux tissus de l'hôte, faciliter l'invasion des cellules et assurer la survie intracellulaire dans les macrophages. Les hémolysines jouent un rôle crucial dans l'acquisition du fer, un élément essentiel pour la croissance de la levure, en provoquant la lyse des globules rouges pour libérer ce métal. De plus, les estérases, bien qu'encore peu étudiées, sont suspectées d'exercer des effets cytotoxiques qui pourraient contribuer à l'endommagement des cellules hôtes (Czechowicz et *al.*, 2022).

I.8 Diagnostic biologique

Face à la mortalité significative liée aux infections invasives à *Candida*, il est crucial d'optimiser les méthodes diagnostiques pour permettre un traitement antifongique précoce et ciblé. Le diagnostic des candidoses repose sur une approche clinique rigoureuse permettant l'identification directe de la levure, tout en tenant compte de son état commensal.

I.8.1 Examen clinique

Le muguet buccal, ou candidose pseudomembraneuse, représente l'une des formes les plus fréquentes de candidose oropharyngée, particulièrement observée chez les nouveau-nés. Il se manifeste par des pseudomembranes blanches étendues, constituées de cellules épithéliales desquamées, de fibrine et d'hyphes fongiques, avec une consistance crémeuse et un modèle de croissance centrifuge. Les lésions se développent principalement dans la région oropharyngée, sur la muqueuse des joues et les faces latérales de la langue. Lors du grattage, les plaques blanchâtres à jaunâtres se détachent, révélant une zone érythémateuse sous-jacente (Patil et *al.*, 2015). Par ailleurs, la candidose vaginale se manifeste fréquemment par une leucorrhée, caractérisée par des pertes blanches, épaisses et grumeleuses. D'autres symptômes peuvent également indiquer une infection, tels qu'une hypersensibilité, une vulvovaginite irritante ou, dans certains cas, des douleurs lors des rapports sexuels (Geiger et *al.*, 1995).

I.8.2 Prélèvement

L'échantillon doit être prélevé sur une lésion fraîche et active, en utilisant un écouvillon stérile pour garantir une collecte optimale. Il est essentiel de transporter l'échantillon rapidement au laboratoire pour minimiser les risques de contamination par la flore saprophyte. En cas de candidémie, des prélèvements sanguins peuvent également être effectués. Par ailleurs, ces prélèvements devraient idéalement être effectués en l'absence de tout traitement antifongique (Javadikasgari et *al.*, 2018).

I.8.3 Examen direct

L'examen direct est le premier test effectué pour orienter un diagnostic. Il peut être réalisé sur des échantillons frais déposés sur une lame, en utilisant de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 10%, qui dissout les cellules épithéliales tout en laissant *Candida* intact, ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 15-30% (Cardinale, 2018). Des frottis des échantillons peuvent également être préparés, suivis d'une coloration classique (Iugol à 2%, bleu de toluidine, bleu au lactophénol, ou encore noir chlorazole) ou de techniques rapides

comme la coloration de Gram. Cet examen contribue à l'initiation rapide d'un traitement adapté, en ciblant à la fois la densité et le type d'infection observés.

I.8.4 Culture

La culture de *Candida* est généralement réalisée sur des milieux standards, tels que le milieu Sabouraud, constitué de glucose, de peptone et d'agar, optimisé pour favoriser la croissance des levures. Afin de limiter les contaminations bactériennes, ce milieu est souvent supplémenté en antibiotiques, comme le chloramphénicol ou la gentamicine. En complément, l'utilisation de cycloheximide (Actidione), un antifongique ciblant spécifiquement les champignons filamenteux, peut également être envisagée pour inhiber leur développement (Javadikasgari et *al.*, 2018).

Lors de l'ensemencement, il est crucial de procéder de manière stérile et en quantité suffisante. L'écouvillon doit être uniformément étalé sur toute la surface du milieu de culture, de préférence sur des boîtes de Pétri plutôt que dans des tubes, afin de faciliter l'isolement et l'observation des colonies. Les levures du genre *Candida* se développent à une température de 37°C et nécessitent environ 48 h d'incubation. L'analyse des cultures commence après 24 h d'incubation et doit se poursuivre quotidiennement pendant trois jours pour évaluer la croissance et les caractéristiques des colonies (Cardinale, 2018). Pour distinguer les colonies d'origine commensale de celles d'origine infectieuse, un dénombrement est requis. Les résultats doivent être présentés en unités formant colonie (UFC/ml). Une détection de plus de 20 colonies indique une charge fongique élevée.

Les milieux chromogéniques jouent un rôle essentiel dans l'identification rapide de *C. albicans*. En intégrant des substrats chromogènes, ces milieux permettent aux colonies de développer une coloration caractéristique, ce qui facilite leur reconnaissance (Figure 5). Cette coloration est souvent associée à l'activité enzymatique de type hexosaminidase (N-acétyl- β -D-galactosaminidase). Grâce à cette méthode, la spécificité d'identification de *C. albicans* atteint un taux de précision supérieur à 99%, faisant de cette approche un outil fiable pour le diagnostic des infections à *Candida* (Neppelenbroek et *al.*, 2014).

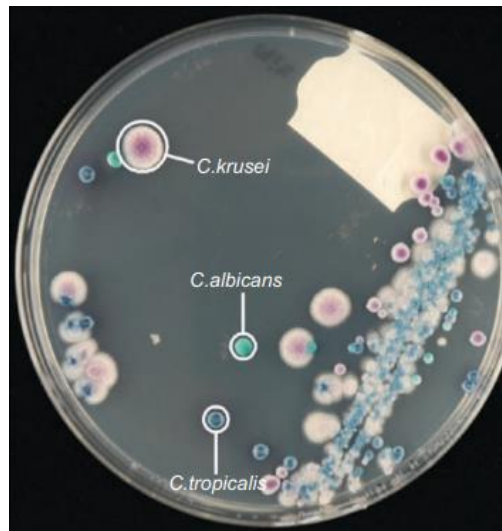


Figure 5: Culture de *Candida* sur milieu Chromogénique (Ann Chai et *al.*, 2010).

I.8.5 Identification de *Candida*

L'identification des souches ne doit être effectuée que lorsque les colonies sont correctement isolées et purifiées. Elle comporte deux étapes: la première, basée sur des critères morphologiques pour différencier le genre, et la seconde, plus spécifique, reposant sur des critères physiologiques pour identifier l'espèce.

I.8.6 Identification de *C. albicans*

L'identification de l'espèce *albicans* repose sur plusieurs caractéristiques distinctes. Cette espèce a la capacité de former des tubes germinatifs dans des conditions de culture spécifiques, notamment en présence de sérum. Par ailleurs, lorsque les conditions de culture deviennent défavorables, elle peut produire des spores résistantes connues sous le nom de chlamydospores (Pianetti, 2015).

I.8.6.1 Examen macroscopique

Sur milieux standards, *C. albicans* se présente sous forme de colonies lisses et brillantes, de couleur blanche à crème, atteignant quelques millimètres de diamètre après 24 à 48 h d'incubation à 37°C (Cardinale, 2018).

I.8.6.2 Formation de tube germinatif

Le test de formation de tubes germinatifs est largement reconnu comme l'un des tests les plus fiables pour différencier *C. albicans* des autres espèces du même genre. Ce test repose sur l'observation de structures filamenteuses (Figure 6), appelées tubes germinatifs, qui apparaissent lorsque *C. albicans* est incubé dans du sérum pendant 2 à 4 h à 37°C. Un tube

germinatif constitue une extension non septée de la cellule de levure, se distinguant des hyphes véritables par l'absence de constriction au point d'attache avec la cellule mère. La formation de tubes germinatifs dans le sérum peut être influencée par plusieurs paramètres environnementaux, incluant la température, la densité de l'inoculum, la composition du milieu et le pH du milieu. De plus, des études ont montré que le sérum humain constitue un milieu d'addition plus efficace pour l'identification de *C. albicans* par rapport aux sérums d'origine animale (Neppelenbroek et *al.*, 2014). Cependant, un point de vigilance concernant cette méthode est que certaines espèces de *Candida* non *albicans*, comme *C. dubliniensis*, peuvent également produire des tubes germinatifs dans le sérum. Cela risque de provoquer des erreurs d'identification.

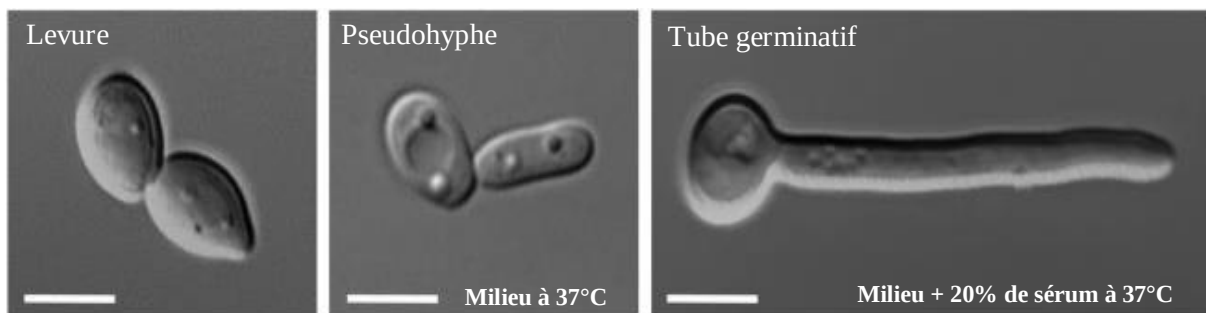


Figure 6: Tubes germinatif de *C. albicans* suite à un test de blastèse (Bates, 2018).

I.8.6.3 Formation de chlamydospores

Le test de chlamydosporulation a pour objectif de mettre en évidence des structures spécifiques, appelées chlamydospores. Des chlamydoconidies de grande taille, possédant des parois très réfractaires, peuvent être observées soit à l'extrémité des hyphes, soit sur de courtes ramifications latérales des isolats de *C. albicans*. Ensemencée sur des milieux spécialisés riches en polysides, tels que les milieux RAT (Riz, Agar, Tween) et PCB (Pomme de terre, Carotte, Bile), *C. albicans* est l'une des rares espèces du genre *Candida* capable de produire des chlamydospores dans un délai de 24 à 48 h à température ambiante. Il est à noter que la formation des chlamydospores chez *C. dubliniensis* diffère de celle observée chez *C. albicans* (Figure 7); en effet, les chlamydospores de *C. dubliniensis* sont souvent observées groupées par paires, triplets ou en agrégats sur une même cellule, plutôt que se développant individuellement à l'extrémité des hyphes ou pseudohyphes, comme c'est le cas pour *C. albicans* (Neppelenbroek et *al.*, 2014 ; Pianetti, 2015).

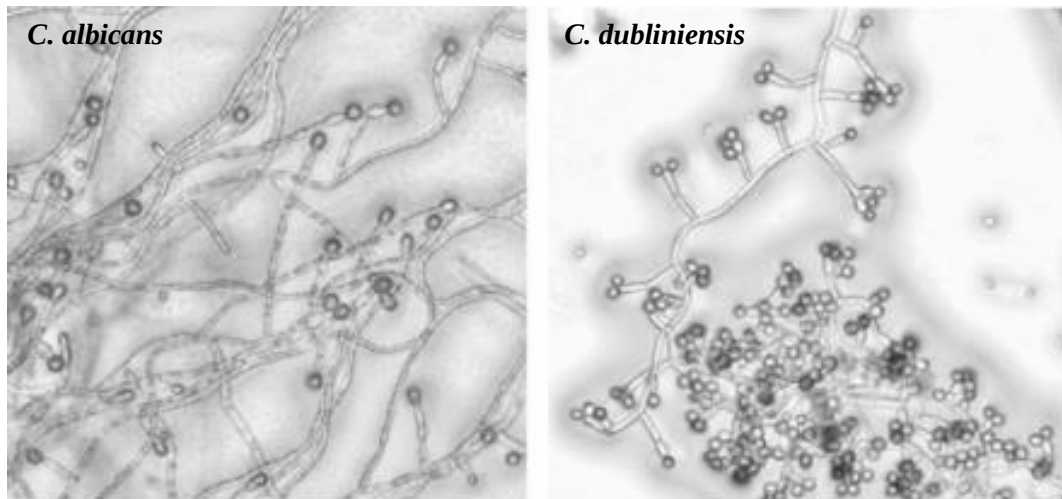


Figure 7: Formation des chlamydospores sur milieu Rice-Meal-Tween 80 agar (Böttcher et *al.*, 2016).

I.8.6.4 Identification de *Candida non albicans*

L'identification des espèces de *Candida non albicans* repose également sur des tests d'assimilation des glucides, appelés auxanogrammes. Ces tests permettent d'évaluer la capacité des champignons à utiliser différents sucres comme source unique de carbone. Ils consistent à cultiver les isolats de *Candida* dans des milieux contenant tous les nutriments nécessaires, à l'exception d'une source de carbone, suivis de l'ajout de divers glucides. L'observation de la croissance des champignons dans ces milieux permet de déterminer leur capacité d'assimilation pour chaque sucre, facilitant ainsi la distinction entre les espèces. Différents systèmes d'assimilation ont été utilisés, tels que l'Auxacolor[®], Uni-Yeast-Tek[®], API 20 C AUX[®], Galeria ID32C[®] et VITEK 2ID[®] (Coronado-Castellote & Jiménez-Soriano, 2013; Neppelenbroek et *al.*, 2014).

Pour différencier *C. albicans* de *C. dubliniensis*, des méthodes immunologiques peuvent être employées. Ces techniques incluent la détection du mannane à l'aide du test Platelia[™], la détection d'anticorps antimycéliens avec le test *Candida albicans* IFA IgG, et la recherche d'autres anticorps via le test *Candida Detect*[™]. La détection du (1-3) β -D-glucane peut également être effectuée avec le test Fungitec G (Wako, B-Gstar). De plus, des tests d'agglutination par particules de latex, utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques comme Bichro-latex *albicans*[®], Krusei-color[®], et Bichro-Dubli[®], sont disponibles pour une identification ciblée (Coronado-Castellote & Jiménez-Soriano, 2013).

Les techniques génétiques, connues pour leur haute sensibilité et spécificité, permettent d'identifier le pathogène sans nécessiter de culture. Elles peuvent être appliquées

même à des échantillons de patients sous traitement antifongique. Cependant, ces méthodes sont coûteuses et souvent indisponibles dans de nombreux centres hospitaliers. Le diagnostic moléculaire repose principalement sur l'hybridation et l'amplification des acides nucléiques, particulièrement par la PCR (réaction en chaîne par polymérase). Récemment, plusieurs variantes de PCR ont été développées, incluant la PCR conventionnelle, la PCR nichée, et la PCR en temps réel (Neppelenbroek et *al.*, 2014).

I.9 Traitement

Plusieurs études soulignent l'importance d'un traitement antifongique précoce et adapté, montrant une corrélation significative avec des taux de survie plus élevés. Cela met en évidence la nécessité d'un diagnostic rapide et d'une intervention thérapeutique immédiate pour lutter efficacement contre les infections dues à *Candida* spp (Bassetti et *al.*, 2018). Différentes classes d'antifongiques sont disponibles pour le traitement de la candidose, notamment les polyènes, les azoles et les échinocandines. En outre, la fluorocytosine, un analogue de la pyrimidine, se révèle particulièrement efficace en tant que complément dans le traitement des candidoses affectant le système nerveux central ainsi que l'endocardite causée par *Candida* (Ben-Ami, 2018).

Les tests de sensibilité *in vitro* sont généralement réalisés en utilisant la méthode de microdilution en bouillon, suivant les directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ou de l'European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST). En parallèle, les laboratoires de microbiologie clinique peuvent recourir à des méthodes moins exigeantes, telles que le E-test (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), la diffusion sur disque, Sensititre Yeast One (TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, États-Unis), ainsi que diverses techniques semi-automatisées comme le système Vitek (bioMérieux) (Ben-Ami, 2018).

I.9.1 Les polyènes

Environ six antifongiques polyéniques ont été précédemment utilisés pour le traitement des infections fongiques, dont l'amphotéricine B, la nystatine, la natamycine (également connue sous le nom de pimaricine), la candicidine, la trichomycine et la méthylpartricine. Cependant, à l'heure actuelle, seuls trois de ces polyènes sont couramment prescrits : l'amphotéricine B, qui est utilisé pour les mycoses systémiques, la nystatine, qui cible les infections des muqueuses telles que la candidose orale ou vulvo-vaginale, et la natamycine, qui est efficace contre les infections ophtalmiques (Carolus et *al.*, 2020).

Ces polyènes agissent en se liant aux stérols des membranes cellulaires fongiques, formant ainsi des complexes qui altèrent la structure de la membrane. La force de cette liaison dépend de la taille moléculaire et du nombre de doubles liaisons du polyène, influençant son affinité pour différents stérols. Par exemple, l'amphotéricine B, a une forte affinité pour l'ergostérol, le stérol principal des membranes fongiques, tout en ayant une affinité moindre pour le cholestérol des cellules hôtes. Cette interaction entraîne la formation de pores dans la membrane fongique, modifiant sa perméabilité et provoquant la perte de molécules essentielles. En conséquence, l'efflux de potassium et l'influx d'ions hydrogène conduisent à une acidification interne, bloquant les fonctions enzymatiques et entraînant la mort cellulaire (Malayeri et *al.*, 2018).

Les polyènes restent privilégiés dans les traitements antifongiques pour leur efficacité à large spectre et la rareté des cas de résistance, surtout en comparaison avec les azoles et les échinocandines. Cependant, l'utilisation de l'amphotéricine B a diminué dans le traitement des mycoses systémiques fréquentes, telles que la candidose, en raison de ses effets toxiques marqués (Carolus et *al.*, 2020).

I.9.2 Les azolés

Les antifongiques de la classe des azolés se caractérisent par des structures en anneaux organiques à cinq membres, comprenant deux atomes d'azote pour les imidazoles et trois pour les triazoles. En pratique clinique, les imidazoles incluent des composés comme le clotrimazole, le miconazole et le kétoconazole, tandis que les triazoles les plus fréquemment utilisés sont l'itraconazole et le fluconazole (Malayeri et *al.*, 2018).

Les azoles exercent leur effet antifongique en inhibant l'enzyme lanostérol 14 α -déméthylase, codée par le gène *ERG11*, essentielle à la biosynthèse de l'ergostérol. Cette inhibition provoque une diminution de l'ergostérol et une accumulation de précurseurs stéroliques toxiques pour la cellule. En conséquence, les azoles bloquent la croissance de *Candida* de manière fongistatique, limitant ainsi sa prolifération (Ben-Ami, 2018). Le kétoconazole a été le premier antifongique azolé à être administré par voie orale. Il est efficace aussi bien par voie orale que topique et possède un large spectre d'activité antifongique, notamment contre la candidose des muqueuses et diverses mycoses cutanées.

En ce qui concerne les triazoles, le fluconazole est le plus utilisé pour traiter la candidose. Il se distingue par sa grande biodisponibilité et peut être administré par voie

intraveineuse ou orale à des doses identiques. Toutefois, il est important de noter que l'hépatotoxicité constitue l'un des effets indésirables significatifs associés à son utilisation (Malayeri et *al.*, 2018 ; Ben-Ami, 2018).

I.9.3 La 5-fluorocytosine

La 5-fluorocytosine (5-FC) est l'un des premiers antifongiques développés, initialement synthétisé en 1957 comme agent anticancéreux. Cet analogue de la cytosine n'a pas d'activité antifongique directe. Pour agir, la 5-FC doit être transportée dans les cellules fongiques grâce à une enzyme appelée cytosine perméase. Une fois à l'intérieur, elle est rapidement transformée en 5-fluorouracile (5-FU) grâce à une autre enzyme, la cytosine désaminase. Le 5-FU s'incorpore dans l'ARN fongique, remplaçant l'acide uridylique, ce qui inhibe la synthèse des protéines. De plus, le 5-FU est converti en fluoro-désoxyuridine mono-phosphate, ce qui bloque la synthèse de l'ADN. Ces deux mécanismes font de la 5-FC un agent antifongique efficace contre de nombreuses levures pathogènes.

Elle est fréquemment administrée en combinaison avec l'amphotéricine B ou le fluconazole pour traiter des infections fongiques systémiques complexes. Toutefois, son usage comme traitement unique est restreint à cause des risques de résistance (Delma et *al.*, 2021).

I.9.4 Les échinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides cycliques qui incluent trois médicaments autorisés: la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine, tous approuvés pour le traitement des candidoses invasives. Ces antifongiques doivent être administrés par voie intraveineuse. Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition du complexe transmembranaire glucane synthase (Fks1), une enzyme essentielle à la biosynthèse du 1,3- β -D-glucane, qui est le principal composant glucidique de la paroi cellulaire des champignons. En perturbant la synthèse du 1,3- β -D-glucane, les échinocandines altèrent l'intégrité cellulaire, entraînant finalement la lyse et la mort des cellules fongiques (Ben-Ami, 2018).

I.9.5 Traitement alternatif

Face à l'augmentation de la résistance des champignons aux antifongiques traditionnels, les chercheurs s'orientent de plus en plus vers des traitements alternatifs. Les plantes sont reconnues depuis des décennies comme une source majeure de médicaments pour de nombreuses cultures traditionnelles, et elles restent des remèdes essentiels dans plusieurs régions, notamment en Afrique et en Asie. De nombreuses espèces végétales ont prouvé leur

efficacité antifongique contre les infections à *Candida*. Toutefois, établir une plante médicinale comme agent antimicrobien représente un défi et requiert une évaluation rigoureuse de sa sécurité et de son efficacité avant de passer aux études cliniques (Soliman et *al.*, 2017).

Chapitre II

Quorum sensing chez

Candida albicans

II. Quorum sensing chez *Candida albicans*

II.1 Découverte du quorum sensing

Les micro-organismes, bien qu'ils puissent se développer en tant que cellules isolées, possèdent des mécanismes complexes de communication intercellulaire, appelés quorum sensing, qui leur permettent de coordonner et d'adapter leurs comportements en fonction de la densité cellulaire. Les molécules de détection du quorum ont été découvertes initialement chez les bactéries dans les années 1960 (Tian et *al.*, 2021). Depuis, la régulation du quorum sensing chez les bactéries a fait l'objet de nombreuses études en raison de son implication dans divers processus, tels que la virulence, la compétence, la conjugaison, la production d'antibiotiques, et la formation de biofilms. Ce processus repose sur la libération continue et la détection de molécules sécrétées de type hormonal, de faible poids moléculaire, connues sous le nom de molécules signal ou auto-inducteurs. Leur concentration augmente de manière proportionnelle à la taille de la population. Une fois qu'un seuil critique est atteint, une réponse est activée, entraînant l'expression ou la répression coordonnée des gènes cibles impliqués dans la régulation du quorum sensing (Rodrigues & Černáková, 2020).

Ce mécanisme de régulation a également été identifié chez les champignons. En 1969, Lingappa et *al.* ont décrit une régulation de la filamentation chez le pathogène *C. albicans*, marquant la première description de la régulation fongique du quorum sensing (Tian et *al.*, 2021). Plus tard, en 2001, Hornby et *al.* ont identifié pour la première fois le farnésol, une molécule inductrice produite par *C. albicans*, modulant spécifiquement la transition levure-hyphe dans ce champignon. Une autre substance, l'acide farnésique, a été identifiée par Oh et ses collègues la même année (Oh et *al.*, 2001). Ce composé, présent uniquement chez les espèces de *C. albicans* ne produisant pas de farnésol, agit comme une substance autorégulatrice en inhibant également la filamentation.

Cependant, bien avant l'isolement du farnésol et de l'acide farnésique, Hazen et Cutler avaient découvert une substance autorégulatrice morphogénique (MARS) (Hazen & Cutler, 1983). D'autres molécules de détection du quorum ont été identifiées, dont le tyrosol, le phényléthanol et le tryptophol (Kovács & Majoros, 2020). Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la morphogenèse de la levure, l'apoptose et la régulation de la virulence.

II.2 Farnésol

Le farnésol (3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatriène-1-ol), première molécule de détection de quorum identifiée chez *Candida* et la mieux caractérisée chez *C. albicans*, est un produit secondaire de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, issu de la déphosphorylation du pyrophosphate de farnésol (Figure 8). Dans ce processus, diverses phosphatases peuvent intervenir en fonction de signaux physiologiques ou environnementaux. Des études suggèrent que, chez *C. albicans*, la phosphatase Dpp3 joue un rôle déterminant dans ce processus (Tian et al., 2021). Cependant, d'autres gènes de régulation morphogénique, tels que les répresseurs transcriptionnels *NRG1* et *TUP1*, ainsi que le gène *EED1* impliqué dans la stabilité des hyphes, pourraient également contribuer à la production de farnésol (Polke et al., 2018).

Le farnésol est un sesquiterpène acyclique thermostable. Sa production, prédominante dans des conditions aérobies, est insensible aux variations extrêmes de pH et reste indépendante de la nature de la source de carbone ou d'azote (Kovács & Majoros, 2020).

Généralement, la concentration de farnésol est proportionnelle à la densité cellulaire. Dans des conditions physiologiques, les isolats de *C. albicans* libèrent continuellement une concentration moyenne de farnésol de 35,6 μM (variant de 13,7 à 58,5 μM) au cours de leur croissance. Cette concentration est significativement plus élevée que celle sécrétée par les espèces non-*albicans*, à l'exception de *C. dubliniensis*, qui présente une concentration de 8,3 μM (Kovács & Majoros, 2020). Le farnésol influence divers aspects de *Candida*, dont sa morphologie, la formation de biofilm, l'expression des pompes d'efflux de médicaments, la régulation de l'apoptose, la réponse phagocytaire, l'hydrophobicité de surface, le métabolisme du fer et les voies de réponse au choc thermique.

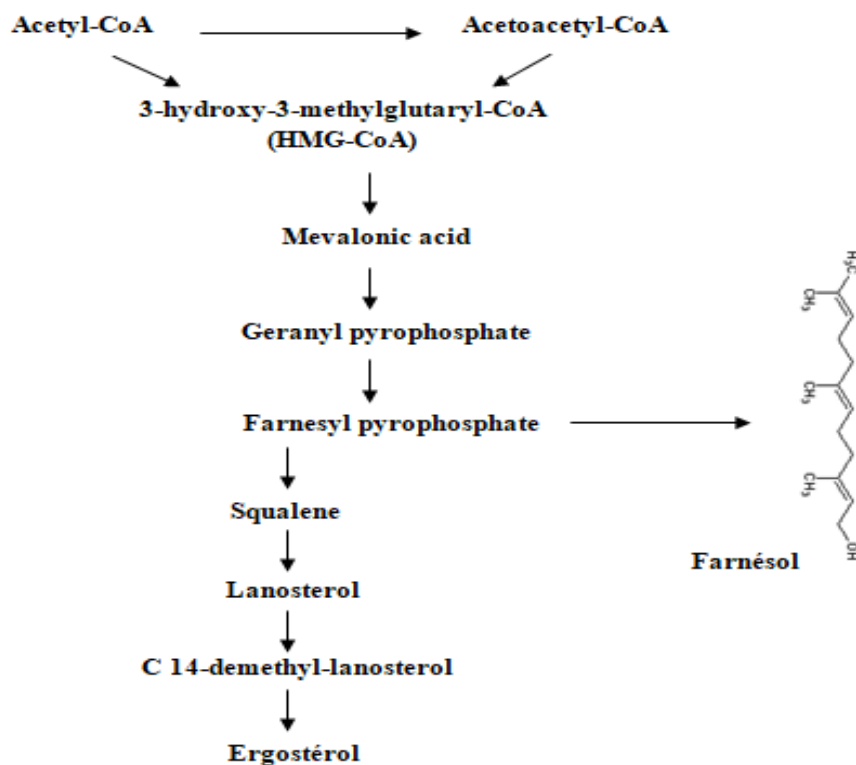


Figure 8: Biosynthèse du farnésol à partir du pyrophosphate de farnésol (Shea & Del Poeta, 2006).

II.2.1 Effet physiologique du farnésol sur la filamentation

Le farnésol est reconnu pour inhiber la transition entre la forme levure et la forme filamenteuse lorsque la densité cellulaire est élevée, ainsi que dans d'autres conditions qui favorisent la formation d'hyphes, telles que l'exposition au sérum, à la proline et à la N-acétylglucosamine. Cependant, il ne parvient pas à inhiber l'élongation des hyphes déjà formés (Han et *al.*, 2011). Il a été proposé que le farnésol soit sécrété par les cellules pour empêcher la formation de tubes germinatifs à un stade avancé du développement du biofilm. En conséquence, ce mécanisme favoriserait la dispersion des cellules de levure, facilitant ainsi leur colonisation de nouveaux milieux (Alem et *al.*, 2006).

Le farnésol régule la morphogénèse via plusieurs voies de signalisation (Figure 9). Parmi les plus étudiées, la voie Ras1-AMPC-PKA se distingue, dans laquelle le farnésol se lie à l'adénylcyclase Cyr1, réduisant les niveaux intracellulaires d'AMPC et réprimant la transition vers la forme hyphale (Kovács & Majoros, 2020). Cette inhibition de la signalisation de l'AMPC contribue également à la protection contre le stress oxydatif en

régulant la transcription des gènes *CAT1* (catalase) et *SOD* (superoxyde dismutase) (Polke et al., 2018).

La kinase Chk1 pourrait aussi servir de récepteur au farnésol, ce qui entraîne une diminution de la transcription de Nrg1, principal inhibiteur du développement des hyphes (Tian et al., 2021). Le farnésol interagit par ailleurs avec les voies des MAP kinases en réduisant l'expression des gènes *HST7* et *CPH1* et augmentant la phosphorylation de Hog1. Inversement, la MAPK Cek1, liée à la morphogenèse, est réprimée par le farnésol (Han et al., 2011 ; Polke et al., 2018). Enfin, le farnésol régule plusieurs gènes liés à la morphogenèse, en inhibant *CRK1* (sérine/thréonine-protéine kinase 1) et *PDE2* (phosphodiesterase 2 associée à la formation d'hyphes), tout en activant *TUP1* (corépresseur transcriptionnel général 1) (Han et al., 2011 ; Shea & Del Poeta, 2006).

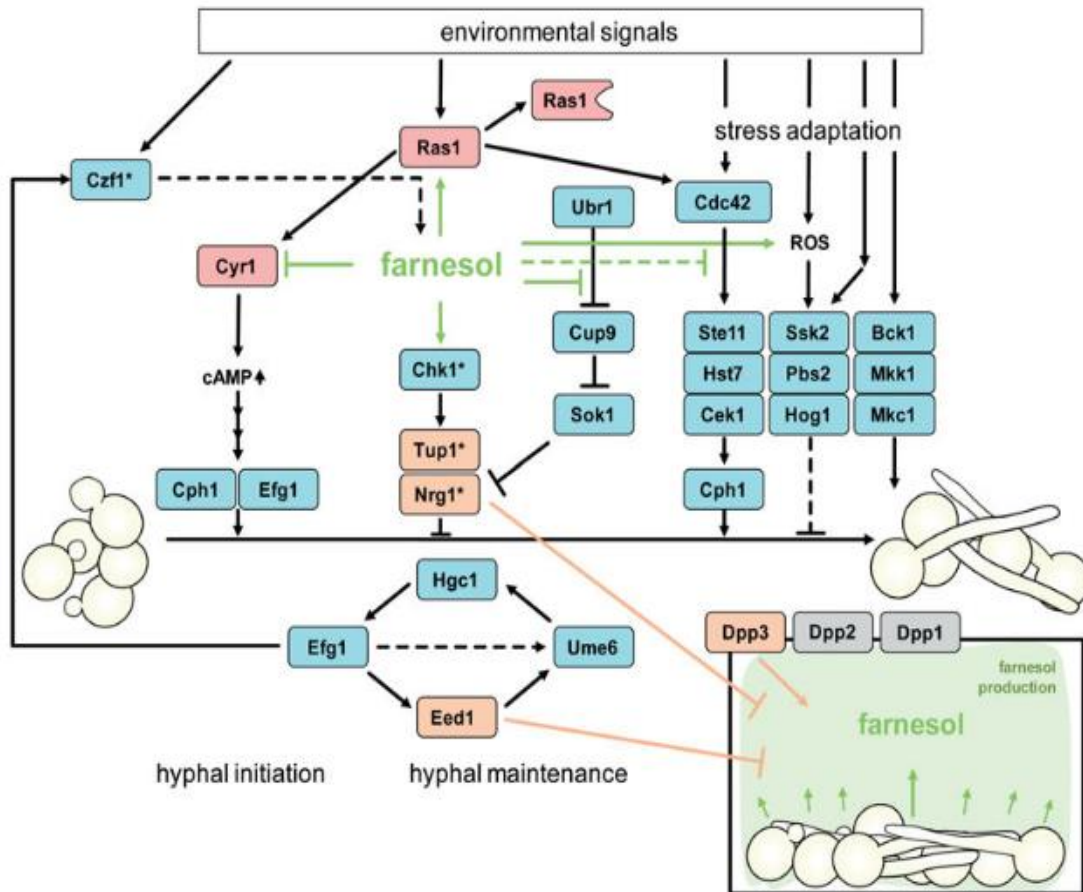


Figure 9: Les différentes voies de signalisation du farnésol chez *C. albicans* impliquées dans la formation d'hyphes (Polke et al., 2018).

II.2.2 Effet sur la formation de biofilm

Le quorum sensing joue un rôle essentiel dans plusieurs étapes de la formation du biofilm, notamment l'adhésion, l'architecture du biofilm mature et la dispersion des cellules. Comme mentionné précédemment, le farnésol inhibe spécifiquement la formation des hyphes, ce qui entraîne une réduction de la formation de biofilm. En outre, au-delà de son rôle dans la régulation de la morphologie de *C. albicans*, le farnésol peut également atténuer la résistance des biofilms aux antifongiques en modulant l'expression de Cyr1 et de Pde2 (Rodrigues & Černáková, 2020). Dans une étude menée par Ramage et al. (2002), les auteurs ont exploré les effets du farnésol sur le développement du biofilm. Ils ont découvert qu'une incubation avec du farnésol au début de la phase d'adhésion entraînait une inhibition complète de la formation du biofilm. En revanche, une fois que les cellules avaient commencé à filamento, l'ajout de farnésol n'avait aucun effet sur le développement. Cependant, il a été observé que les cellules des biofilms matures réagissaient au farnésol, ce qui pourrait influencer leur dispersion. Une étude menée par Kruppa et al. (2004) a révélé que, dans les mutants de l'histidine kinase Chk1p de *C. albicans*, le farnésol ne parvenait pas à inhiber la filamentation ni la formation de biofilm.

Il a été démontré que le farnésol peut également perturber le système de communication d'autres espèces. Par exemple, il réprime la production du signal de quorum sensing de la quinolone chez *Pseudomonas aeruginosa* (Cugini et al., 2007). Cette découverte pourrait contribuer au développement de stratégies visant à lutter contre les infections associées à la co-colonisation de *C. albicans* et de *P. aeruginosa*. De plus, le farnésol exerce des effets perturbateurs sur la morphogénèse et présente des propriétés antifongiques contre diverses espèces de champignons (Derengowski et al., 2009 ; Semighini et al., 2006).

II.2.3 Effet sur le stress oxydatif

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du farnésol dans la modulation des protéines de *C. albicans* impliquées dans la protection contre le stress oxydatif (Deveau et al., 2010 ; Shirliff et al., 2009). Westwater et al. (2005) ont montré qu'un milieu conditionné issu de cultures de *C. albicans* en phase stationnaire conférait une protection contre des agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, ainsi que contre des générateurs d'anions superoxyde tels que la ménadione et la plumbagine. Ce milieu conditionné induit l'expression des gènes *CAT1*, *SOD1* et *SOD2*, qui codent pour des enzymes antioxydantes. Ces résultats suggèrent que la régulation transcriptionnelle des gènes antioxydants pourrait sous-tendre

cette protection. Cependant, le farnésol, administré seul, n'a pas reproduit complètement les effets protecteurs du milieu conditionné, ce qui laisse penser que d'autres composés présents dans le milieu conditionné contribuent probablement à renforcer la résistance de *C. albicans* au stress oxydatif.

II.2.4 Effet sur la résistance aux médicaments

Plusieurs études ont démontré que le farnésol contribue à la réduction de la résistance des cellules de *Candida*, y compris dans les biofilms, aux agents antifongiques. En effet, le farnésol peut être considéré comme un agent protecteur lors de la candidose buccale (Polke et al., 2018). Il inhibe de manière compétitive l'efflux de composés antifongiques médiés par les transporteurs de médicaments ABC, tels que Cdr1p et Cdr2p, tout en n'affectant pas la protéine de pompe d'extrusion multi-drogues CaMdr1p, qui appartient à la superfamille des principaux facilitateurs (MFS). De plus, le farnésol peut potentialiser les effets des azoles et des polyènes en augmentant les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans *C. albicans* (Sharma & Prasad, 2011).

Le farnésol a été également étudié pour ses propriétés anticancéreuses et ses effets immuno-modulateurs, avec des applications potentielles dans le traitement de l'asthme et des troubles inflammatoires métaboliques (Kruppa et al., 2004). Il peut aussi stimuler la formation de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) en activant des voies spécifiques de signalisation via les récepteurs Mac-1 et TLR2, dépendantes des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, le farnésol contribue au remodelage de la paroi cellulaire de *C. albicans*, un processus qui permet au champignon d'échapper ou de renforcer la réponse immunitaire de l'hôte (Rodrigues & Černáková, 2020).

II.3 Tyrosol

Le tyrosol (2-(4-hydroxyphényl)-éthanol), une autre molécule de quorum sensing utilisée par *C. albicans*, appartient au groupe des composés phénoliques appelés phényléthanoïdes. Il est dérivé de la tyrosine et synthétisé par l'une des deux voies, soit par la tyramine, soit à partir du 4-hydroxyphénylacétaldéhyde (Figure 10) (Rodrigues & Černáková, 2020). Les concentrations de tyrosol dépendent des conditions de croissance, notamment des niveaux d'oxygène, de la disponibilité des acides aminés aromatiques et des sels d'ammonium, ainsi que du pH. Ghosh et al. (2008) ont démontré qu'il est possible d'augmenter sa concentration simplement en ajoutant de la tyrosine ou des sels d'ammonium dans le milieu de culture. Ils ont identifié le régulateur de transcription Aro80p comme un élément clé dans la

biosynthèse de cette molécule. L'expression des gènes *ARO8*, *ARO9* et *ARO10*, impliqués dans la voie de synthèse des acides aminés aromatiques, est régulée par le pH : *ARO8* et *ARO9* présentent une régulation à la hausse en milieu alcalin, alors que *ARO10* est régulé à la baisse dans les mêmes conditions. En outre, la sécrétion de tyrosol semble liée à la protéine Dpp3, ce qui suggère un rôle potentiel de cette protéine dans la modulation de la libération de tyrosol et d'alcools phénythyliques, qui fonctionnent comme molécules de signalisation chez *Candida* (Sabra et al., 2014).

Chez *C. albicans*, l'identification du tyrosol repose sur l'observation de sa capacité à réduire significativement la phase de latence. Libéré en continu dans le milieu de culture pendant la phase exponentielle de croissance, il contribue à diminuer la durée de la phase de latence et à stimuler la germination des cellules. Sa concentration dans le milieu augmente proportionnellement avec le nombre de cellules fongiques présentes. Le tyrosol favorise également la formation d'hyphes lors des phases précoces et intermédiaires de la formation du biofilm de *C. albicans* (Alem et al., 2006). Cependant, contrairement au farnésol, les mécanismes par lesquels le tyrosol exerce ses effets restent encore peu connus (Tian et al., 2021).

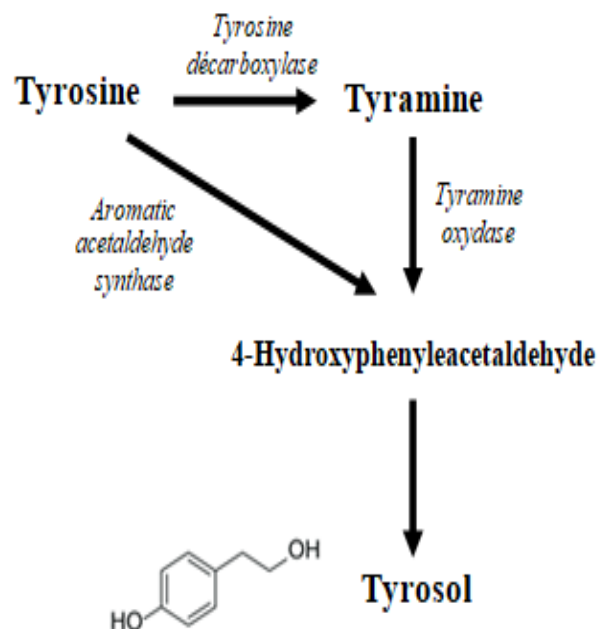


Figure 10: Biosynthèse du tyrosol à partir de la tyrosine (Rodrigues & Černáková, 2020).

II.3.1 Effet du tyrosol sur la formation des biofilms

La concentration de tyrosol est positivement corrélée à l'augmentation de la biomasse des cellules planctoniques et des biofilms de *C. albicans*. En plus de stimuler la filamentation, il joue un rôle crucial dans la maturation du biofilm. Par ailleurs, les biofilms libèrent environ 50% de tyrosol en plus par rapport aux cellules planctoniques (Kovács & Majoros, 2020). Une étude utilisant des mutants tels que CaPPZ1 (protéine phosphatase Z1 spécifique des champignons) et HGC1 (cycline associée à la formation des hyphes), a démontré que le tyrosol favorise l'adhérence et accélère la transition de la levure vers la forme hyphale (Nagy et al., 2014).

Le développement du biofilm est influencé par la concentration des molécules de signalisation. Au cours de cette progression, une prédominance du tyrosol est observée, capable de stimuler la production d'hyphes durant les stades initiaux (1 à 6 h) de la formation du biofilm, avant que certaines cellules ne commencent à adopter un mode de croissance hyphale. En revanche, l'activité du farnésol augmente de manière significative lors des dernières étapes (48 à 72 h), ce qui suggère que, dans les biofilms matures, l'activité et la concentration de farnésol surpassent celles du tyrosol (Rodrigues & Černáková, 2020). De plus, il a également été suggéré que l'effet du tyrosol peut être inhibé par la présence de farnésol. Alem et al. (2006) ont démontré que le traitement d'un biofilm avec 50 μ M de farnésol, en présence de concentrations plus élevées de tyrosol (0,1–1 mM), neutralise l'effet inhibiteur du farnésol sur la filamentation, permettant ainsi le développement des filaments. Cependant, à des concentrations plus élevées de farnésol, l'ajout de tyrosol ne compense plus cet effet, et les cellules restent majoritairement sous forme de levure.

II.3.2 Effet sur le stress oxydatif

Les travaux de Cremer et al. (1999) ont montré que le tyrosol agit comme un antioxydant et protège les cellules de *C. albicans* en inhibant les granulocytes neutrophiles. Cette action réduit la réponse oxydative des phagocytes, permettant ainsi aux cellules de mieux résister aux mécanismes de défense de l'hôte. En revanche, dans une autre approche, Westwater et al. (2005) ont constaté que l'ajout de tyrosol exogène n'offrait pas de protection aux cellules de *C. albicans* exposées au peroxyde d'hydrogène.

II.3.3 Effet antimicrobien

Tout comme le farnésol, le tyrosol possède également des propriétés antifongiques. En effet, son administration a montré une amélioration de la réponse au stress oxydatif et une

augmentation de l'expression des gènes codant pour les pompes d'efflux, tout en inhibant plusieurs gènes associés à la virulence. Cependant, le tyrosol seul présente une efficacité limitée dans la réduction des biofilms, ce qui a conduit plusieurs chercheurs à explorer diverses interactions entre le tyrosol et des agents antifongiques. Par exemple, la combinaison de tyrosol avec le fluconazole a donné lieu à des effets antagonistes sur les biofilms matures (Cordeiro et al., 2015 ; Rodrigues & Černáková, 2020), tandis qu'une autre interaction avec l'amphotéricine B a permis une réduction des biofilms matures (Cordeiro et al., 2015).

Une autre étude a examiné l'interaction entre le tyrosol et le farnésol, révélant un effet antibiofilm (Sebaa et al., 2019). L'effet du tyrosol pourrait également avoir un impact sur la survie des bactéries dans les biofilms mixtes, tels que ceux formés par *P. aeruginosa* et *C. albicans*. Des études ont révélé que le tyrosol présente des propriétés antibactériennes, notamment en inhibant de manière significative la production d'hémolysine et de protéase par *P. aeruginosa* (Abdel-Rhman et al., 2015).

II.4 Rôle du quorum sensing dans les infections fongiques

Face aux systèmes de défense de l'hôte, aux stress environnementaux ou encore aux traitements antimicrobiens, les espèces fongiques peuvent activer divers systèmes d'adaptation grâce à la communication cellulaire.

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de la régulation du quorum sensing dans les mécanismes d'adaptation de certaines espèces. Navarathna et al. (2007) ont montré que le farnésol, en tant que facteur de virulence majeur de *C. albicans*, contribue à la suppression des réponses immunitaires de l'hôte. En effet, l'administration exogène de farnésol a entraîné une inhibition des cytokines Th1, telles que l'interféron- γ (IFN- γ) et l'interleukine-12 (IL-12), produites par les macrophages pour stimuler l'immunité contre la candidose systémique. De manière complémentaire, Ghosh et al. (2010) ont observé que *C. albicans* de type sauvage peut échapper aux macrophages en stimulant la biosynthèse de l'arginine, ce qui favorise la transition des levures en hyphes. Leur étude a également révélé que dans les macrophages murins RAW264.7, l'expression de l'IL-6 était réduite en présence de farnésol, ce qui pourrait diminuer la réponse inflammatoire.

En revanche, le farnésol peut stimuler les cellules immunitaires innées, telles que les neutrophiles et les monocytes, ce qui entraîne une augmentation de l'inflammation. Cependant, il empêche les monocytes de se développer en cellules dendritiques immatures

(Tian et *al.*, 2021). D'autres molécules de signalisation, telles que le tyrosol, ont également un impact sur les cellules immunitaires, en particulier en réduisant l'explosion respiratoire des neutrophiles (Cremer et *al.*, 1999).

Il a également été montré que le farnésol induit la mort cellulaire et l'apoptose, principalement en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires. Ce phénomène résulte de l'inhibition de la voie Ras1-cAMP par le farnésol (Deveau et *al.*, 2010). Une autre recherche menée par Joung & Jetten (2008) a montré que le farnésol pouvait provoquer l'apoptose dans les cellules de carcinome pulmonaire en réponse au stress du réticulum endoplasmique. Ils ont également observé que le farnésol favorisait l'expression de gènes inflammatoires en activant la voie NF- κ B, notamment à travers la phosphorylation de p65/RelA (Ser276) par la voie MEK1/2-ERK1/2. Ces expériences soutiennent donc l'idée que les molécules de signalisation jouent un rôle crucial dans la virulence des infections fongiques.

Chapitre III

Les plantes médicinales

III. Les plantes médicinales locales

III.1 Les substances naturelles

L'augmentation du risque de maladies fongiques, en particulier chez les patients immunodéprimés, ainsi que l'émergence de pathogènes résistants, la toxicité des traitements existants et le répertoire limité de traitements antifongiques disponibles, ont mis en évidence la nécessité de développer de nouvelles solutions thérapeutiques. Ces défis ont intensifié les efforts de recherche visant à découvrir des agents antifongiques plus efficaces et sûrs d'origine naturelle (Udemezue, 2021). Ces produits naturels peuvent provenir de diverses sources, soit d'un organisme entier (plante, animal ou micro-organisme) non transformé, soit d'une partie spécifique de cet organisme, comme des feuilles ou des fleurs. Ils peuvent également être obtenus sous forme d'extraits de l'organisme ou de ses parties, tels que des huiles essentielles, ou sous forme de composés purs isolés, comme les alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides et autres substances bioactives.

Cependant, la recherche de nouveaux médicaments à partir de produits naturels repose sur trois stratégies principales (Sticher, 2008).

- La première consiste à utiliser directement certains produits naturels, comme la vincristine extraite de *Catharanthus roseus*, en tant que médicaments.
- La deuxième stratégie consiste à tirer parti de substances naturelles, comme la diosgénine de *Dioscorea floribunda*, qui servent de précurseurs pour créer des médicaments plus complexes.
- Enfin, la troisième approche consiste à s'inspirer des produits naturels pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, permettant ainsi le développement d'analogues synthétiques, comme ceux de la pénicilline.

III.2 Les plantes médicinales

Les plantes médicinales, également appelées « drogues médicinales », sont définies par la Pharmacopée européenne comme des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicinales. Cependant, il est rare d'utiliser la plante entière; on utilise plutôt une ou plusieurs de ses parties, qui peuvent avoir différentes utilisations. Par conséquent, le terme plante médicinale fait souvent référence non seulement à la plante elle-même, mais aussi aux parties spécifiques qui sont exploitées (Vercauteren, 2012).

Ces plantes sont essentielles à la médecine traditionnelle, avec plus de 3,3 milliards de personnes dans les pays en développement qui s'en servent régulièrement. Elles représentent également une précieuse source d'ingrédients pour le développement et la synthèse de nouveaux médicaments (Singh, 2015).

En Algérie, la médecine traditionnelle, et en particulier la phytothérapie, occupe une place essentielle dans la culture locale. De nombreux chercheurs ont exploré ces traditions et ont publié des ouvrages sur la phytothérapie et l'ethnobotanique. Malgré ces recherches, le potentiel de la biodiversité algérienne reste largement inexploité. En effet, le pays bénéficie d'une variété floristique impressionnante, issue de ses différents écosystèmes, allant des régions méditerranéennes du nord aux chaînes de montagnes de l'Atlas, et s'étendant jusqu'aux vastes étendues du désert du Sahara, offrant ainsi de nombreuses opportunités pour la recherche de nouveaux produits naturels à des fins médicinales (Benarba, 2016 ; Miara et *al.*, 2019).

III.2.1 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés organiques que l'on trouve naturellement dans les plantes, répartis dans les différentes cellules, tissus et organes. Ces composés se classent en fonction de divers critères, tels que leur structure chimique, leur voie de biosynthèse ou leur solubilité. On distingue principalement trois grandes catégories : les composés azotés (comme les alcaloïdes, les glucosinolates et les glycosides cyanogéniques), les composés phénoliques (tels que les flavonoïdes et les phénylpropanoïdes) et les terpènes (ou isoprénoïdes) (Kabera et *al.*, 2014 ; Li et *al.*, 2020). Bien qu'ils ne contribuent pas directement à la croissance des plantes, ces métabolites jouent un rôle essentiel dans leur défense contre divers pathogènes et prédateurs, y compris les champignons, bactéries et insectes. Les huiles essentielles et les phénols figurent parmi les composés les plus notables pour leurs propriétés bioactives (Li et *al.*, 2020 ; Singh, 2015).

III.2.1.1 Les polyphénols

Les composés phénoliques, caractérisés par la présence d'au moins un cycle aromatique à six carbones portant des fonctions hydroxyles (OH), incluent une grande variété de molécules organiques, souvent dotées de fonctions carboxyliques et hydroxyles phénoliques. Dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique, ces composés regroupent plus de 8 000 molécules classées en diverses familles telles que les phloroglucinols, quinones, stilbénoloïdes, coumarines, anthocyanes, tanins, flavonoïdes et acides phénoliques (Figure 11)

(Manach et *al.*, 2004). La diversité de leurs structures, souvent modifiées par acylation ou glycosylation, leur confère une vaste gamme de polarités et de propriétés. Ces composés sont particulièrement prisés en phytothérapie et en pharmacologie pour leurs effets thérapeutiques variés.

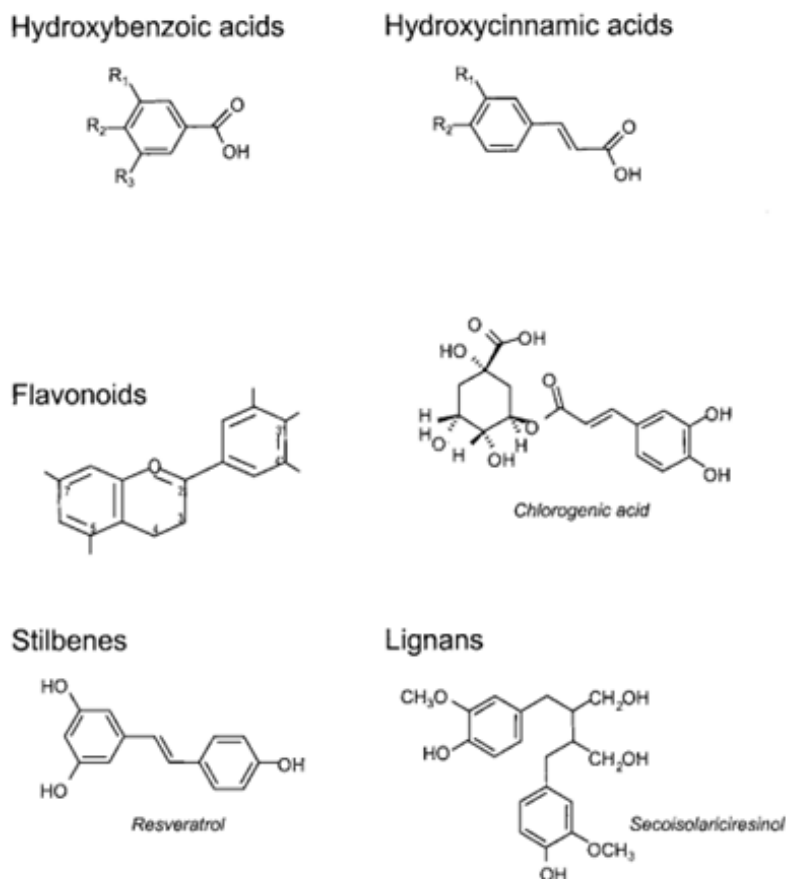


Figure 11 : Structures chimiques des polyphénols (Manach et *al.*, 2004).

III.2.1.1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune et possèdent une structure de base composée de quinze atomes de carbone (C6-C3-C6), formée de deux cycles aromatiques reliés par un hétérocycle pyranique central. On distingue plusieurs types de flavonoïdes (Figure 12) en fonction de la position du noyau B sur l'hétérocycle C et des modifications chimiques (Manach et *al.*, 2004) :

- Flavan : lorsque le noyau B est en position 2 sur l'hétérocycle C.
- Isoflavane : lorsque le noyau B est en position 3.
- Flavanone : lorsque la position 4 du flavan porte un groupe carbonyle.
- Flavone : si la liaison entre C2 et C3 est insaturée.
- Flavonol : Il s'agit d'une flavone comportant un groupe hydroxyle en position 3.

Ces structures influencent les propriétés bioactives des flavonoïdes, qui jouent un rôle dans la pigmentation des fleurs, ainsi que dans les mécanismes de défense contre les rayons UV, les herbivores et les infections microbiennes (Kabera et *al.*, 2014).

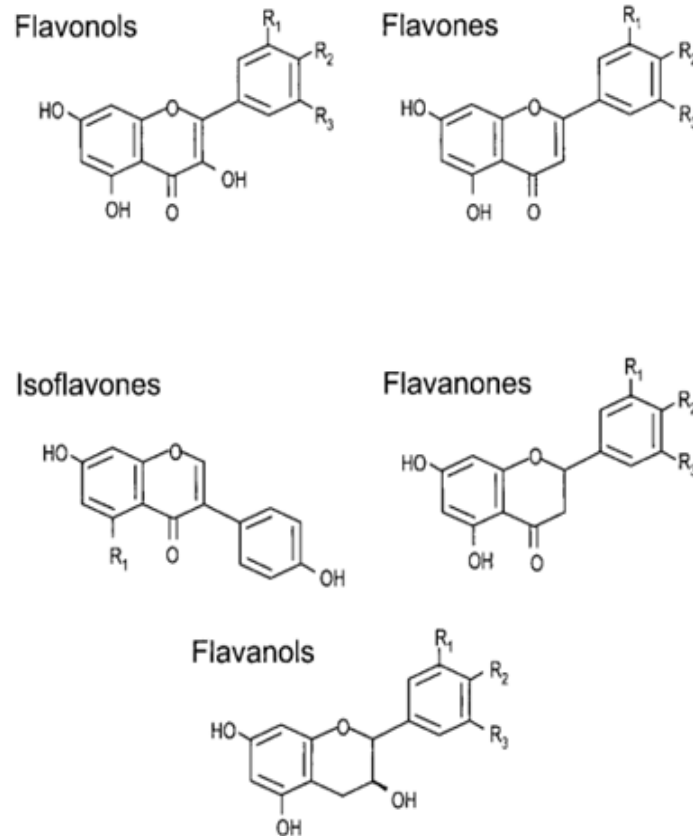


Figure 12: Structures chimiques de flavonoïdes (Manach et *al.*, 2004).

III.2.1.1.2 Les tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires complexes, classés comme polyphénols hydrosolubles avec une masse moléculaire variant de 500 à plusieurs milliers de daltons. Ils forment un groupe diversifié d'oligomères et de polymères capables d'interagir et de se lier aux protéines, à l'amidon, à la cellulose et aux minéraux. Ces interactions contribuent à leurs propriétés biologiques et écologiques, notamment leur rôle protecteur contre les attaques de pathogènes et d'herbivores. Les tanins se divisent en deux grandes catégories (Bennick, 2002):

- Les tanins hydrolysables sont constitués d'un alcool polyhydrique, tel que le glucose, auquel sont liés l'acide gallique ou son dimère, l'acide hexahydrodiphénique, par des liaisons ester (Figure 13 A). Des variations structurelles apparaissent lorsque des molécules supplémentaires d'acide gallique se lient de manière spécifique à d'autres

parties d'acide gallique. Ces composés peuvent être facilement hydrolysés dans un milieu alcalin, libérant un alcool polyhydrique et de l'acide gallique (pour les gallotannins) ou de l'acide ellagique (pour les ellagitannins).

- Les tanins condensés, appelés proanthocyanidines, sont constitués d'unités monomériques de flavan-3-ols, telles que la catéchine ou l'épicatéchine, reliées par des liaisons carbone-carbone (C-C) (Figure 13 B). Sous l'effet d'un acide fort et de la chaleur, ces structures peuvent se décomposer, libérant des pigments anthocyanidiques et d'autres produits dérivés.

Leur importance ne se limite pas à la protection des plantes; les tanins ont aussi des applications notables dans le domaine médical et pharmacologique. Ils sont également valorisés en phytothérapie pour leurs propriétés médicinales, notamment en tant qu'astringents contre la diarrhée, diurétiques pour traiter les tumeurs gastriques et duodénales, ainsi qu'agents anti-inflammatoires (Kabera et *al.*, 2014).

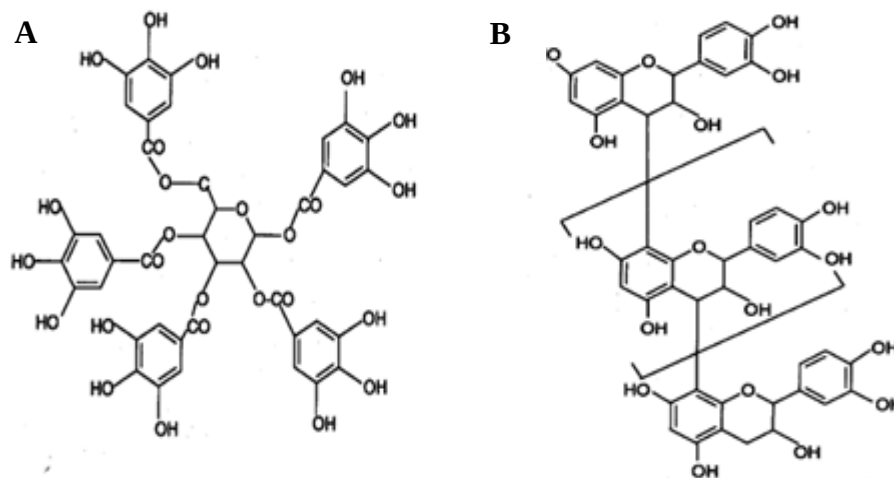


Figure 13: Structures chimiques des tanins (Bennick, 2002).

III.2.1.2 Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, également appelés isoprénoïdes, constituent l'une des plus anciennes familles de produits naturels. Le terme "terpène" fait référence à des hydrocarbures insaturés dérivés de l'isoprène. Les terpénoïdes englobent une large gamme de composés, avec plus de 55 000 structures connues, qui présentent une diversité structurale remarquable (Figure 14),

allant de simples chaînes linéaires à des structures carbonées plus complexes (Christianson, 2008).

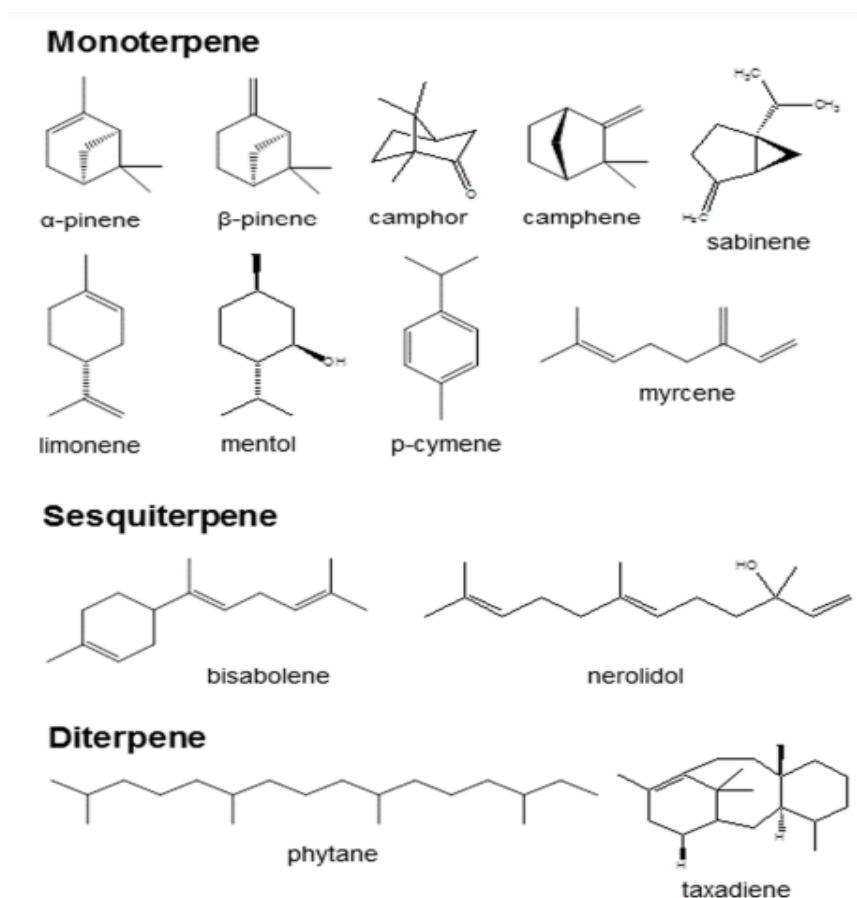


Figure 14: Structures chimique des terpènes (Cho et *al.*, 2017).

III.2.1.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels d'origine principalement végétale, contenant au moins un atome d'azote et présentant un caractère basique variable. Depuis l'isolement de la morphine en 1806, plus de 10 000 alcaloïdes ont été identifiés, principalement dans les plantes à fleurs, bien que certains se trouvent également chez des animaux, comme les fourmis et les grenouilles. Ces composés sont relativement stables et dérivent principalement d'acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane. Leur structure peut être simple ou complexe (Figure 15), et ils peuvent s'accumuler dans différentes parties de la plante (écorce, racines, feuilles ou fruits), indépendamment de leur site de synthèse (Aniszewski, 2007).

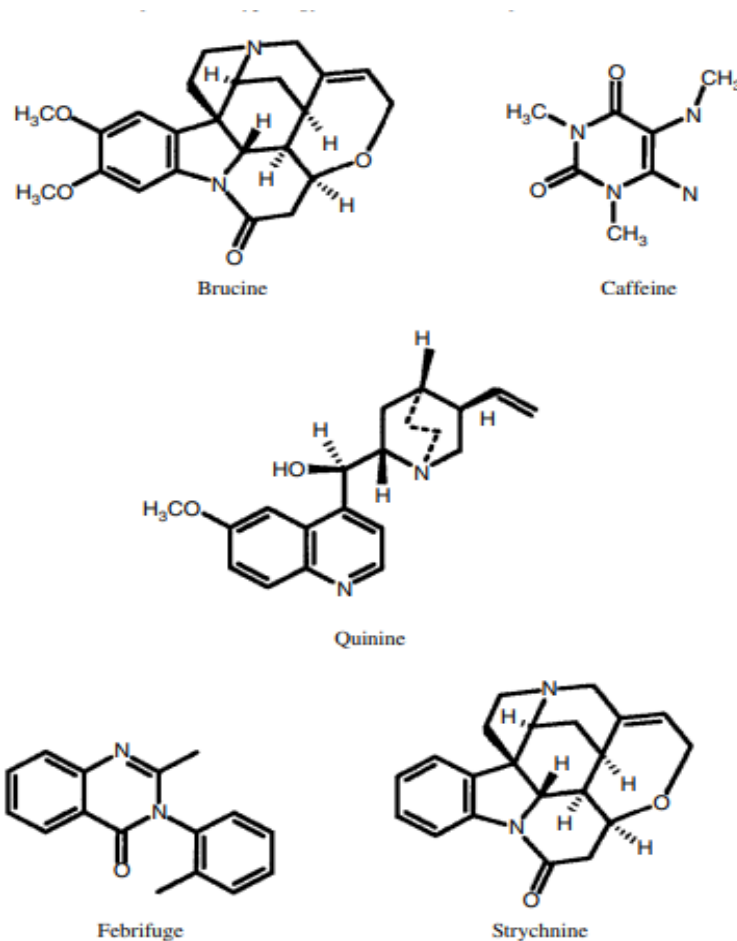


Figure 15: Structures chimiques des alcaloïdes (Aniszewski, 2007).

III.2.2 Les huiles essentielles

Le terme huile essentielle est apparu au XVI^e siècle et trouve son origine dans l'expression *Quinta essentia*, employée par Paracelse von Hohenheim en Suisse pour désigner l'essence concentrée d'une substance (Guenther et *al.*, 1959).

Les huiles essentielles sont définies de différentes manières, mais l'une des définitions les plus précises est celle de l'Association Française de Normalisation (AFNOR), établie dans la norme NF T 75-006, qui décrit *l'huile essentielle comme un produit extrait de matière végétale par entraînement à la vapeur d'eau, par procédés mécaniques appliqués à l'épicarpe des agrumes, ou encore par distillation « sèche »* (AFNOR, 2000).

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) propose une définition similaire, précisant qu'une huile essentielle est un « *produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, par distillation à la vapeur d'eau, par des procédés mécaniques pour les agrumes, ou par distillation à sec, suivi d'une séparation de la phase aqueuse, si*

nécessaire, par des procédés physiques ». L'ISO ajoute que l'huile essentielle peut subir des traitements physiques qui n'altèrent pas de manière significative sa composition (ISO, 1997).

Les huiles essentielles sont donc des mélanges complexes composés de nombreux constituants. Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes (huile végétale ou graisse), mais insolubles dans l'eau. Ces huiles volatiles, généralement incolores et liquides à température ambiante, dégagent une odeur caractéristique et aromatique. Elles sont agréables au toucher, facilement absorbées par la peau, et possèdent une densité généralement inférieure à celle de l'eau, bien que certaines huiles, comme celles de cannelle, de saffron et de vétiver, fassent exception. Elles se distinguent également par un indice de réfraction et une activité optique très élevés (Ríos, 2015).

III.2.2.1 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont souvent considérées comme des métabolites secondaires. Elles peuvent être stockées dans des cellules non différenciées, comme celles des *Lauraceae*, ou dans des structures spécialisées telles que les poils glandulaires des *Lamiaceae* et *Asteraceae*, les canaux sécrétoires schizogènes des *Myrtaceae*, ou encore dans des cavités présentes chez les Conifères (Ríos, 2015).

On les retrouve dans toutes les parties de la plante : les fleurs (comme le bergamotier et la tubéreuse), les feuilles (comme la citronnelle, l'eucalyptus et le laurier), les écorces (comme le cannellier), le bois (comme le bois de rose et le santal), les racines (comme le vétiver), les rhizomes (comme le curcuma et le gingembre), ainsi que dans les fruits (tels que la toute-épice et l'anis) et les graines (comme la muscade). Dans certains cas, l'huile essentielle n'est pas synthétisée directement dans la plante, mais elle est produite par l'hydrolyse de certains composés présents dans celle-ci, comme c'est le cas pour la valériane et l'ail (Ríos, 2015 ; Bruneton, 1993).

III.2.2.2 La composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui peuvent renfermer plus de 300 composés chimiques différents. Elles se composent principalement de substances organiques volatiles et lipophiles, dont la plupart affichent un faible poids moléculaire, souvent inférieur à 300 (Ríos, 2015). Une large part des composants présents dans les huiles essentielles appartient à la famille des terpènes, pour laquelle plusieurs milliers de variétés ont été identifiées. Parmi ces derniers, on trouve des dérivés fonctionnalisés, tels que les alcools (géraniol, α -bisabolol), les cétones (menthone, p-vétivone), les aldéhydes (citronellal,

sinensal), les esters (acétate de γ -tépinyle, acétate de cédryle) et les phénols (thymol) (Dhifi et *al.*, 2016).

En outre, les huiles essentielles renferment également des composés non terpéniques. Bien que moins courants que les terpènes, les substances aromatiques dérivées du phénylpropane constituent une autre catégorie de composés volatils présents dans les huiles essentielles. Cette classe inclut des molécules odorantes bien connues telles que l'eugénol, le cinnamaldéhyde et le safrole (Dhifi et *al.*, 2016).

III.2.2.3 Procédés d'extraction des huiles essentielles

Avant toute utilisation ou analyse, les huiles essentielles doivent être extraites de la plante. Plusieurs méthodes d'extraction peuvent être employées, chacune influençant de manière significative la composition chimique des huiles. Il est donc essentiel de sélectionner avec soin la méthode la plus adaptée pour isoler efficacement les composés bioactifs (Reyes-Jurado et *al.*, 2015).

III.2.2.3.1 Entraînement à la vapeur

La distillation à vapeur d'eau, une technique ancienne, utilise la chaleur pour extraire les composés volatils des plantes. La vapeur, en pénétrant les cellules végétales, libère les molécules aromatiques qui sont ensuite transportées vers le condenseur, où elles se liquéfient. Ce processus aboutit à la formation de deux phases distinctes : une phase hydrosoluble et une phase insoluble. L'huile essentielle est isolée par décantation de cette phase insoluble (Stratakos & Koidis, 2015).

III.2.2.3.2 Hydrodistillation

L'hydrodistillation, également appelée méthode de Clevenger, est la méthode d'extraction la plus couramment utilisée pour obtenir des huiles essentielles. Ce procédé de distillation hétérogène consiste à immerger la matière végétale dans de l'eau distillée, chauffée jusqu'à ébullition sous pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes sont libérées et entraînées par la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation permet de séparer l'eau et l'huile essentielle par décantation, en raison de leur différence de densité. La durée de l'hydrodistillation varie en fonction du type de plante, ce qui peut influencer à la fois le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle obtenue. Cette méthode est particulièrement efficace pour extraire les huiles essentielles de plantes

aromatiques riches en composés volatils non solubles dans l'eau et résistants à la chaleur (Roohinejad et *al.*, 2017).

III.2.2.3.3 Extraction par solvant

L'extraction par solvant est une technique couramment utilisée pour isoler des huiles essentielles, en particulier celles qui sont thermosensibles. Ce procédé implique l'immersion de la matière végétale dans un solvant approprié, qui dissout les composés volatils présents. Après extraction, le mélange liquide, contenant l'huile essentielle et d'autres substances, est filtré puis soumis à une distillation pour séparer les différents composants (Stratakos & Koidis, 2015).

Un exemple d'extraction par solvant est l'extraction Soxhlet, où la poudre végétale est placée dans un dé à cellulose au sein d'une chambre d'extraction, qui est positionnée au-dessus d'un ballon collecteur et d'un condenseur à reflux. Le solvant est chauffé, et une fois qu'un certain volume de solvant condensé s'est accumulé dans le dé, il est siphonné dans le ballon en dessous (Reyes-Jurado et *al.*, 2015). Les solvants couramment utilisés dans ce type d'extraction incluent l'alcool, l'hexane, l'éthanol, l'éther de pétrole et le méthanol.

III.2.2.3.4 Extraction par fluide supercritique

Les méthodes conventionnelles d'extraction, comme la distillation à la vapeur et l'extraction par solvant, sont largement utilisées mais présentent des limitations, notamment des rendements faibles, la perte de composés volatils, des temps d'extraction prolongés et la présence éventuelle de résidus toxiques. Ces inconvénients ont encouragé le développement de techniques alternatives, dont l'extraction par fluide supercritique, une méthode innovante qui présente un intérêt croissant pour des applications industrielles (Stratakos & Koidis, 2015).

L'extraction par fluide supercritique (SFE) se compose de deux étapes principales l'extraction des composés solubles suivie de leur séparation, qui est réalisée en ajustant les conditions thermodynamiques. Cette technique utilise le dioxyde de carbone (CO₂) à l'état supercritique, où il présente des propriétés intermédiaires entre celles des gaz et des liquides, caractérisés par une densité élevée et une capacité de diffusion accrue. Ces propriétés permettent au CO₂ d'extraire efficacement les composés volatils des matrices végétales. La solubilité des composés extraits peut être modulée par des variations de pression et de

température, permettant ainsi un contrôle précis de la sélectivité de l'extraction (Reyes-Jurado et *al.*, 2015).

III.2.2.3.5 Extraction assistée par micro-ondes

Récemment, plusieurs études ont exploré l'utilisation des micro-ondes pour l'extraction d'huiles essentielles, montrant que les huiles obtenues en 30 min ou moins étaient comparables, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, à celles extraites avec des méthodes traditionnelles comme l'hydrodistillation ou Soxhlet, qui nécessitent souvent plus de temps. L'extraction par micro-ondes fonctionne en utilisant les micro-ondes comme source de chauffage pour le mélange solvant-échantillon. Ce mode de chauffage est instantané et se produit directement à l'intérieur de l'échantillon, grâce aux effets des micro-ondes sur la matière, notamment la rotation dipolaire et la conductivité ionique. Un des principaux avantages de cette technique est sa capacité à rompre rapidement les liaisons faibles, telles que les liaisons hydrogène, ce qui facilite l'extraction rapide des composés désirés (Reyes-Jurado et *al.*, 2015 ; Roohinejad et *al.*, 2017).

III.2.2.3.6 Enfleurage

L'enfleurage est une méthode traditionnelle d'extraction des huiles essentielles, remontant à l'Antiquité et souvent utilisée pour les fleurs délicates comme le jasmin. Ce procédé implique de placer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques en verre recouvertes d'une fine couche de graisse, qui absorbe les huiles essentielles sur une période de 24 à 72 h, selon la variété de la fleur. Une fois la graisse saturée, les pétales sont remplacés par d'autres, et ce cycle est répété jusqu'à obtenir la saturation désirée. Par la suite, un solvant est utilisé pour extraire les huiles essentielles de la graisse, laquelle est ensuite évaporée sous vide. Toutefois, cette méthode est aujourd'hui moins prisée en raison de son rendement limité et de sa complexité (Stratakis & Koidis, 2015).

III.2.2.4 Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles, en fonction de leur origine et de leur méthode d'extraction, offrent une gamme étendue d'applications. Elles sont largement utilisées dans divers secteurs industriels, notamment en aromathérapie pour leurs bienfaits thérapeutiques, ainsi que dans l'industrie pharmaceutique, où elles servent de principes actifs ou d'excipients dans la fabrication de médicaments. Par ailleurs, les huiles essentielles trouvent une utilisation croissante dans l'industrie agroalimentaire, où elles sont employées comme arômes naturels ou agents de conservation.

1. Dans l'industrie cosmétique, les huiles essentielles occupent une place importante, utilisées dans la fabrication de savons, détergents et parfums. Leur production mondiale est en constante augmentation, alimentée par la forte demande pour certaines plantes aromatiques spécifiques. Les chémotypes de plantes comme la sauge, la lavande et le thym sont particulièrement recherchés pour créer des fragrances originales et de haute qualité (Ríos, 2015).
2. Dans l'industrie pharmaceutique, les huiles essentielles sont valorisées pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques. Par exemple, l'huile essentielle d'eucalyptus est souvent utilisée comme expectorant pour traiter les affections respiratoires, telles que la toux et la bronchite, tandis que l'huile de menthe poivrée est appliquée comme décongestionnant. En dermatologie, l'huile d'arbre à thé est largement reconnue pour son efficacité antimicrobienne, notamment contre l'acné (Ríos, 2015). Par ailleurs, certaines huiles essentielles montrent un potentiel anticancéreux, ce qui suscite un intérêt croissant pour leur potentiel médical (Edris, 2007).
3. Dans le domaine alimentaire, les huiles essentielles sont appréciées non seulement pour leurs qualités aromatisantes, mais aussi pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Elles sont ainsi employées pour préserver la fraîcheur des produits et prolonger leur durée de conservation. En confiserie, dans les boissons, ou comme additifs naturels, elles contribuent à la saveur tout en jouant un rôle actif dans la sécurité et la qualité des aliments (García-Díez et *al.*, 2017 ; Ríos, 2015).

III.2.2.5 Activités biologiques des huiles essentielles

III.2.2.5.1 Activité antibactérienne

Les effets antibactériens des huiles essentielles sur les bactéries ont été largement documentés dans la littérature, attribués principalement à leur nature hydrophobe. Cette caractéristique favorise leur insertion dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne, altérant ainsi la structure membranaire et augmentant sa perméabilité, ce qui provoque des fuites d'ions et de molécules intracellulaires. Notons que les huiles essentielles montrent une plus grande efficacité contre les bactéries à Gram positif, en comparaison avec les bactéries à Gram négatif. Cette différence s'explique par la présence, chez les bactéries à Gram négatif, d'une membrane externe entourant la paroi cellulaire, composée de lipopolysaccharides, qui freine la diffusion des composés hydrophobes (Dhifi et *al.*, 2016). Il convient toutefois de noter que, comparées aux biocides chimiques comme les antibiotiques, les huiles essentielles présentent une activité antibactérienne souvent faible à modérée (Nakatsu et *al.*, 2000).

Par ailleurs, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est fortement influencée par leur composition chimique spécifique, notamment par la proportion et l'interaction des molécules volatiles présentes. Les huiles essentielles riches en aldéhydes et phénols, tels que le cinnamaldéhyde, le citral, le carvacrol, l'eugénol et le thymol, se distinguent par leur haute activité antibactérienne, tandis que celles contenant des alcools terpéniques possèdent une efficacité modérée. En revanche, les huiles comportant des cétones ou des esters, tels que le β -myrcène, l' α -thuyone ou l'acétate de géranyle, présentent une activité antibactérienne réduite, et les hydrocarbures terpéniques volatils sont généralement inactifs (Dhifi et *al.*, 2016).

III.2.2.5.2 Activité antifongique

L'utilisation des huiles essentielles comme agents antifongiques a suscité un intérêt croissant, notamment en raison de la résistance élevée observée chez certaines espèces fongiques. Plusieurs études ont évalué leur efficacité, telles que celles de Soyly et *al.* (2006) et de Soyly et *al.* (2010), qui ont testé diverses huiles essentielles d'herbes aromatiques comme l'origan (*Origanum syriacum*), le thym (*Thymbra spicata*), la lavande (*Lavandula stoechas*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le fenouil (*Foeniculum vulgare*) et le laurier (*Laurus nobilis*). Ces huiles ont montré une activité contre *Phytophthora infestans* et *Botrytis cinerea*, responsables respectivement du mildiou et de la pourriture grise de la tomate. Le traitement par les huiles essentielles peut entraîner la perte de l'intégrité de la paroi cellulaire et affecter la perméabilité de la membrane plasmique, provoquant ainsi des altérations morphologiques significatives des hyphes.

En ce qui concerne le pathogène humain *Candida*, des recherches menées par Zuzarte et *al.* (2012) ont mis en évidence l'effet antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* L., riche en phénols. De plus, Khan et *al.* (2010) ont observé que l'huile essentielle de *Coriaria nepalensis* Wall. présentait une activité cytotoxique contre des isolats de *Candida*, qu'ils soient sensibles ou résistants au fluconazole, en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire et en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol. De même, des études ont montré que l'huile essentielle de *Coriandrum sativum* L. se fixe à l'ergostérol de la membrane, ce qui accroît la perméabilité des ions et cause des altérations membranaires, conduisant ainsi à la mort cellulaire dans diverses souches de *Candida* (Freires et *al.*, 2014).

III.2.2.5.3 Activité anti-inflammatoire

Les premières études sur les huiles essentielles se sont concentrées sur leurs effets anti-inflammatoires, mettant en évidence leur potentiel pour le traitement des maladies inflammatoires.

L'inflammation est une réponse protectrice naturelle qui se déclenche suite à une lésion tissulaire ou une infection, visant à éliminer les agents pathogènes et les cellules endommagées. Elle se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire, un afflux de leucocytes, une production de cytokines (comme les interleukines et TNF- α), ainsi qu'une activation d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique.

Les molécules aromatiques peuvent moduler cette réponse inflammatoire, particulièrement dans des pathologies telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Par exemple, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* exerce une activité anti-inflammatoire, principalement due à l' α -terpinéol, son principal composé (Hart et *al.*, 2000). L'huile essentielle de géranium présente également des propriétés anti-inflammatoires notables (Maruyama et *al.*, 2005). Généralement, les composés actifs de ces huiles agissent en inhibant la libération d'histamine et en réduisant la production de médiateurs inflammatoires (Dhifi et *al.*, 2016).

III.2.2.5.4 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles repose principalement sur des constituants comme les phénols et les polyphénols, mais elle est également renforcée par d'autres composés tels que certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes. Ces substances naturelles sont envisagées comme alternatives aux conservateurs chimiques ou synthétiques, dont l'utilisation peut poser des risques pour la santé (Burt, 2004).

Les terpénoïdes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, présentent une forte activité antioxydante, principalement en raison de leurs propriétés redox, qui leur permettent de neutraliser les radicaux libres et de décomposer les peroxydes. Leur structure phénolique joue un rôle central dans ces effets (Burt, 2004). Ces composés sont majoritaires dans les huiles essentielles d'*Origanum tyttanthum* et de *Mentha longifolia*, ce qui explique leur haute activité antioxydante. D'autres huiles essentielles, comme celles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym, sont également reconnues pour leurs propriétés antioxydantes puissantes (Dhifi et *al.*, 2016).

III.2.2.6 Action toxique

Bien que naturelles et généralement bien tolérées, les huiles essentielles peuvent néanmoins présenter des risques pour la santé. Il est donc essentiel de bien identifier le produit, de respecter les doses recommandées et de choisir le mode d'administration approprié. Certaines plantes, comme *Arisarum vulgare*, *Anagyris foetida*, *Cerinth major*, *Ecballium elaterium*, *Olea europaea* var. *sylvestri*, et *Nerium oleander*, possèdent des propriétés toxiques, nécessitant une utilisation prudente (Meddour et *al.*, 2011).

Il convient également de mentionner des constituants tels que l'eugénol, le menthol et le thymol, qui, bien qu'efficaces dans le traitement des canaux radiculaires, sont connus pour provoquer une irritation des tissus buccaux lorsqu'ils sont mal utilisés. En outre, certaines huiles essentielles et leurs composants sont reconnus pour induire des dermatites de contact allergiques (Burt, 2004). Il est donc essentiel d'ajuster avec soin la dose administrée en tenant compte de plusieurs facteurs, tels que le type de plante, l'âge du patient, son état de santé général, ses antécédents médicaux, ainsi que la présence de maladies chroniques (Miara et *al.*, 2019).

III.3 Monographie des plantes choisies

III.3.1 *Origanum vulgare* L.

III.3.1.1 Origine et aspect botanique

O. vulgare L. est l'une des espèces les plus reconnues du genre *Origanum*, appréciée tant en médecine traditionnelle qu'en tant qu'épice culinaire. Connue sous les noms d'origan ou de marjolaine sauvage, elle est également surnommée « prince des herbes » (Alekseeva et *al.*, 2020). Le terme *Origanum* a été utilisé pour la première fois par Hippocrate, médecin grec de l'Antiquité (460 – 370 av. J.-C.), et tire son origine des mots grecs "oros" (montagne) et "ganos" (joie), signifiant « joie des montagnes ». L'espèce est largement distribuée dans la région méditerranéenne, en particulier dans les pays d'Afrique du Nord comme l'Algérie et la Tunisie (Meddour et *al.*, 2011), ainsi que dans les zones euro-sibériennes et irano-touraniennes. Cette plante est connue en Algérie sous le nom vernaculaire de "Zâitra" en arabe, et "Timzizzezt" en kabyle. Depuis des siècles, elle est récoltée pour ses huiles essentielles, utilisées pour parfumer des plats traditionnels et traiter divers maux tels que la toux, les affections cutanées, les rhumes et les troubles digestifs (Lukas et *al.*, 2015).

O. vulgare est une plante herbacée vivace, mesurant de 30 à 80 cm de hauteur et présentant une période de floraison de mai à octobre (Ietswaart, 1980). Elle possède des

bractées ou feuilles atypiques entourant le calice et la corolle (Figure 16). Ses feuilles, de couleur vert olive et de forme de pique, sont recouvertes de trichomes, de fins poils. Le feuillage et les fleurs, très odorants, contiennent des glandes productrices d'huile essentielle, responsables du parfum caractéristique de la plante. Les fleurs sont disposées en épis et forment des panicules de tiges ramifiées à partir d'une tige centrale. Selon la sous-espèce, les corolles peuvent être violettes, roses ou blanches (Alekseeva et *al.*, 2020).

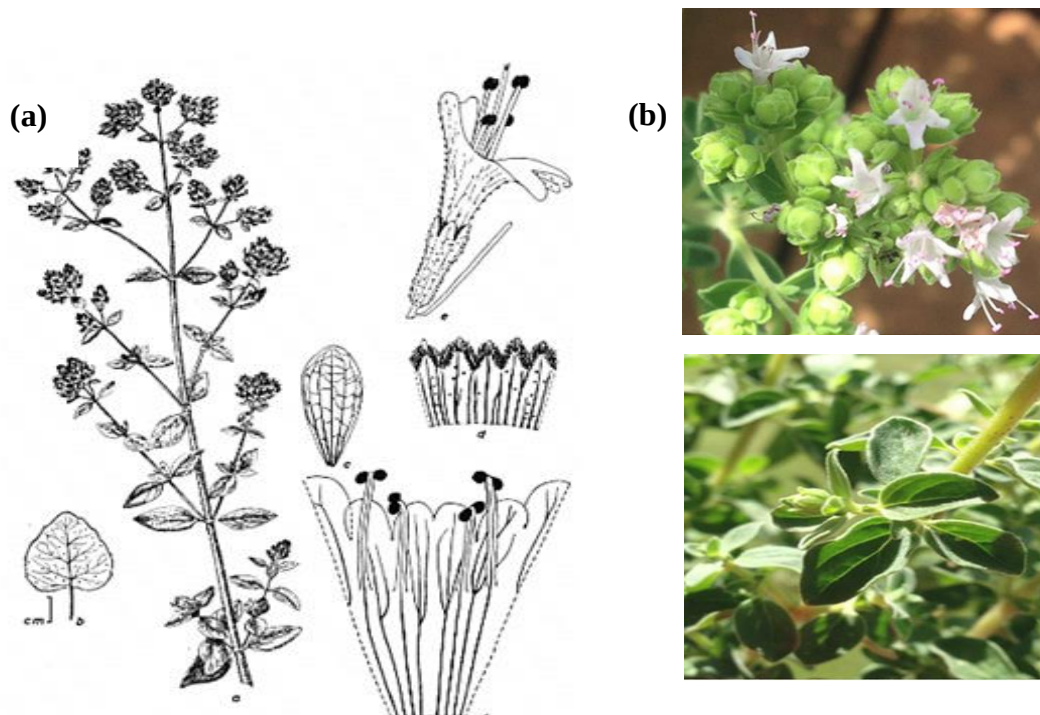


Figure 16: *Origanum vulgare* L.

(a) : Caractéristique botanique (Ietswaart, 1980) ;

(b) : Partie aérienne de la plante (Pezzani et *al.*, 2017).

III.3.1.2 Classification

La classification taxonomique de l'espèce *Origanum* se présente ainsi (Mechergui et *al.*, 2016) :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Gamopétales
- Ordre : Lamiales
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Origanum*
- Espèce : *Origanum vulgare*

En outre, Ietswaart (1980) a identifié six sous-espèces d'*O. vulgare* en se basant sur leurs particularités morphologiques : *glandulosum* (Desf.) Ietsw., *gracile* (K. Koch) Ietsw., *hirtum* (Link) Ietsw., *virens* (Hoffmanns. & Link) Ietsw., *viridulum* (Martrin-Donos) Nyman, et *vulgare*. Ces sous-espèces ont été reconnues et validées en 2013 par « The Plant List » (www.theplantlist.org).

III.3.1.3 Composition chimique

L'huile essentielle d'*O. vulgare* est principalement composée de monoterpènes monocycliques (thymol, γ -terpinène, carvacrol et p-cymène), de monoterpènes acycliques (géraniol, acétate de linalyle, linalol et β -myrcène), ainsi que de monoterpènes bicycliques (composés sabinyles). Elle renferme également des sesquiterpénoïdes tels que le β -caryophyllène, le germacrène D, le germacrène D-4-ol, le spathulénol, l'oxyde de caryophyllène et l'oplopanone (Lukas et *al.*, 2015). La composition de ces huiles peut varier en fonction de plusieurs facteurs, dont la géographie, le stade de développement, les conditions climatiques, l'intensité de l'ensoleillement et le moment de la récolte (Alekseeva et *al.*, 2020).

La variation de la composition des huiles essentielles est également influencée par les différents chémotypes. Le chémotype cymyl se distingue par la prédominance de p-cymène, c-terpinène, p-cymène-8-ol, éther méthylique de thymol, éther méthylique de carvacrol, thymoquinone, thymol et carvacrol, représentant plus de 10% de la surface de pic. Le chémotype sabinyl est caractérisé par des niveaux élevés de sabinène, d'hydrate de trans-/cis-sabinène et de cétone de sabina. Le chémotype acyclique présente principalement du linalol et de l'acétate de linalyl. Par ailleurs, certaines huiles essentielles sont classées comme mixtes, avec une combinaison de composés provenant de différentes voies métaboliques (Alekseeva et *al.*, 2020 ; Lukas et *al.*, 2015).

III.3.1.4 Utilisations et activité antimicrobienne

Depuis des siècles, *O. vulgare* est utilisé traditionnellement pour aromatiser les aliments et traiter diverses affections, en raison de sa richesse en huile essentielle (Lukas et *al.*, 2010).

De nombreuses études ont été menées pour évaluer les propriétés biologiques de l'huile essentielle, en particulier ses effets antimicrobiens contre des pathogènes bactériens et fongiques. Certaines recherches se sont concentrées sur l'activité antimicrobienne de l'huile

essentielle seule (Baj et *al.*, 2020 ; Ceylan et *al.*, 2014), tandis que d'autres ont exploré les effets synergiques entre l'huile d'*O. vulgare* et celles d'autres espèces végétales, telles que *Rosmarinus officinalis* (Badia et *al.*, 2020 ; de Sousa et *al.*, 2013). Par ailleurs, d'autres études ont examiné l'efficacité de l'association de l'huile d'*O. vulgare* avec des antifongiques, mettant en évidence les effets combinés et les bénéfices thérapeutiques potentiels de ces associations (Benziane et *al.*, 2023 ; Ermenlieva et *al.*, 2022).

Cet effet antimicrobien est principalement attribué aux phénols monoterpénoïdes, tels que le carvacrol et le thymol, qui activent divers mécanismes antibactériens. Ces composés interagissent avec la bicouche lipidique des membranes cellulaires, entraînant des modifications de leur fluidité et de leur intégrité. À travers des processus tels que l'inhibition de l'ATPase, la libération d'ATP intracellulaire et la perturbation des gradients ioniques, ces composés provoquent une altération de la membrane, perturbant ainsi les fonctions cellulaires essentielles et aboutissant à la lyse cellulaire (Alekseeva et *al.*, 2020).

Un autre mécanisme d'action de l'huile essentielle d'*O. vulgare* a été mis en évidence par Pradebon Brondani et *al.* (2018), qui ont démontré son pouvoir inhibiteur sur la production d'enzymes phospholipases par *C. albicans*. Cette inhibition enzymatique a conduit à une réduction notable de l'activité phospholipase, essentielle pour la virulence de la levure, en perturbant la structure de la membrane cellulaire et en limitant son potentiel de colonisation.

III.3.2 *Mentha pulegium* L.

III.3.2.1 Origine et aspect botanique

M. pulegium L., connue en Algérie sous le nom vernaculaire "fliyou", également appelée menthe pouliot, est l'une des espèces les plus utilisées de la famille des Lamiacées. Le nom « pouliot » provient du latin *pulegium*, dérivé de *pulex* (puce), en raison de sa capacité à repousser les puces (Bekhechi Chahrazed, 2009). Cette plante se distingue par une inflorescence unique constituée de verticillasters espacés et dépourvue de feuilles à l'extrémité (Figure 17). De plus, elle présente un calice à dents inégales, faiblement bilabiées, et un tube de corolle légèrement renflé à sa base. Sa saveur est très aromatique avec une odeur intense. Les fleurs, qui apparaissent de mai à la fin septembre, sont de couleur rose lilas, parfois blanches, et s'organisent en glomérules largement espacés le long de la tige, à l'aisselle des feuilles (Kokkini et *al.*, 2003).

Elle se développe naturellement en Europe occidentale et centrale, ainsi que dans plusieurs régions d'Asie, d'Amérique et du bassin méditerranéen. Très présente en Afrique du Nord, elle pousse spontanément en Algérie, notamment dans la région du Tell. Adaptée aux milieux humides, elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques (Bekhechi Chahrazed, 2009 ; Kokkini et *al.*, 2003).



Figure 17: *Mentha pulegium* L.

(a) : Caractéristique botanique (Kokkini et *al.*, 2003) ;

(b) : Partie aérienne de la plante (Voigt et *al.*, 2024).

III.3.2.2 Classification

Le genre *Mentha*, appartenant à la famille des Lamiacées, se caractérise par une taxonomie complexe, comprenant environ 42 espèces, 15 hybrides, ainsi que de nombreuses sous-espèces et cultivars (Tafrihi et *al.*, 2021). *M. pulegium* se distingue par la classification suivante (Bekhechi Chahrazed, 2009):

- **Embranchement** : Phanérogames ou Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicots
- **Sous-classe** : Astéridées
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : *Lamiaceae*
- **Genre** : *Mentha* (Tourn.) L.
- **Espèce** : *Mentha pulegium* L.

III.3.2.3 Composition chimique

Les huiles essentielles constituent un mélange complexe de métabolites secondaires volatils produits par les plantes. De nombreuses études ont démontré que les monoterpènes oxygénés, tels que la pulégone, la pipéritone, la menthone et le menthol, constituent les principaux composants de l'huile essentielle de *M. pulegium*, avec une prédominance notable de la pulégone. Lorenzo et *al.* (2002) ont relevé une forte concentration de pulégone (73,4%) et d'isomenthone (12,9%). En Grèce, Kokkini et *al.* (2004) ont identifié comme constituants majeurs la pulégone, la menthone, la pipéritone, la pipérinone, l'isomenthone et l'isopipériténone. Stoyanova et *al.* (2005) ont confirmé la prépondérance de la pulégone, de la pipérinone et de l'isomenthone dans les populations bulgares.

En Algérie, les travaux de Abdelli et *al.* (2016) ont montré que la pulégone représentait environ 70,66% des composés dominants dans l'huile essentielle de *M. pulegium* de la région de Bouira. De plus, Boutabia et *al.* (2020) ont également établi que la pulégone demeure le principal composant de cette espèce dans le nord-est algérien. Il convient de noter que les proportions de ces composés peuvent varier selon la région, la position géographique, les conditions climatiques et d'autres facteurs environnementaux.

III.3.2.4 Utilisation et activité antimicrobienne

En raison de sa toxicité, qui peut affecter le foie, *M. pulegium* présente des risques potentiels, notamment une consommation dangereuse pour les nourrissons et les enfants, pouvant même être mortelle. Cependant, elle peut être consommée en tisane par les adultes en bonne santé. Traditionnellement, elle a été utilisée comme emménagogue (pour stimuler le flux menstruel) ou abortif (Miraj & Kiani, 2016). En médecine traditionnelle iranienne, les segments aériens de la plante ont été employés pour traiter divers maux, tels que la sinusite, les intoxications alimentaires, le rhume, le choléra, la tuberculose et la bronchite (Mahboubi & Haghi, 2008).

L'huile essentielle de *M. pulegium* a été étudiée *in vitro* pour ses propriétés antimicrobiennes et a montré des effets modérés. Cependant, elle semble moins efficace en tant qu'agent antimicrobien contre les bactéries, les levures et les champignons par rapport aux huiles essentielles d'autres herbes aromatiques. Duarte et *al.* (2005) ainsi que Ed-Dra et *al.* (2019) ont étudié l'activité de l'huile essentielle de *M. pulegium* contre *C. albicans* et *Listeria*, respectivement. Les deux études ont observé une inhibition modérée de ces souches, indiquant une efficacité antimicrobienne relativement moyenne.

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1 Objectif

Cette étude expérimentale vise à explorer et caractériser les propriétés antifongiques de deux huiles essentielles vis-à-vis *Candida albicans*. Ce travail est structuré en trois parties enchainées. La première partie porte sur l'isolement et l'identification des souches cliniques de *C. albicans* à partir de différents échantillons. La deuxième partie se concentre sur l'extraction des huiles essentielles de deux plantes sélectionnées (*O. vulgare* et *M. pulegium*), leur caractérisation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et l'évaluation de leurs activités antifongique et antioxydante. Enfin, la troisième partie a pour objectif de tester l'activité antibiofilm des huiles essentielles contre *C. albicans* et à examiner leur impact sur les facteurs de virulence modulés par le mécanisme de quorum sensing.

I.2 Lieu d'étude

Cette étude est réalisée au sein de deux laboratoires : le Laboratoire de Microbiologie de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret et le Laboratoire de recherche en Géo-Environnement et Développement des Espaces (LGEDE) de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara.

I.3 Partie I : Isolement, identification et évaluation des propriétés pathogéniques des souches de *Candida*

I.3.1 Isolement et identification des souches de *Candida*

Les différents examens utilisés dans cette partie de l'étude sont résumés dans le protocole expérimental suivant :

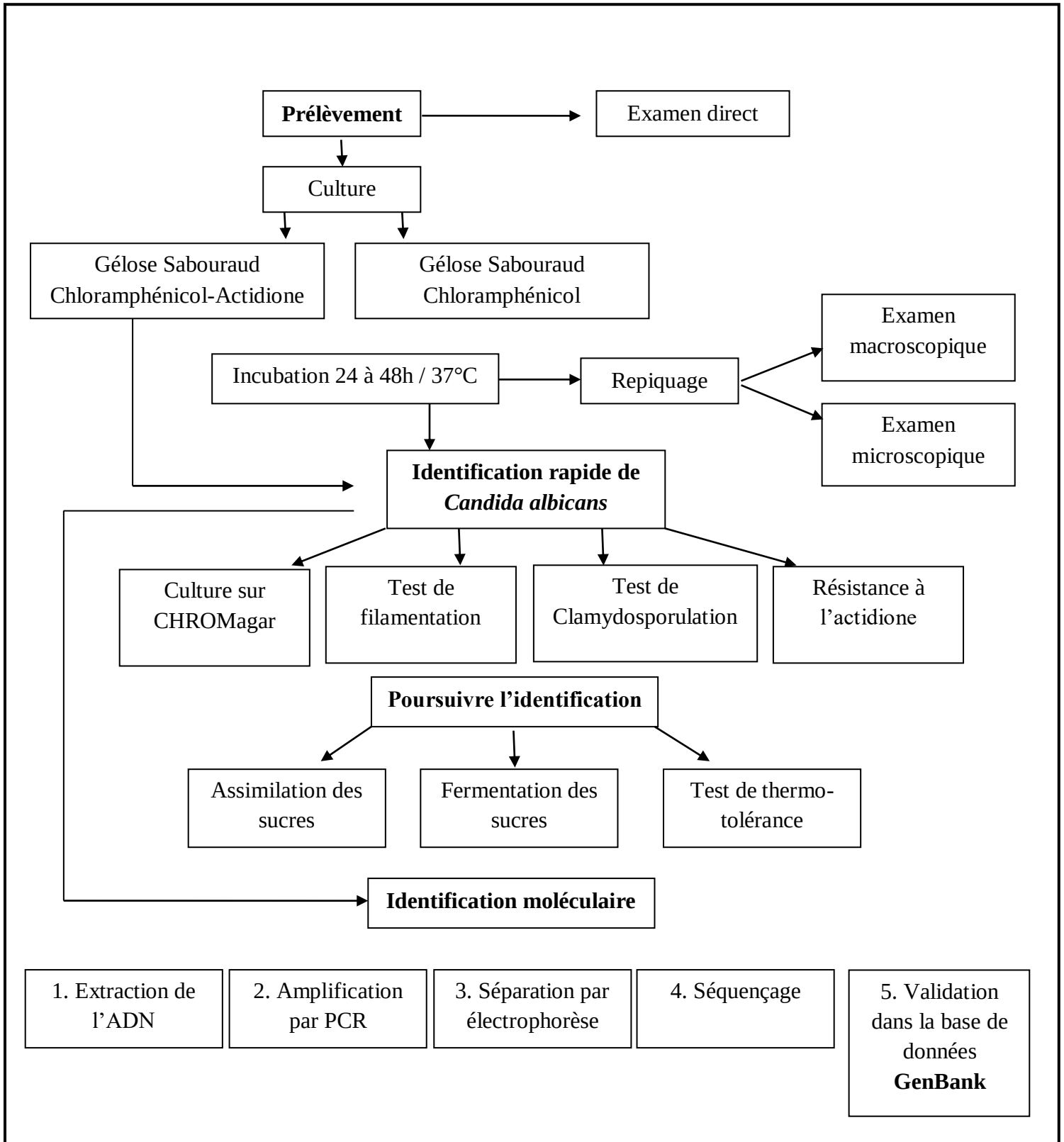


Figure 18: Protocole expérimental récapitulatif d'isolement et d'identification de l'agent *Candida*.

I.3.1.1 Prélèvements

Un total de 155 patients présentant des symptômes de candidose ont été pris en compte dans cette étude (Tableau 1), et cela entre la période allant du mois de mai 2021 à avril 2022. Ces patients ont été pris en charge à l'Hôpital Youcef Damardji à Tiaret-Algérie, où des examens cliniques ont été effectués par des médecins spécialisés. La majorité des cas de candidose buccale concernaient des enfants âgés de cinq mois à trois ans. Dans les cas de candidoses vaginales, l'âge moyen des patientes était de 40 ans (variant de 19 à 64 ans), et les femmes sous traitement ont été épargnées. L'échantillonnage a été effectué en frottant deux écouvillons stériles sur la lésion candidosique de la muqueuse vaginale ou buccale. Un écouvillon a servi à l'examen direct, tandis que l'autre a été immédiatement ensemencés sur un milieu Sabouraud Chloramphénicol, avec et sans actidione, puis incubés à 37°C pendant 48 h. Après confirmation que les colonies appartenaient à l'espèce *Candida*, les isolats ont été purifiés par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de colonies pures.

Tableau 1: Nombres de prélèvements collectés, sexe et signes cliniques présentés par le patient.

Type de candidose	Sexe	Nombre de patients	Age	Symptômes
Buccales	Enfant	11	5 mois - 3ans	- Rougeurs et irritation dans la bouche. - Plaques blanches sur la langue ou la gencive.
	Femme	1	34 ans	
	Homme	2	30/54 ans	
Vaginale	Femme	141	19 - 64 ans	- Éruption cutanée. - Rougeur et gonflement. - Ecoulement vaginal épais. - Odeur vaginale inhabituelle - Démangeaisons.

I.3.1.2 Examen direct

L'examen direct a été réalisé au microscope, à l'état frais entre lame et lamelle, pour objectif de rechercher la forme pathogène de *Candida*. La présence d'hyphes (filaments longs et fins) ou de pseudohyphes (hyphes segmentés) indique une infection active. Les chlamydospores (spores de résistance) peuvent également être observées, notamment chez *C. albicans*. Cependant, l'examen direct est moins sensible que la culture. En effet, il faut détecter une quantité élevée de levures (entre 10^4 à 10^5 UFC/ml) pour indiquer un déséquilibre de la flore commensale et confirmer une infection (Pianetti, 2015).

I.3.1.3 Examen des cultures fongiques

I.3.1.3.1 Examen macroscopique

Après plusieurs repiquages par ensemencement en stries sur gélose Sabouraud chloramphénicol, les colonies de levures ont été observées à l'œil nu pour déterminer leurs caractéristiques culturelles, incluant la couleur, la forme et l'aspect général.

I.3.1.3.2 Examen microscopique

I.3.1.3.2.1 Coloration au bleu de méthylène

Pour déterminer les caractéristiques microscopiques, des frottis ont été réalisés et colorés au bleu de méthylène. Les préparations ont été examinées au microscope optique avec un objectif 40x puis 100x. Les cellules de *Candida* se distinguent par leur forme ovoïde et leur bourgeonnement multilatéral, avec des dimensions généralement comprises entre 3 et 6 µm de long (Cardinale, 2018).

I.3.1.4 Identification rapide de *Candida albicans*

I.3.1.4.1 Résistance à l'actidione (Cycloheximide)

Le test de résistance à l'actidione permet d'évaluer la sensibilité des champignons à cet inhibiteur de croissance. L'ajout d'actidione dans le milieu Sabouraud inhibe la croissance de certaines espèces fongiques telles que *Aspergillus fumigatus*, et *Fusarium* et d'autres espèces du genre *Candida* telles que *C. tropicalis* et *C. krusei*. En revanche, ce milieu favorise la croissance de *C. albicans*, ce qui permet de le différencier des autres espèces (Pianetti, 2015).

I.3.1.4.2 Test de filamentation (blastèse)

Le but de ce test est de détecter la formation du tube germinatif à partir des blastoconidies, un phénomène observé uniquement chez *C. albicans* et *C. dubliniensis* (Marinho et al., 2010). Une à deux colonies distinctes ont été inoculées dans 0,5 ml de sérum humain frais. Après l'incubation pendant 3 h à 37°C, une goutte de la suspension a été placée entre une lame et une lamelle, puis observée au microscope au grossissement 40x puis au 100x (LANDAU et al., 1965 ; Mohammed et al., 2017).

I.3.1.4.3 Test de chlamydosporulation

Cette technique vise à ensemencer une colonie de *Candida* sur un milieu pauvre pour observer la formation de spores de résistance, permettant ainsi de distinguer les souches de *C. dubliniensis*, *C. albicans* et, plus rarement, *C. tropicalis* (Neppelenbroek et al., 2014). Sur un milieu RAT (Rice-Agar-Tween) (Realab, Tizi-Ouzou, Algérie), une goutte de la suspension précédente (sérum + inoculum) a été ensemencée, puis recouverte d'une lamelle. Après une

incubation de 48 h à 37°C, l'observation microscopique a été réalisée directement sur la boîte pour visualiser les chlamydospores formées (Figure 19).

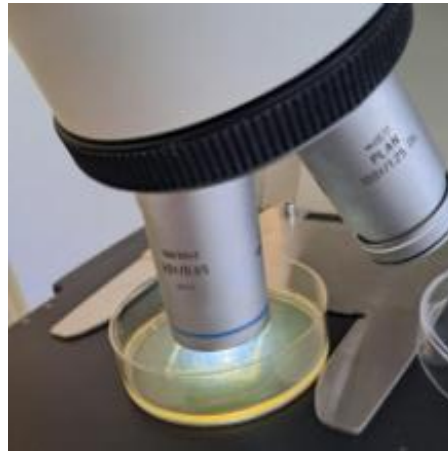


Figure 19: Observation directe à la surface du milieu gélosé pour le test de chlamydosporulation.

I.3.1.4.4 Identification sur milieu chromogénique

Les milieux chromogènes permettent l'identification des espèces de *Candida* en fonction de la couleur spécifique des colonies (Alhussaini, 2013). Les isolats de levures ont été ensemencés sur CHROMagar® *Candida* (Realab, Tizi-Ouzou, Algérie) et incubés pendant 48 h à 37°C. La coloration des colonies est basée sur l'hydrolyse d'un substrat chromogénique par des enzymes spécifiques, telles que l'hexosaminidase, qui varient selon les espèces. Par exemple, l'enzyme N-acétyl- β -D-galactosaminidase est spécifique à *C. albicans* (Pianetti, 2015). Selon les critères établis, les colonies de *C. albicans* ou *C. dubliniensis* apparaissent en vert, celles de *C. tropicalis* en bleu métallique, *C. krusei* en rose pâle, et *C. glabrata* en rose ou mauve clair à foncé.

I.3.1.5 Identification des espèces de *Candida* non *albicans*

I.3.1.5.1 Assimilation des glucides

Ce test repose sur la capacité des espèces à assimiler certains sucres comme seule source de carbone (Neppelenbroek et al., 2014). De plus, plusieurs études ont montré que *C. dubliniensis* peut être distingué de *C. albicans* par son incapacité à assimiler le D-xylose (Khan et al., 2012 ; Khlif et al., 2011). Selon Khan et al. (2012), un milieu de base favorisant la croissance des levures en présence d'un substrat approprié a été préparé avec 6,7 g de milieu YNB (Yeast Nitrogen Base), 10 g de sources de carbone et 20 g d'agar. Une suspension de levures a été préparée, ajustée à une densité optique de 0,15, puis ensemencée

sur le milieu. Chaque boîte a été inoculée avec 8 isolats et incubée pendant 48 h à 30°C. L'assimilation des glucides se traduit par la croissance des levures autour du site d'ensemencement correspondant.

I.3.1.5.2 Fermentation des glucides

Le test de fermentation des glucides a été réalisé selon une méthode classique (Bhavan et *al.*, 2010). Chaque essai a été mené dans des tubes à essai contenant une cloche de Durham, 4 ml de milieu de base (composé de 4,5 g/l d'extrait de levure et de 7,5 g/l de peptone), et 2 ml de solution de sucre (à 2%) à tester. Une suspension de levures, préparée à partir de chaque jeune souche, a été ensuiteensemencée à raison de 100 µl par tube. La fermentation des glucides est indiquée par la présence de gaz dans la cloche de Durham.

I.3.1.5.3 Test de tolérance à la température de 45°C

Ce test permet de différencier *C. albicans*, qui est capable de se développer à 45°C, de *C. dubliniensis*, qui ne tolère pas ces températures élevées. Les colonies à différenciées ont été inoculées sur gélose Sabouraud et incubées à 45°C pendant 10 jours (Marinho et *al.*, 2010).

Les souches *C. albicans* ATCC 10237 et *C. albicans* ATCC 10231 ont servi de références pour tous les tests.

I.3.1.6 Identification moléculaire

Après l'identification conventionnelle des espèces de *C. albicans*, sept souches ont été sélectionnées (quatre d'origine buccale et trois d'origine vaginale) pour une identification moléculaire plus précise. Cette analyse a été effectuée au laboratoire Eurofins Genomics en France, utilisant le séquençage du domaine D1-D2 de l'ADN ribosomal.

I.3.1.6.1 Extraction de l'ADN

L'ADN des souches fongiques a été extrait en utilisant le kit commercial Nucleospin de Macherey-Nagel, conformément aux instructions fournies par le fabricant (Macherey-Nagel, Allemagne). Après extraction la quantification et l'évaluation de la qualité de l'ADN ont été réalisées à l'aide du Nanodrop 2000, en vérifiant les ratios 260/280 et 260/230 pour assurer la pureté de l'ADN et l'absence de contaminants.

I.3.1.6.2 Amplification de l'ADN ribosomal (ADNr)

Pour l'amplification du domaine D1-D2 de l'ADN ribosomal, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisée. Les amorces universelles utilisées étaient NL1 (forward) et NL4 (reverse) décrites par Park et *al.* (2012) :

NL1 (forward) : 5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3'

NL4 (Reverse) : 5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3'

Le mélange réactionnel de PCR total de 25 µl comprenait :

- 5 µl de tampon Taq Promega (5×)
- 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM)
- 0,2 µl de dNTP (25 mM)
- 0,5 µl de chaque amorce (NL1 et NL4) (20 µM)
- 0,2 µl de Taq polymérase Promega (5U)
- 2 µl d'ADN matrice
- 15,1 µl d'eau ultra pure

Un thermocycleur (i-Cycler Bio-Rad, États-Unis) a été utilisé pour l'amplification, en suivant ce profil de température : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, suivie de 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, d'hybridation à 57°C pendant 30 sec, d'élongation à 72°C pendant 30 sec, et enfin une élongation finale à 72°C pendant 7 min.

I.3.1.6.3 Electrophorèse et révélation

Les produits de PCR obtenus ont été soumis à une électrophorèse à 90 Volts pendant 1 h et 30 min sur un gel d'agarose à 1,5%, contenant un dépôt de 10 µl de produits de PCR, suivi d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Après migration, l'ADN a été visualisé et photographié sous UV.

I.3.1.6.4 Purification et séquençage des produits de la PCR

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit Clean-Up de Macherey-Nagel (MN, Allemagne), conformément au protocole du fournisseur. Les produits purifiés ont ensuite été séquencés selon la méthode de Sanger (Sanger et *al.*, 1977), en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) et les amorces utilisées lors de l'amplification PCR. Les séquences obtenues ont été analysées et nettoyées avec le logiciel CHROMAS PRO.

Les séquences finales ont été comparées à celles de la banque de données GenBank à l'aide du programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de NCBI, permettant l'identification des isolats sur la base du pourcentage d'homologie avec les souches de référence. Enfin un arbre phylogénétique a été construit. Les séquences des échantillons ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal W, et un arbre phylogénétique a été généré en utilisant le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

I.3.2 Évaluation des propriétés pathogéniques des souches de *Candida*

I.3.2.1 Test de sensibilité des souches de *Candida* aux agents antifongiques

Pour évaluer la sensibilité des souches de *Candida* spp. aux agents antifongiques, la méthode de diffusion sur disque a été utilisée, suivant les recommandations du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M44-A (Sheehan et al., 2004). Les tests ont été réalisés sur gélose Mueller-Hinton (M.H) enrichi de 2% de dextrose et de 0,5 µg/ml de bleu de méthylène. Les souches cliniques et de référence (*C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* ATCC 10237) ont été cultivées sur de la gélose SDA (Sabouraud Dextrose Agar) à 37°C pendant 18 h, puis mises en suspension dans une solution saline à 0,85% et ajustées à une concentration de 10⁶ UFC/ml, correspondant à une densité optique (DO₆₃₀) de 0,15 (Mendoza-Juache et al., 2017). Un volume de 100 µl de chaque suspension a été étalé sur la surface de la gélose, qui a ensuite été laissé sécher pendant 5 à 15 min. Des disques imprégnés d'amphotéricin B (20 µg) et de fluconazole (25 µg) ont été placés sur la gélose.

Après une incubation de 24 h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés et classifiés selon les critères suivants: Sensible (S) pour un diamètre de zone ≥ 19 mm pour le fluconazole et ≥ 11 mm pour l'amphotéricin B ; sensible à dose dépendante (SDD) pour un diamètre de zone de 15 à 18 mm pour le fluconazole ; résistant (R) pour un diamètre de zone ≤ 14 mm pour le fluconazole et ≤ 10 mm pour l'amphotéricin B (ElFeky et al., 2016).

I.3.2.2 Evaluation de la capacité des souches de *Candida* à former des biofilms

La formation de biofilms par les espèces de *Candida* a été évaluée en utilisant la méthode des microplaques. Des colonies pures de *C. albicans* et de *Candida non-albicans* ont été cultivées dans le bouillon YPD (Yeast Peptone Dextrose) à 37°C pendant 18 h. La densité cellulaire a été ajustée à 10⁶ UFC/ml à l'aide d'une spectrophotométrie (Ramage & Wickes, 2001). Pour induire la formation des biofilms, 100 µl de ces suspensions cellulaires standardisées ont été inoculés dans des puits sélectionnés de microplaques à fond rond, puis

incubés pendant 48 h à 37°C. Chaque souche a été testée en triplicata, avec au moins six puits utilisés comme témoins négatifs contenant uniquement le milieu de culture. Après l'incubation, le milieu a été soigneusement aspiré, et les cellules non adhérentes ont été éliminées par trois lavages successifs avec du tampon phosphate salin (PBS) stérile.

I.3.2.2.1 Quantification des biofilms

La biomasse et l'activité métabolique des biofilms formés ont été quantifiées à l'aide de deux méthodes distinctes.

a) Quantification de la biomasse au violet de gentiane

Le test au cristal violet (CV) a été utilisé pour quantifier la formation de biofilms, en suivant un protocole précédemment décrit (O'Toole, 2011). Brièvement, un volume de 100 µl de solution de violet de gentiane a été appliqué sur les biofilms pendant 20 min, puis les puits ont été lavés quatre fois avec du PBS pour éliminer l'excès de colorant. Les biofilms fixés au colorant ont ensuite été dissous avec 100 µl d'éthanol à 95%, et l'absorbance a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Maé SAS, France).

b) Quantification de l'activité métabolique des biofilms

La réduction du 2,3,5-triphenyltetrazolium Chloride (TTC) (Sigma-Aldrich) a été utilisée pour évaluer l'activité métabolique des biofilms selon une méthode décrite précédemment (Sabaeifard et al., 2014). En bref, 200 µl de bouillon YPD, supplémenté avec du TTC à une concentration finale de 0,05% (p/v), ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, les puits ont été rincés trois fois avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. Le TTC réduit, visible par une coloration rouge, a ensuite été extrait avec du méthanol (96%), et l'absorbance a été mesurée à 490 nm.

Les biofilms ont été catégorisés en quatre groupes (Tableau 2) en fonction de la valeur seuil de la densité optique (OD_c), calculée comme suit :

$$OD_c = \text{moyenne des DO du contrôle négatif} + (3 \times \text{écart-type (SD) du contrôle négatif}).$$

Chaque essai a été réalisé en triplicata, et les valeurs moyennes de DO ont été calculées (Stepanović et al., 2000 ; Turan & Demirbilek, 2018).

Tableau 2: Catégories de formation des biofilms.

Valeurs moyennes de DO	Production de biofilm
$DO \leq DO_C$	Absence
$DO_C \leq DO \leq 2 \times DO_C$	Faible
$2 \times DO_C \leq DO \leq 4 \times DO_C$	Modérée
$4 \times DO_C \leq DO$	Forte

I.4 Partie II : Étude phytochimique et activité antifongique

I.4.1 Matériel végétal

Pour cette étude, deux plantes médicinales de la famille des Lamiacées ont été utilisées ; *Origanum vulgare* L. et *Mentha pulegium* L. (Figure 20). Les parties aériennes de ces plantes ont été récoltées une seule fois pendant leur période de floraison, entre juin et juillet 2022, dans la région de la Grande Kabylie (Wilaya de Tizi-Ouzou), au nord de l'Algérie. La récolte a été effectuée dans deux zones spécifiques : à Tikidount, pour *O. vulgare*, et à Ath Ouaban, pour *M. pulegium* (Figure 21). L'identification botanique des plantes a été réalisée par le Professeur Mohamed Djamel MIARA, botaniste au Département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tiaret, Algérie, en se basant sur la description de Quézel & Santa (1962).

**Figure 20:** Partie aérienne du matériel végétal étudié.

(a) *O. vulgare* ; (b) *M. pulegium*.

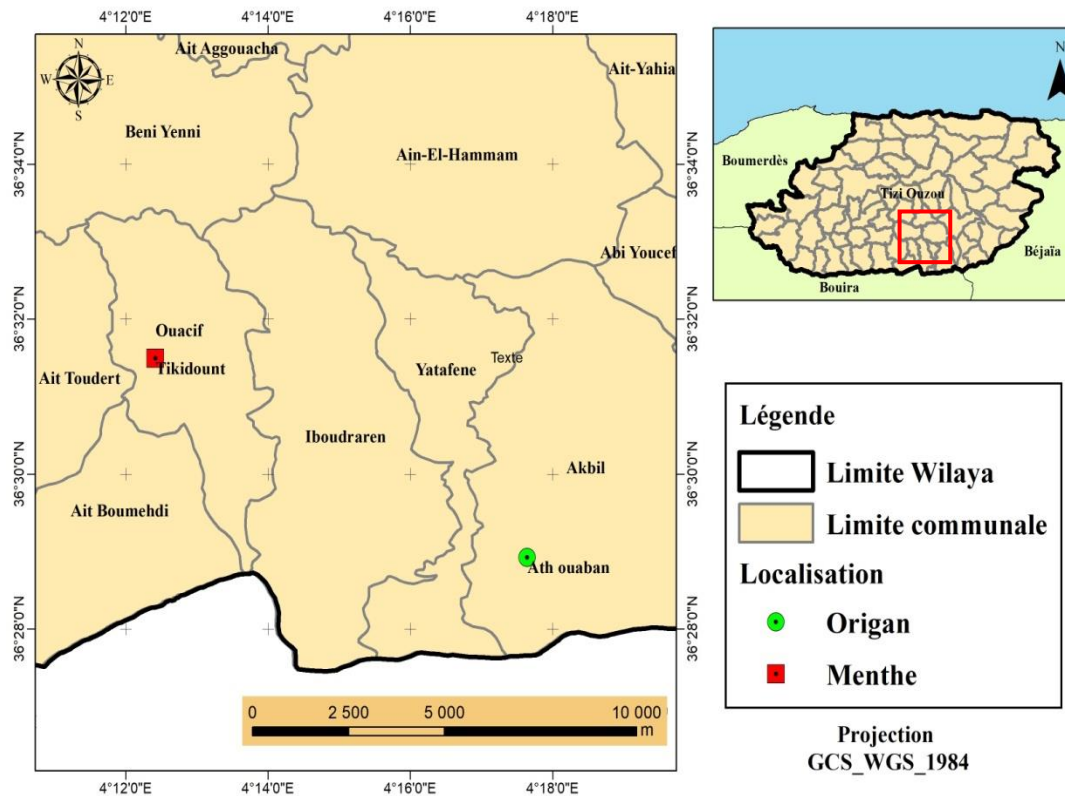


Figure 21: Situation géographique des sites d'échantillonnage au niveau de la Wilaya de Tizi-OUZOU.

Les villages d'Ath Ouaban et Tikidount sont situés dans la région montagneuse de la Grande Kabylie, au sein de la Wilaya de Tizi-Ouzou, au nord de l'Algérie. Ath Ouaban, perché à une altitude de 1022 mètres, se trouve dans la commune d'Akbil. Ce village bénéficie d'un climat subhumide, typique des zones montagneuses de la Kabylie. Tikidount, quant à lui, est situé dans la commune d'Ouassif, à une altitude de 608 mètres (Tableau 3).

Tableau 3: Caractéristiques géographiques et étage bioclimatique de la station de récolte.

Sites	Altitude (m)	Latitude (Nord)	Longitude (Est)	Etage bioclimatique
Ath Ouaban	1022	36°28'54.5"N	4°17'39.5"E	Subhumide
Tikidount	608	36°31'52.1"N	4°13'02.4"E	

I.4.2 Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Figure 22). Le processus implique l'immersion de 100 g de matière végétale séchée dans 1000 ml d'eau distillée, suivie d'une ébullition continue pendant 3 h (Khosravi et *al.*, 2011). Cette méthode thermique favorise la libération des composés

volatils présents dans les cellules végétales. La vapeur générée, chargée de ces composés, est ensuite dirigée à travers un réfrigérant, où elle se condense en un liquide qui contient à la fois l'huile essentielle et l'hydrolat. Après condensation, l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat en raison de la différence de densité, ce qui permet sa collecte et sa purification ultérieure.

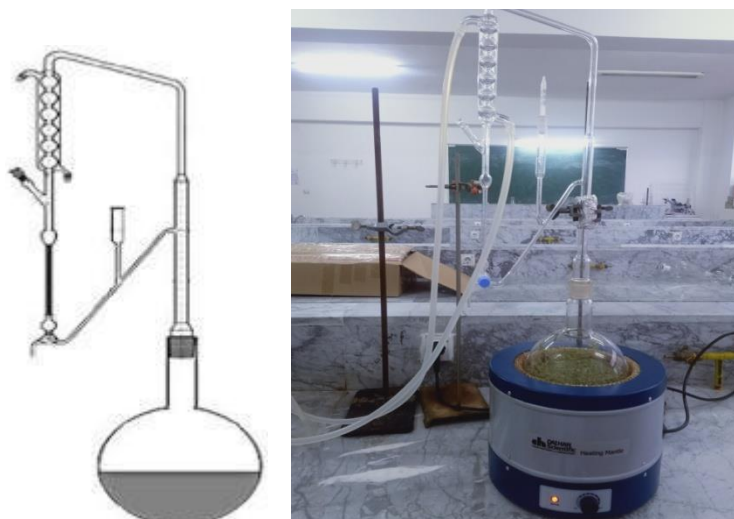


Figure 22: Dispositif d'hydrodistillation.

I.4.2.1 Traitement des huiles essentielles

Après l'extraction, l'huile essentielle a été d'abord séparée de l'hydrolat par décantation. Pour éliminer les traces d'eau résiduelles, l'huile a été traitée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), un agent desséchant qui absorbe l'humidité. Une fois débarrassée de toute trace d'eau, l'huile essentielle a été transférée dans un flacon opaque, hermétiquement scellé, puis conservée à 4°C jusqu'à son utilisation ultérieure (Ed-Dra et *al.*, 2019).

I.4.2.2 Calcul du rendement

Le rendement en huiles essentielles a été calculé pour les deux plantes testées en utilisant la formule suivante (Selles et *al.*, 2020):

$$R = (M_{vs} / M_{he}) \times 100$$

Où :

- R : Rendement en % ;
- M_{he} : la masse d'huile essentielle récupérée en (g) ;
- M_{vs} : la masse de matière végétale en (g).

I.4.3 Caractérisation chimique par CG/MS et CG/FID

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a été effectuée au niveau de la Sarl Pyrenessences Analyse (France). Les huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium*, diluées à 10% dans de l'hexane, ont été analysées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG-MS 6890/5973 Agilent) et à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID 6890 Agilent), équipés d'une colonne polaire VF-WAX (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Le volume injecté a été de 1 µl. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, avec des débits de 30 psi pour la GC-FID, et de 23 psi pour la GC-MS. La température du four a été programmée pour augmenter de 60°C (maintien de 6 min) à 250°C à un taux de 2°C par min, suivi d'un maintien final de 10 min à 250°C (Selles et *al.*, 2020).

L'identification des constituants a été réalisée en combinant l'examen des temps de rétention (bibliothèque de Sarl Pyrenessences Analyses) et des spectres de masse (bibliothèque NKS, 75 000 spectres). Les pourcentages des composés sont calculés à partir des surfaces des pics obtenus par GC-FID.

I.4.4 Évaluation de l'activité antioxydante

La capacité antioxydante des huiles essentielles a été déterminée en utilisant deux approches complémentaires, la mesure du pouvoir réducteur et l'évaluation de l'activité anti-radicalaire contre le DPPH.

I.4.4.1 Évaluation du pouvoir de réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

Ce test repose sur la réduction des ions ferriques $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ en ions ferreux $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dans un milieu neutre, produisant une coloration bleue en présence d'ions Fe^{3+} . Pour ce test, des concentrations d'huile essentielle, dissoutes dans de l'éthanol (0.5/100 pour l'origan et 2/100 pour la menthe) (v/v), ont été mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,02 M, pH 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min. La réaction a ensuite été arrêtée par l'ajout de 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10%. Les échantillons ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. Un aliquote de 1 ml du surnageant a été combiné avec 1 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 0,1%.

Après une incubation de 10 min dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 700 nm, avec un blanc préparé en remplaçant l'huile

essentielle par de l'éthanol (Yen & Duh, 1993). La concentration efficace médiane (EC₅₀), représentant la concentration à laquelle l'absorbance atteint 0,5, a été déterminée à partir des courbes de régression linéaire (Chang et *al.*, 2007). Les essais ont été effectués en triplicata et les résultats ont été exprimés en moyennes $\pm$ écart-type (SD) en mg/ml. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard de comparaison.

I.4.4.2 Évaluation de l'activité anti-radicalaire par piégeage du radical DPPH

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des antioxydants à réduire le radical DPPH, initialement violet en solution alcoolique sous sa forme radicalaire 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, en une forme non radicalaire de couleur jaune pâle (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) (Figure 23). Cette décoloration, qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm, permet de mesurer l'activité antioxydante de l'échantillon et de quantifier son pouvoir antioxydant (Siddeeg et *al.*, 2021).

Selon la méthode décrite par Ben Haj Yahia et *al.* (2019), 1 ml de chaque dilution d'huile essentielle ont été ajoutés à 0,2 ml d'une solution de DPPH préparée à 0,5 mM dans de l'éthanol pur. L'absorbance est mesurée à 517 nm après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Le blanc est composé de 1 ml d'eau distillée et 0,2 ml de solution de DPPH.

Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé en utilisant la formule suivante :

$$AA (\%) = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs test} / \text{Abs contrôle}) \times 100.$$

Où :

- AA : activité anti-radicalaire ;
- Abs test: absorbance de l'échantillon ;
- Abs contrôle: absorbance du contrôle négatif.

L'acide ascorbique et l'acide gallique ont été utilisés comme standards pour les comparaisons. L'activité anti radicalaire a été quantifiée en termes de concentration inhibitrice médiane (IC₅₀), exprimée en mg/ml. La valeur d'IC₅₀ a été déterminée à partir des courbes d'activité de piégeage en fonction des concentrations d'échantillon (Niki, 2010). Tous les tests ont été réalisés en triplicata, et les résultats ont été présentés sous forme de moyennes $\pm$ écart type (SD).

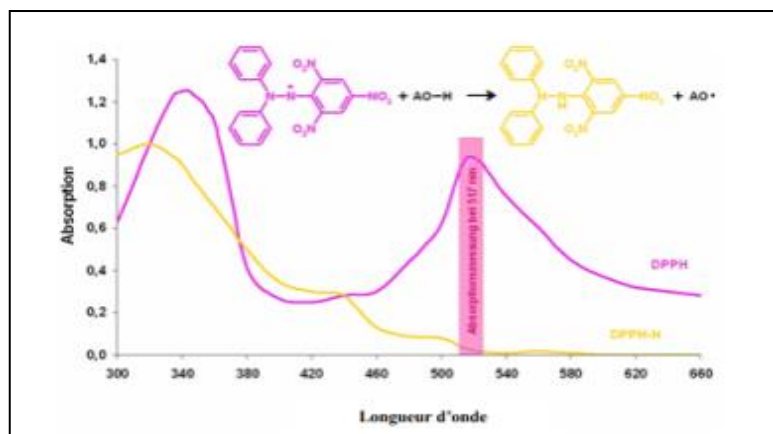


Figure 23: Schéma de réduction du DPPH de sa forme radicalaire à sa forme non radicalaire (Siddeeg et *al.*, 2021).

I.4.5 Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles

La détermination du pouvoir antifongique des huiles essentielles a été réalisée sur les sept souches de *C. albicans* identifiées génétiquement, dont quatre d'origine vaginale, trois d'origine buccale, ainsi que deux souches de référence. Les tests ont été effectués à l'aide de la méthode de diffusion sur disque et de la microdilution.

I.4.5.1 Aromatogramme

L'activité antifongique des huiles essentielles extraites d'*O. vulgare* et de *M. pulegium* a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque, selon Abdelli et *al.* (2016). Pour chaque souche fongique, une culture jeune de 18 h a été mise en suspension dans 9 ml d'eau physiologique et ajustée à une concentration de 10^6 UFC/ml à l'aide d'un spectrophotomètre. Les suspensions ont étéensemencées sur gélose par écouvillonnage. Des disques de papier stériles, imprégnés de 10 μ l de chaque huile essentielle, ont été placés sur l'agar préalablementensemencé. Après une incubation de 24 h à 37°C, les zones d'inhibition ont été mesurées et classées selon Bariz et *al.* (2023): résistantes (< 8 mm), sensibles (8-14 mm), très sensibles (14-20 mm), et extrêmement sensibles (> 20 mm).

I.4.5.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode de microdilution dans un milieu liquide, selon le protocole décrit par El-Baz et *al.* (2021). Des dilutions en série de chaque huile essentielle ont été préparées dans du bouillon YPD et ajoutées dans des microplaques à fond rond de 96 puits, avec des concentrations finales allant de 78 à 40000 μ g/ml. Pour améliorer la solubilité des huiles, du Tween 80 a été ajouté à une concentration de 0,1% (v/v). La nystatine (Sigma-Aldrich) a été utilisée comme contrôle

positif, avec des concentrations allant de 0,125 à 64 $\mu\text{g/ml}$, et un contrôle négatif, contenant uniquement du bouillon YPD et du Tween 80, a également été inclus. Les inocula de chaque souche ont été ajoutés aux puits des plaques (10^4 UFC/ml), qui ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation, une solution aqueuse de TTC (2 mg/ml) a été ajoutée dans chaque puits et incubée à 37°C pendant 2 h. Un changement de couleur en rouge indique la présence d'une activité microbienne (Lakhdar et *al.*, 2017). La concentration la plus faible de l'huile essentielle qui empêche la croissance fongique visible est considérée comme la CMI.

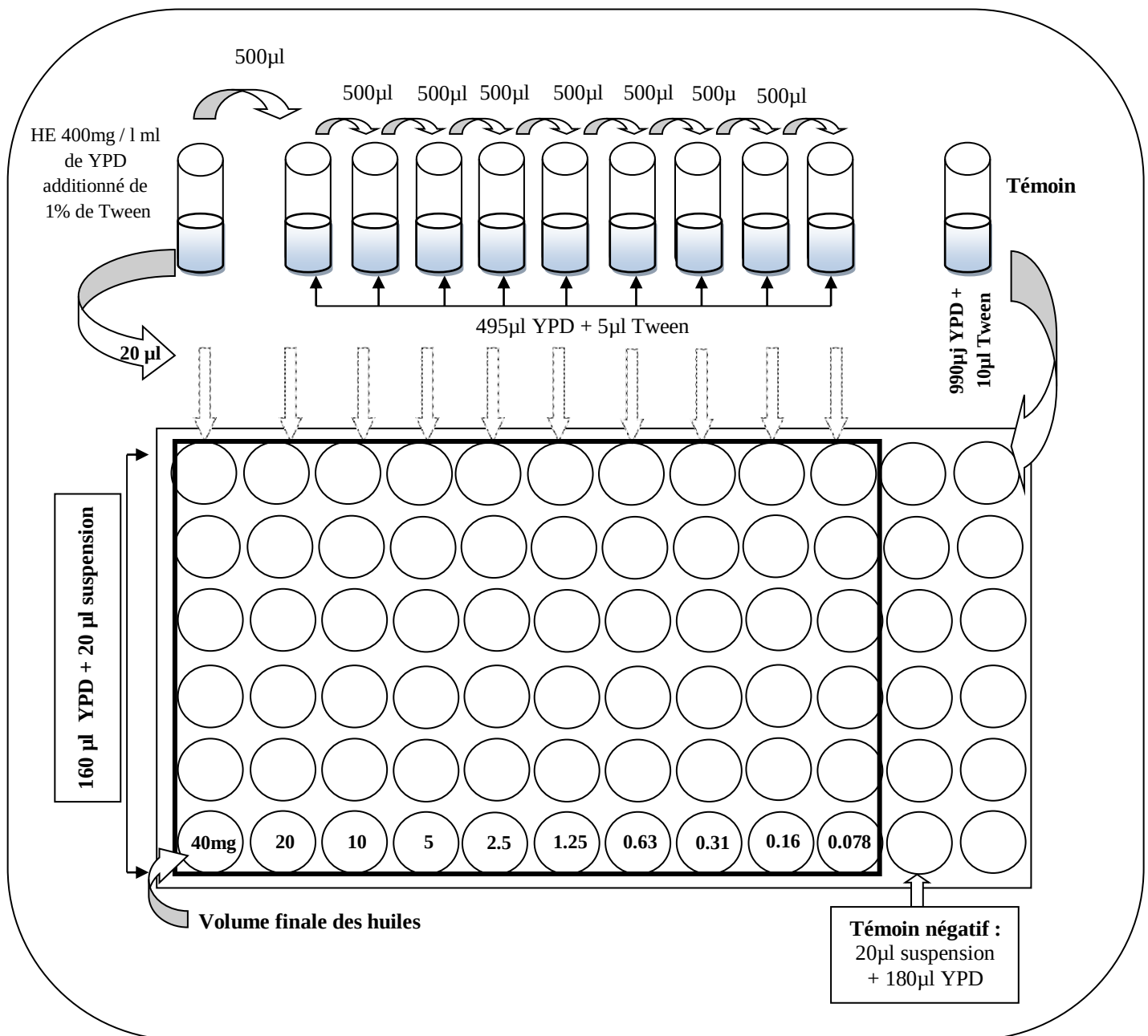


Figure 24: Schéma illustratif de la méthode de microdilution.

I.4.5.3 Détermination des concentrations minimales fongicides

Pour déterminer les concentrations minimales fongicides (CMF), 10 µl de l'inoculum fongique ont été prélevés des puits ne présentant aucune croissance visible, puis ensemencés sur gélose Sabouraud dextrose et incubés à 37°C pendant 48 h. La CMF correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle empêchant toute croissance fongique visible sur la surface de la gélose (Hsu et *al.*, 2013).

I.5 Partie III : Évaluation de l'effet des huiles sur les facteurs de virulence associés au quorum sensing

I.5.1 Inhibition du tube germinatif

Le test a été effectué en suivant une méthode précédemment décrite, avec quelques modifications mineurs (Müller-Sepúlveda et *al.*, 2020). Un volume final de 1 ml de bouillon YPD, enrichi de 10% de sérum humain frais et de chaque huile essentielle (à des concentrations de CMI et $CMI \times \frac{1}{2}$) ou de la nystatine a été inoculée, avec 100 µl d'une suspension de levure (10^6 UFC/ml). Des tubes contenant uniquement la suspension de levure dans le milieu ont servi de témoins. Après une incubation de 3 h à 37°C, les tubes ont été vortexés pendant 10 sec pour homogénéiser les suspensions. Une goutte de chaque suspension cellulaire a été déposée dans une chambre de comptage de Malassez pour évaluer la transition levure-mycélium. Pour chaque échantillon, 300 cellules de levure ont été comptées dans des champs contigus sous un microscope optique au G×40, et le pourcentage de cellules formant des tubes germinatifs a été calculé par rapport au nombre total de cellules.

Lors du comptage, les cellules présentant une constriction à la jonction entre l'hyphe et la cellule mère, indicatif de pseudohyphes, ont été exclues de l'analyse. Seules les cellules présentant un véritable tube germinatif ont été considérées.

I.5.2 Effet anti-adhésion

L'effet des huiles essentielles et de la nystatine sur l'adhésion des cellules a été évalué selon la méthode décrite précédemment (Cid-Chevecich et *al.*, 2022). Des cellules de levure (10^6 UFC) ont été ajoutées dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, en présence de 10% de sérum humain frais, et incubées pendant 4 h avec ou sans l'huile essentielle ou nystatine à leurs CMI respectives. Après la période d'incubation, les cellules non adhérentes ont été éliminées par plusieurs lavages successifs au PBS. Ensuite, 150 µl de solution de violet de gentiane ont été ajoutés dans chaque puits, suivis d'une incubation de 15 min à température ambiante. Les cellules adhérentes ont été lavées quatre fois avec du PBS pour

éliminer l'excès de colorant. Enfin, 200 µl d'éthanol ont été ajoutés, et l'absorbance a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les résultats ont été quantifiés en pourcentage d'adhérence par rapport au groupe témoin (suspension de levure).

I.5.3 Effet inhibiteur du biofilm

L'effet des huiles essentielles sur la formation des biofilms a été évalué en suivant la méthode décrite par Benziane et *al.* (2023). Pour cela, différentes concentrations de chaque huile essentielle ont été préparées dans du bouillon YPD, puis ajoutées aux puits de microplaques à 96 puits (avec des concentrations allant de CMI $\times \frac{1}{2}$ à CMI $\times 8$). La nystatine, utilisée comme agent antifongique de contrôle positif, a été testée à des concentrations allant de 0,125 à 64 µg/ml, tandis que des puits contenant uniquement le biofilm ont servi de contrôle de comparaison. Une suspension de levure à une densité de 10^6 UFC/ml a été ajoutée en aliquotes de 100 µl dans chaque puits.

La viabilité des cellules dans les biofilms a été quantifiée en utilisant le test de réduction du tétrazolum (TTC). Après une incubation de 24 h à 37°C, les biofilms ont été soigneusement lavés trois fois avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. Les biofilms ont ensuite été incubés pendant 24 h à 37°C dans un mélange de milieu YPD et de solution de TTC à une concentration de 0,05 % (p/v). Après l'incubation, la solution de TTC a été aspirée, et les plaques ont été laissées à sécher à l'air libre. Le formazan, produit par la réduction du TTC dans les cellules vivantes au sein des biofilms, a été dissous en ajoutant 150 µl de méthanol à 96% dans chaque puits.

Cette méthode de coloration au tétrazolum permet une mesure indirecte de la quantité de cellules vivantes adhérentes aux surfaces des puits (Sabaeifard et *al.*, 2014). La densité optique des puits a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les concentrations minimales d'inhibition du biofilm (MBIC) ont été calculées en pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante (Seddiki et *al.*, 2015):

$$\text{MBIC}\% = 100 \times [1 - (A_{490\text{nm}} \text{ du biofilm non traité} / A_{490\text{nm}} \text{ du biofilm traité})]$$

Où :

$A_{490\text{nm}}$ représente la densité optique mesurée à 490 nm.

I.5.4 Effet éradicateur du biofilm

Pour évaluer l'effet des huiles essentielles sur les biofilms préformés, 100 µl de suspension fongique ont été ajoutés dans chaque puits des microplaques, suivis d'une

incubation de 24 h à 37°C. Après cette incubation, le milieu a été éliminé et les puits ont été soigneusement lavés pour retirer les cellules non adhérentes. Ensuite, chaque puits a été traité avec un mélange de TTC à 0,05 % (p/v) et d'huiles essentielles à des concentrations de CMI $\times$ $\frac{1}{2}$, CMI, CMI $\times$ 2, CMI $\times$ 4, et CMI $\times$ 8, ou de nystatine à des concentrations allant de 0,125 à 64 μ g/ml. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h supplémentaires. Des puits sans agent antimicrobien ont été utilisés comme contrôle de comparaison ; tandis que, des puits sans biofilm ont servi de contrôle de stérilité. La concentration minimale éradicatrice du biofilm (MBEC) a été déterminée par le test de réduction de TTC, selon la méthode décrite précédemment.

I.5.5 Synergie entre les huiles essentielles et la nystatine

L'association de molécules bioactives d'origine végétale avec des agents antimicrobiens chimiques constitue une approche stratégique visant à limiter l'émergence de résistances et réduire la toxicité des traitements. Dans cette optique, les huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium* ont été évaluées pour leur potentiel synergique avec la nystatine. La souche *C. albicans* CA1 a été choisie pour ce test, et la méthode du checkerboard, comme décrit précédemment a été utilisée pour évaluer cette interaction synergique (Biernasiuk et al., 2023). Des dilutions en série, allant de CMI $\times$ 8 à CMI $\times$ $\frac{1}{8}$, ont été préparées pour chaque traitement. Les huiles essentielles ont été disposées horizontalement dans les puits des microplaques ; tandis que, la nystatine a été ajoutée verticalement. Une suspension fraîche de *C. albicans* a été ensuite introduite dans chaque puit, suivie d'une incubation de 24 h à 37°C.

La viabilité des cellules planctoniques a été évaluée par le test de réduction du TTC, tandis que les CMI pour les cellules sessiles (cas des biofilms) ont été déterminées par la mesure de l'absorbance à 490 nm. Pour quantifier l'interaction entre les agents antimicrobiens, le Fractional Inhibition Concentration Index (FICI) a été calculé selon la formule suivante :

$$FICI = \sum FIC = FIC_{\text{Huile essentielle}} + FIC_{\text{Nystatin}}$$

Avec:

$$FIC_{\text{Huile essentielle}} = \text{CMI}_{\text{Huile essentielle en combinaison}} / \text{CMI}_{\text{Huile essentielle seule}}$$

$$FIC_{\text{Nystatin}} = \text{CMI}_{\text{Nystatin en combinaison}} / \text{CMI}_{\text{Nystatin seule}}$$

L'analyse des FICI permet de qualifier les interactions comme synergique si $FICI \leq 0,5$, additive si FICI est compris entre 0,5 et 1, indifférente si $FICI > 1$ mais < 4 , et antagoniste si $FICI \geq 4$ (Benziane et *al.*, 2023).

I.5.6 Observation des biofilms au microscope électronique à balayage

L'huile essentielle d'*O. vulgare* a été sélectionnée pour l'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) en raison de son activité antifongique significative contre *C. albicans*. Pour cette étude, la souche CA1 a été utilisée. Des lamelles de verre stérilisées ont été placées dans des plaques de culture à 24 puits etensemencées avec 500 μ l de suspension cellulaire standardisée (10^6 UFC/ml). Après incubation de 24 h à 37°C, les biofilms formés ont été soigneusement lavés et traités avec des concentrations d'huile essentielle équivalentes à 2 $\times$, 4 $\times$ et 8 $\times$ CMI pendant 24 h supplémentaires. Les puits sans traitement ont servi de témoin. Après incubation, les biofilms ont été lavés trois fois avec du PBS, fixés par l'addition d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 4 h à température ambiante, puis rincés trois fois avec du PBS. Les échantillons ont ensuite été déshydratés à l'aide de solutions d'éthanol de concentrations croissantes (30%, 50%, 70% et 100%), puis séchés à l'air. L'analyse des biofilms a été réalisée à l'aide du microscope Philips ESEM XL30 (Philips, Allemagne).

I.6 Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS (version 26). Chaque expérience a été réalisée en triplicata sur des jours séparés, et les résultats ont été présentés sous forme de moyennes avec écarts-types. La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro–Wilk. Le test du Chi carré a été utilisé pour comparer les pourcentages entre les groupes afin de déterminer les différences significatives. Le test de Mann-Whitney a été appliqué pour évaluer les différences de biomasse et d'activité métabolique des biofilms entre les groupes de *Candida*. La corrélation entre la méthode du CV et la réduction du TTC a été examinée par la corrélation de rang de Spearman. Le test de *t*-student a servi à comparer les huiles essentielles et à évaluer les différences entre les groupes de test et de contrôle pour la formation de tubes germinatifs. Les résultats avec des valeurs *P* inférieures ou égales à 5% ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1 Partie I : Isolement des *Candida*

Parmi les 155 échantillons analysés, 120 (77,42%) ont montré une croissance positive de *Candida* sur gélose Sabouraud-chloramphénicol, tandis que 35 échantillons (22,58%) étaient négatifs (Tableau 4). L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative dans la prévalence des souches de *Candida* entre les prélèvements oraux et vaginaux ($P > 0,05$).

Tableau 4: Résultats positifs et négatifs des espèces de *Candida* à partir des prélèvements.

<i>Candida</i> spp.	Prélèvement oral no. (%)	Prélèvement vaginal no. (%)	Total no. (%)
Positif	12 (85.71)	108 (76.60)	120 (77.42)
Négatif	2 (14.29)	33 (23.40)	35 (22.58)
Total no.	14	141	155 (100)
Chi-square χ^2	0.606	0.606	-
P-value	> 0.05	> 0.05	-

II.1.1 Examen direct

L'analyse microscopique directe de plusieurs prélèvements vaginaux a mis en évidence de nombreuses cellules rondes ou ovales, ressemblant à des levures. Certaines de ces cellules présentaient des signes de bourgeonnement, une caractéristique typique des levures du genre *Candida*. De plus, des structures filamenteuses courtes, potentiellement des pseudohyphes, ont également été observées (Figure 25).

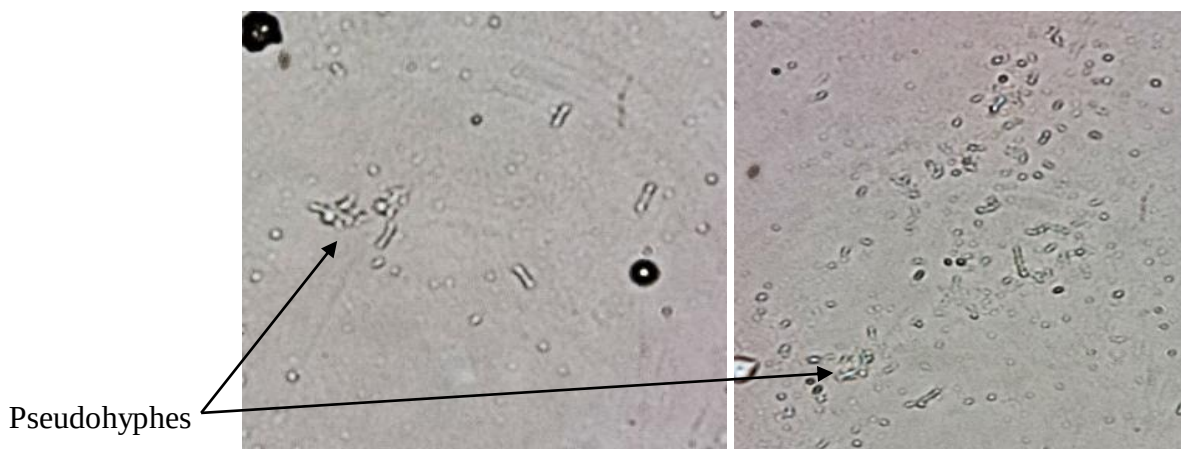


Figure 25: Examen direct des prélèvements.

II.1.2 Purification et identification des espèces de *Candida*

II.1.2.1 Examen des cultures

II.1.2.1.1 Examen macroscopique

Après culture des prélèvements, les observations macroscopiques ont révélé des différences caractéristiques entre les espèces de *Candida*. *C. albicans* et *C. dubliniensis* ont formé des colonies crèmes à blanches et lisses, tandis que *C. tropicalis* a produit des colonies similaires, mais avec des surfaces lisses ou plissées. *C. glabrata*, quant à elle, a donné des colonies plus petites, homogènes, et lisses, sans formation de filaments (Figure 26). En prolongeant l'incubation, *C. albicans* et *C. tropicalis* peuvent former des filaments visibles.

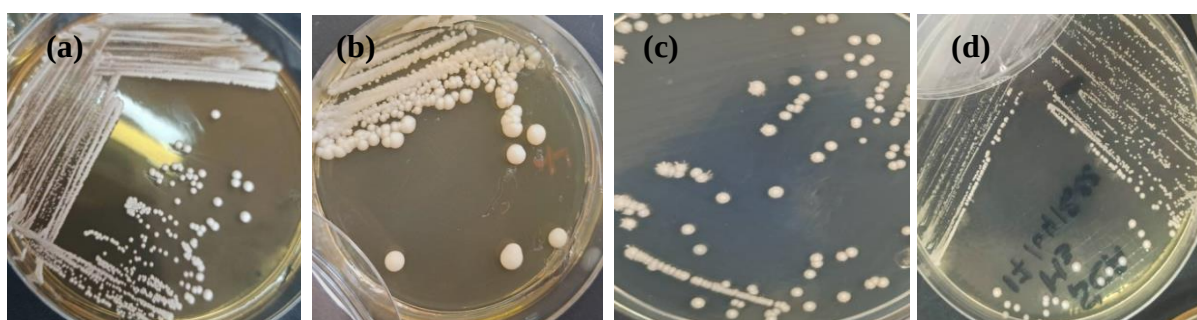


Figure 26: Examen macroscopique des espèces de *Candida* après culture.

(a): *C. albicans* ; (b): *C. dubliniensis* ; (c): *C. tropicalis* ; (d): *C. glabrata*.

II.1.2.1.2 Examen microscopique

L'examen microscopique des colonies au grossissement $\times 40$, puis $\times 100$ a révélé des caractéristiques distinctes pour chaque espèce. *C. albicans* et *C. dubliniensis* ont montré des cellules ovoïdes de grande taille accompagnées de pseudohyphes avec des segments allongés. *C. tropicalis* présentait des bourgeons allongés et des pseudohyphes moins développés. En revanche, *C. glabrata* se distinguait par ses levures arrondies de petite taille, sans formation de filaments (Figure 27).

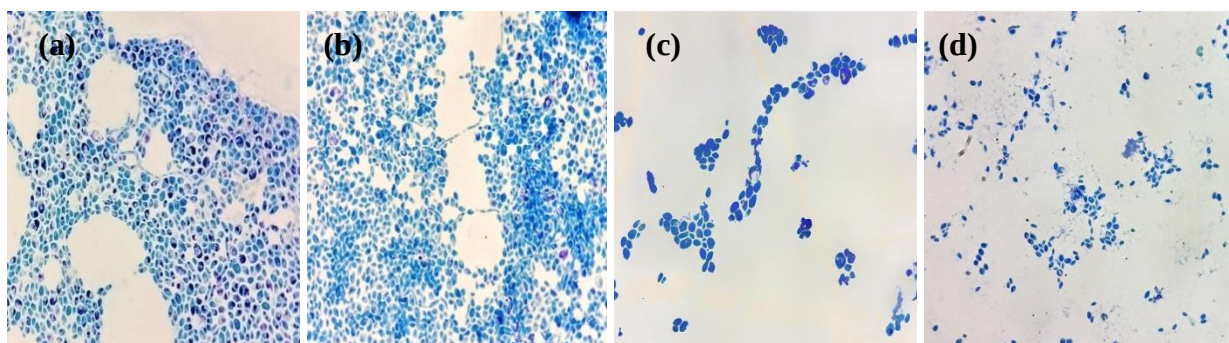


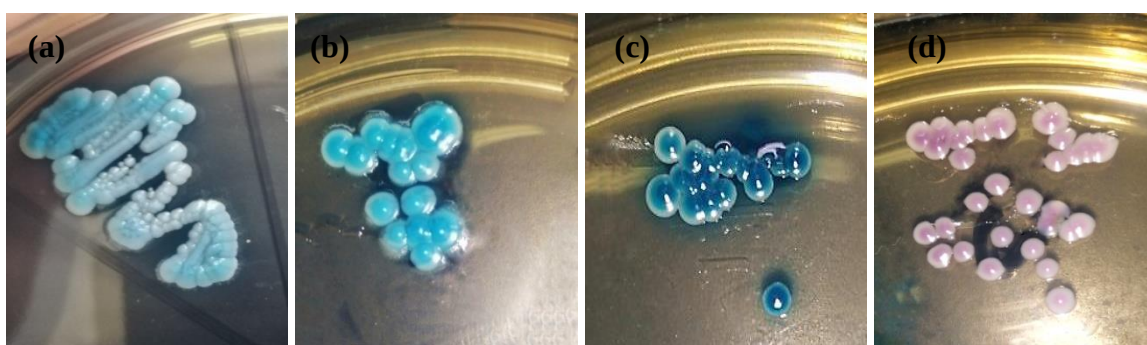
Figure 27: Examen microscopique des espèces de *Candida* après coloration simple (G $\times$ 100).

(a): *C. albicans* ; (b): *C. dubliniensis* ; (c): *C. tropicalis* ; (d): *C. glabrata*.

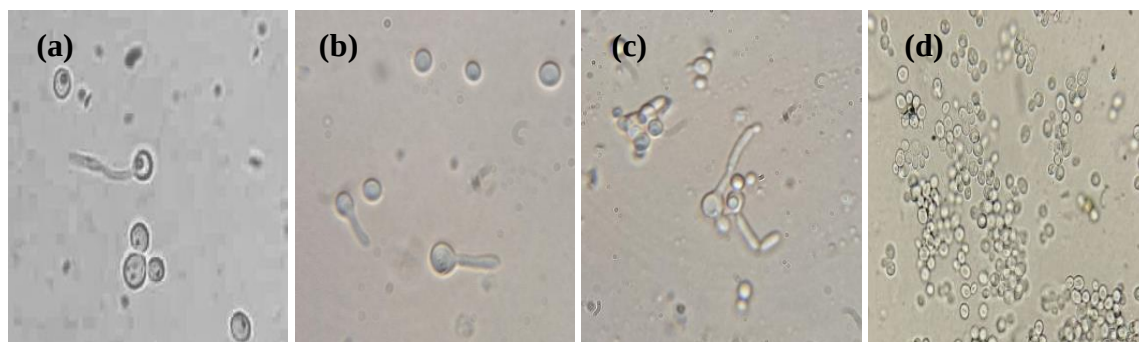
II.1.3 Culture sur CHROMagar *Candida* et analyse morphologique

Les cultures des souches sur milieu CHROMagar ont permis de distinguer *C. albicans* des autres espèces du même genre. *C. albicans* a formé des colonies vertes, accompagnées de tubes germinatifs et de chlamydospores. *C. dubliniensis* a montré des colonies similaires, mais avec des chlamydospores terminales. *C. tropicalis* a produit des colonies bleues métalliques, avec des tubes germinatifs présentant des constriction au niveau du col et un test positif pour les chlamydospores. Enfin, *C. glabrata* s'est différenciée par des colonies roses, des cellules bourgeonnantes sans pseudohyphes, et l'absence de chlamydospores.

1. Culture sur CHROMagar *Candida*



2. Tube germinatif



3. Chlamydosporulation

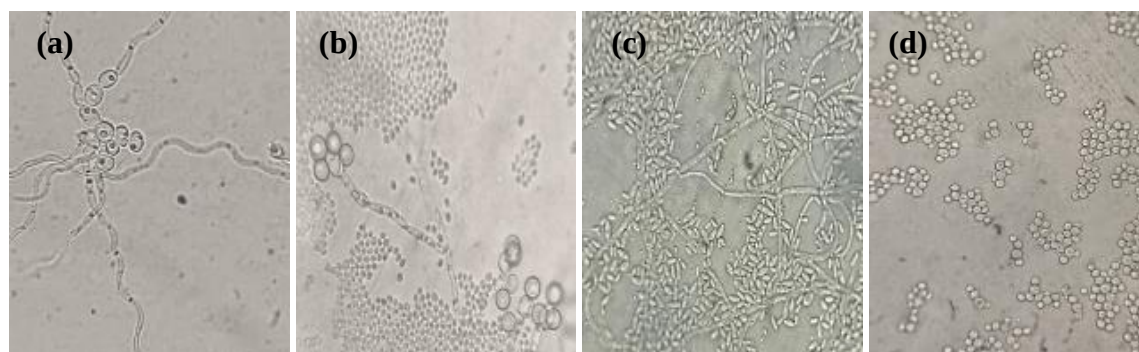


Figure 28: Comparaison des colonies de *Candida* sur CHROMagar et de leurs structures de tubes germinatifs et de chlamydospores observées au microscope (G×100).

(a): *C. albicans* ; (b): *C. dubliniensis* ; (c): *C. tropicalis* ; (d): *C. glabrata*.

II.1.4 Poursuivre l'identification des autres espèces de *Candida non albicans*

Le diagnostic des espèces de *Candida*, autres que *C. albicans* nécessite l'emploi de plusieurs techniques complémentaires, comme le résume le Tableau 5 suivant. *C. dubliniensis* se distingue par sa sensibilité au cycloheximide, contrairement à *C. albicans*, qui peut se développer en présence de cet agent. Les tests de fermentation et d'assimilation des sucres montrent que *C. albicans* peut fermenter divers sucres, y compris le xylose, le saccharose et le galactose, alors que *C. glabrata* ne fermente aucun des sucres testés et présente une capacité d'assimilation très limitée. *C. tropicalis* est capable de fermenter le saccharose et le maltose, mais ne fermente pas le lactose. *C. dubliniensis* présente un profil d'assimilation similaire à celui de *C. albicans*, mais ne peut pas assimiler le xylose (Figure 29). De plus, le test de tolérance à 45°C indique que *C. albicans* est capable de croître à cette température, contrairement aux autres espèces de *Candida* testées.

Tableau 5: Identification des espèces de *Candida* par des tests phénotypiques.

Origine	Espèces	No.	SCA	TG	CH	T° 45°C	Assimilation des sucres								Fermentation			
							Xyl	Sor	Mal	Sac	Raf	Lac	Myo	Gal	Glu	Gal	Lac	Raf
Vaginale	<i>C. albicans</i>	90	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	<i>C. dubliniensis</i>	2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	<i>C. tropicalis</i>	1	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	<i>C. glabrata</i>	15	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Autres espèces	33	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Orale	<i>C. albicans</i>	12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	<i>C. non albicans</i>	0	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	Autres espèces	2	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Total		155																
<i>C. albicans</i> ATCC 10231			+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10237			+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

TG: Tube germinatif, CH: Chlamydo-spore, SCA : Sabouraud Chloramphénicol Actidione ; Xyl: Xylose; Sor: Sorbitol, Mal: Maltose, Sacc: Saccharose, Raf: Raffinose, LAC: Lactose, Myo: Myo-inositol, Gal: Galactose.

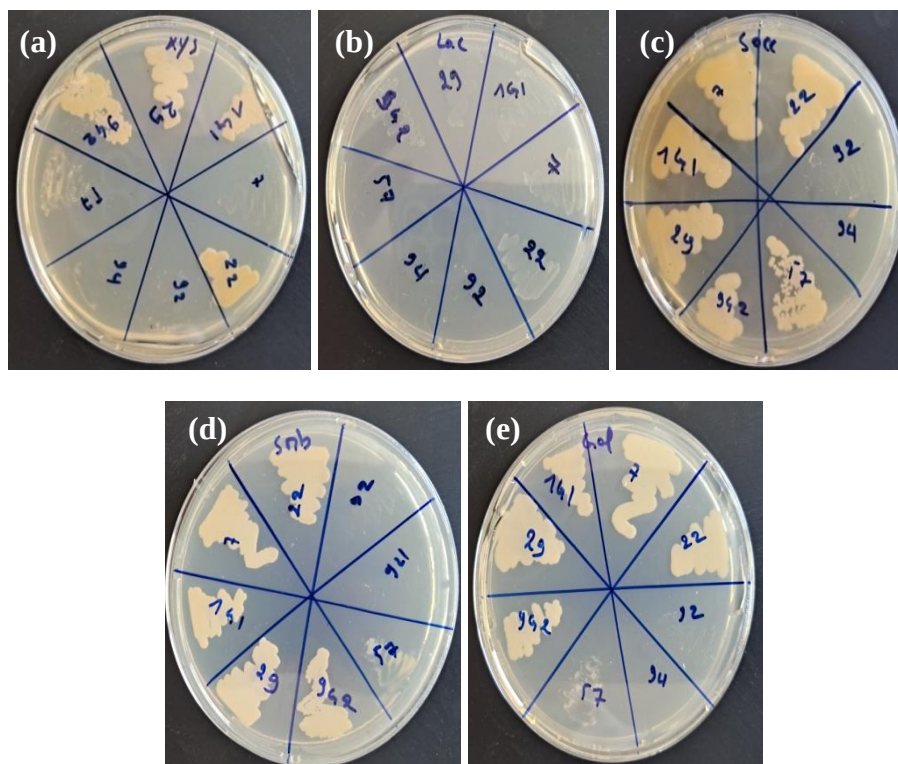


Figure 29: Assimilation des sucres ;

Xylose (a), lactose (b), saccarose (c) et sorbitol (d), galactose (e).

II.1.4.1 Répartition des espèces isolées de *Candida*

Le Tableau 6 montre la distribution des espèces de *Candida* dans les échantillons oraux et vaginaux. Sur les 120 échantillons analysés, *C. albicans* a été l'espèce prédominante, identifiée dans 85% des cas. Parmi les levures non-*albicans*, *C. glabrata* est la deuxième espèce la plus fréquente, représentant 12,5% du total des isolats, mais uniquement dans les prélèvements vaginaux. De même, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* ont été isolées uniquement dans les échantillons vaginaux, avec des pourcentages de 1,67% et 0,83%, respectivement.

Tableau 6: Distribution des espèces de *Candida* spp.

<i>Candida</i> spp.	Prélèvement buccal no. (%)	Prélèvement vaginal no. (%)	Total no. (%)
<i>C. albicans</i>	12 (100)	90 (83.33)	102 (85)
<i>C. glabrata</i>	0 (0)	15 (13.89)	15 (12.5)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0)	2 (1.85)	2 (1.67)
<i>C. tropicalis</i>	0 (0)	1 (0.93)	1 (0.83)
Total no.	12 (100)	108 (100)	120 (100)

II.1.5 Identification moléculaire

Le Tableau 7 montre les résultats de l'identification génotypique de 7 souches isolées de *C. albicans*. Les séquences de ces souches, référencées sous les numéros d'accès GenBank OQ675016 à OQ675022, ont été comparées à la base de données NCBI, révélant une correspondance de 99,65% avec *C. albicans* SC5314 (GenBank XR_002086444.1).

Tableau 7: Identification moléculaire des souches isolées de *C. albicans*.

No. des souches et origine		GenBank accession no.
Muqueuse vaginale	CA1	OQ675016
	CA2	OQ675017
	CA4	OQ675018
Muqueuse buccale	CA6	OQ675019
	CA8	OQ675020
	CA9	OQ675021
	CA10	OQ675022

CA: *Candida albicans*.

La Figure 30 montre l'arbre phylogénétique généré à l'aide du logiciel MEGA, en utilisant la méthode Neighbor-joining, qui illustre les relations évolutives entre les différentes souches de *C. albicans* isolées (OQ675016-OQ675022) et une souche de référence (*C. albicans* SC5314). Les valeurs de bootstrap élevées (proches de 100) indiquent une forte confiance dans les regroupements observés.

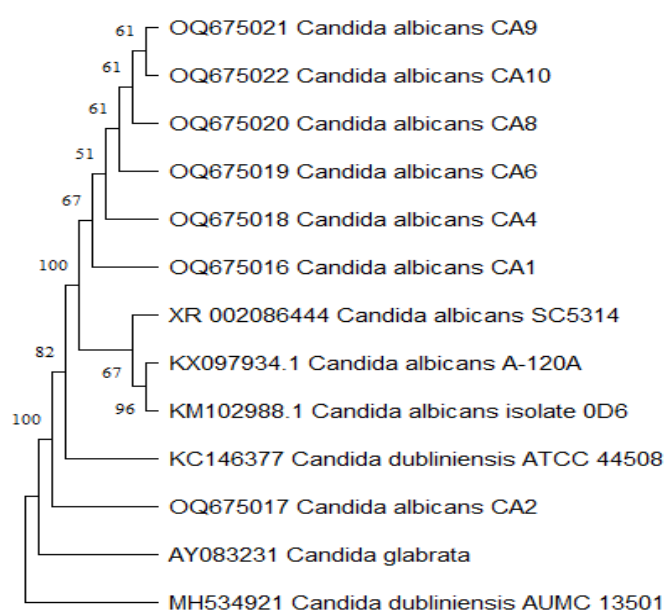


Figure 30: Arbre phylogénétique des isolats de *C. albicans* généré par MEGA.

II.1.6 Évaluation de la sensibilité antifongique des isolats de *Candida*

Le Tableau 8 présente les profils de sensibilité des isolats de *Candida* au fluconazole et à l'amphotéricine B, évalués par la méthode de diffusion sur disque. Pour le fluconazole, une majorité des isolats, soit 112 sur 120 (93,3%), ont montré une sensibilité, avec des diamètres de zones d'inhibition variant de 13,3 mm à 49,3 mm. Parmi les isolats, 4 (3,3%) présentaient une sensibilité dose-dépendante et 4 (3,3%) étaient résistants. Pour l'amphotéricine B, 95 isolats (79,2%) se sont révélés sensibles, tandis que 25 (20,8%) étaient résistants, avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 9,0 mm à 22,3 mm.

C. albicans a montré une sensibilité élevée au fluconazole, avec une sensibilité de 94,4% parmi les isolats vaginaux et de 91,7% parmi les isolats oraux. Toutefois, 22,2% des isolats vaginaux de *C. albicans* étaient résistants à l'amphotéricine B.

Tableau 8: Sensibilité antifongique *in vitro* des isolats de *Candida*.

Prélèvement		No.	Agents antifongiques no. (%)						
			Fluconazole (25 µg)				Amphotéricine B (20 µg)		
			Range (mm) ^a	S	SDD	R	Range (mm) ^a	S	R
Vaginal	<i>C. albicans</i>	90	14.3 – 42.7	85 (94.4)	3 (3.3)	2 (2.2)	9.0 – 22.3	70 (77.8)	20 (22.2)
	<i>C. dubliniensis</i>	2	13.3 – 26.3	1 (50)	0 (0)	1 (50)	18.7 – 19.7	2 (100)	0 (0)
	<i>C. tropicalis</i>	1	30,3	1 (100)	0 (0)	0 (0)	19,7	1 (100)	0 (0)
	<i>C. glabrata</i>	15	18.7 – 27.7	14 (93.3)	1 (6.7)	0 (0)	9.0 – 15.3	11 (73.3)	4 (26.7)
Buccal	<i>C. albicans</i>	12	13.7 – 49.3	11 (91.7)	0 (0)	1 (8.3)	9.7 – 18.7	11 (91.7)	1 (8.3)
Total no. (%)		120	13.3 – 49.3	112 (93.3)	4 (3.3)	4 (3.3)	9.0 – 22.3	95 (79.2)	25 (20.8)
Souches de référence	<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	28.3	-	-	-	12.0	-	-
	<i>C. albicans</i> ATCC10237	-	17.3	-	-	-	15.0	-	-

^a Diamètre de la zone d'inhibition (moyenne);

R: Résistante; S: Sensible; SDD: Sensibilité dose-dépendante.

II.1.7 Évaluation de la formation des biofilms

Le Tableau 9 présente les résultats de l'activité métabolique et la biomasse des biofilms formés par différentes espèces de *Candida*, mesurées respectivement par les méthodes de réduction du tétrazolium et de coloration au violet de gentiane. Pour *C. albicans*,

les valeurs de biomasse ont montré une importante variabilité, avec des DO allant de 0,055 à 1,605, ce qui explique l'écart-type élevé. Une variabilité similaire a été observée pour l'activité métabolique, avec des DO allant de 0,015 à 0,561. Les analyses statistiques ont indiqué des différences significatives entre les groupes ($P < 0,05$).

Comparées à *C. albicans*, les espèces *C. glabrata* et *C. tropicalis* ont produit une biomasse de biofilm plus élevée. En revanche, *C. dubliniensis* a présenté la plus faible production de biofilm avec une DO de 0,148. Les taux d'activité métabolique ont également montré des variations importantes entre les espèces, *C. glabrata* ayant la plus forte activité métabolique (DO = 0,141). Une corrélation significative a été observée entre la biomasse de biofilm et l'activité métabolique, pour *C. albicans* ($r = 0,806$, $P < 0,001$) ainsi que pour les espèces de *Candida* non-*albicans* ($r = 0,645$, $P = 0,004$).

Tableau 9: Développement des biofilms de *Candida* spp.

<i>Candida</i> spp.	No.	DO/Moyenne $\pm$ SD (intervalle)	
		Test de TTC	Test de CV
<i>C. albicans</i>	102	0.106 $\pm$ 0.08 (0.015-0.561)	0.165 $\pm$ 0.19 (0.055-1.605)
<i>C. non-albicans</i>	18	0.139 $\pm$ 0.066 (0.035-0.236)	0.250 $\pm$ 0.139 (0.074-0.594)
<i>P</i> -Value ^a	-	$P = 0.023$	$P = 0.009$
<i>C. dubliniensis</i>	2	0.137 $\pm$ 0.086 (0.076-0.197)	0.148 $\pm$ 0.011 (0.140-0.155)
<i>C. tropicalis</i>	1	0.112	0.234
<i>C. glabrata</i>	15	0.141 $\pm$ 0.069 (0.035-0.236)	0.264 $\pm$ 0.185 (0.074-0.594)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	0.077 $\pm$ 0.011	0.134 $\pm$ 0.005
<i>C. albicans</i> ATCC10237	-	0.146 $\pm$ 0.030	0.165 $\pm$ 0.005

^a Comparaison entre les groupes (*Candida albicans* / *Candida non-albicans*) ;

Les données sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type (SD).

II.1.7.1 Catégories des biofilms

La Figure 31 illustre la distribution des catégories de biofilms formés par chaque espèce de *Candida*, déterminée par les valeurs seuils de densité optique selon les méthodes de coloration au cristal violet (CV) et de réduction du TTC. Pour le test CV, les catégories sont définies comme suit : absence de formation de biofilm (LBF) pour $DO \leq 0,066$, formation de biofilm faible (WBF) pour $0,066 < DO \leq 0,133$, formation modérée (MBF) pour $0,133 < DO \leq 0,265$, et formation intense (HBF) pour $DO > 0,265$. Pour le test de réduction du TTC, les seuils d'activité métabolique sont : absence d'activité métabolique (LMA) pour $DO \leq 0,050$,

activité faible (WMA) pour $0,050 < DO \leq 0,10$, activité modérée (MMA) pour $0,10 < DO \leq 0,201$, et activité intense (HMA) pour $DO > 0,201$.

Selon le test au CV, 51% des souches de *C. albicans* ont montré une faible formation de biofilm. En parallèle, le test au TTC a révélé que 39% de ces souches présentaient une faible activité métabolique. Les souches de *C. glabrata* ont démontré une formation de biofilm élevée dans 33% des cas d'après le test CV, suivies par *C. albicans* avec 11%. Une formation modérée de biofilm a été observée chez *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*.

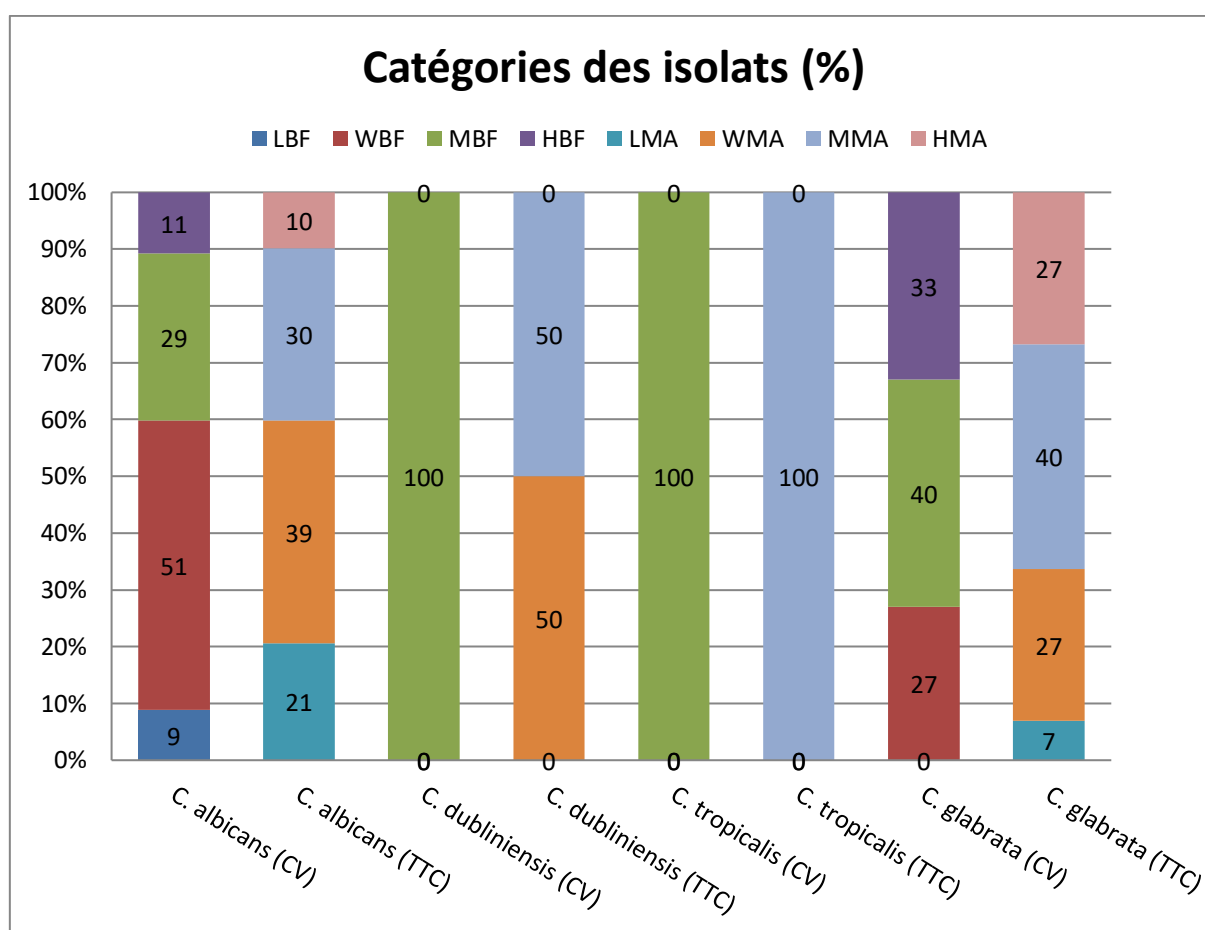


Figure 31: Pourcentages des catégories de biofilms formés par chaque espèce, évalués par les deux méthodes, coloration au violet de cristal (CV) et réduction du TTC.

LBF : absence de formation de biofilm, WBF : formation de biofilm faible, MBF : formation de biofilm modérée, HBF : formation de biofilm élevée ;

LMA : absence d'activité métabolique, WMA : activité métabolique faible, MMA : activité métabolique modérée, HMA : activité métabolique élevée.

II.1.7.2 Évaluation de la capacité de formation de biofilm des souches de *Candida* résistantes aux antifongiques

Parmi les souches de *C. albicans* résistantes à l'amphotéricine B, 85,7% des 21 souches étudiées ont montré une formation de biofilm, dont 38,1% avec une formation intense. En revanche, toutes les souches non-*albicans* résistantes à l'amphotéricine B ont formé des biofilms, avec 50% présentant une formation intense. Pour les souches résistantes au fluconazole, 33,3% des souches de *C. albicans* ont formé des biofilms, tandis que toutes les espèces non-*albicans* ont également formé des biofilms. Aucune formation de biofilm intense n'a été observée parmi les souches résistantes au fluconazole (Tableau 10).

Tableau 10: Statut de la formation de biofilm chez les espèces de *Candida* résistantes à l'amphotéricine B et au fluconazole.

<i>Candida</i> spp.	N°	Souches no. (%)	
		Formatrice de biofilm	Formatrice de biofilm intense
<i>C. albicans</i> AMP-R ^a	21	18 (85.7)	8 (38.1)
<i>Candida</i> non <i>albicans</i> AMP-R	4	4 (100)	2 (50)
<i>C. albicans</i> FLC-R ^b	3	1 (33.3)	0 (0)
<i>Candida</i> non <i>albicans</i> FLC-R	1	1 (100)	0 (0)

^a AMP-R : Amphotericin B-résistante ;

^b FLC-R : Fluconazole-résistante.

II.1.8 Discussion

L'objectif de cette partie d'étude était d'évaluer la répartition des souches de *Candida* à Tiaret, en Algérie, ainsi que leur sensibilité à deux agents antifongiques et leur capacité à former des biofilms. Au cours de notre investigation, 155 isolats obtenus de patients ont été analysés. Sur la base des caractéristiques culturelles et microscopiques, tous les isolats de *Candida* ont présenté une croissance robuste sur milieu Sabouraud chloramphénicol après 24 à 48 h d'incubation à 37°C. L'identification des espèces de *Candida* a été réalisée en utilisant des méthodes conventionnelles, notamment le test du tube germinatif, la production de chlamydospores et l'assimilation des sucres. En complément de ces tests, un milieu chromogène (CHROMagar® *Candida*) a été utilisé, permettant de simplifier et d'accélérer le processus d'identification en différenciant les espèces de *Candida* grâce à des caractéristiques biochimiques spécifiques (Alhussaini, 2013). Toutefois, il convient de noter que, bien que le milieu CHROMagar soit un outil précieux, sa fiabilité peut être limitée pour certaines espèces.

Par exemple, l'apparition de colonies roses sur ce milieu pourrait indiquer la présence de *C. glabrata* ou de *C. krusei*. La distinction entre ces deux espèces repose principalement sur la formation de pseudohyphes, caractéristiques de *C. krusei*, mais absents chez *C. glabrata* (Alhussaini, 2013). De plus, la différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis* peut être complexe, car ces deux espèces forment des colonies vertes. Néanmoins, un critère distinctif repose sur leur capacité à assimiler le xylose, *C. albicans* montrant une assimilation du xylose tandis que, pour la plupart, *C. dubliniensis* ne le fait pas (Khan et al., 2012 ; Khlif et al., 2011).

Nos résultats indiquent que *C. albicans* est l'espèce prédominante dans les cas de candidose vaginale, représentant 83,33% des isolats analysés. Cette prévalence élevée est en accord avec des études antérieures qui identifient *C. albicans* comme l'agent le plus fréquent des infections fongiques génitales (Gunther et al., 2014; Jamil et al., 2017). Cependant, certaines études rapportent des distributions différentes. Hashemi et al. (2019) ont trouvé que 55,78% des isolats étaient des *Candida* non-*albicans*, avec une prédominance de *C. lusitaniae*. De même, Kalaiarasan et al. (2017) ont identifié *C. glabrata* comme l'espèce la plus fréquente (45,1 %) parmi leurs isolats. En effet, ces dernières années, les espèces de *Candida* non-*albicans* sont devenues plus courantes dans les candidoses vaginales. Cette incidence peut être attribuée à divers facteurs, tels que la localisation géographique, la population étudiée, ainsi que de multiples variables cliniques et physiologiques (Fanou et al., 2022; Ghaddar et al., 2020).

Dans les cas des candidoses orales, nos résultats montrent que tous les isolats appartiennent à *C. albicans*. Toutefois, la diversité génétique au sein de cette espèce et la possibilité de la présence d'autres espèces dans la cavité orale, soulignent la nécessité d'une approche plus exhaustive avec des échantillons plus larges pour confirmer et approfondir nos conclusions. Nos résultats sont cohérents avec ceux de plusieurs autres recherches, notamment celles de Mohammed et al. (2017) qui ont rapporté une prévalence de 47%, et de Mohamadi et al. (2014) qui ont trouvé *C. albicans* parmi 64,4% des isolats.

L'évaluation de la sensibilité *in vitro* des souches isolées à deux agents antifongiques a montré que le fluconazole possédait une efficacité supérieure, avec un taux de sensibilité de 93,3%, suivi de l'amphotéricine B avec 79,2%. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Tulasidas et al. (2018), qui ont observé que 79,1% des espèces isolées de patients atteints de candidose vulvo-vaginale étaient sensibles au fluconazole. De même,

ElFeky et *al.* (2016) ont noté un taux de sensibilité de 77,8% au fluconazole, tandis que 98,4% des isolats étaient sensibles à l'amphotéricine B. Par ailleurs, l'étude de Marak & Dhanashree (2018) a démontré que toutes les souches de *Candida* testées étaient sensibles à l'amphotéricine B.

Cette étude a examiné également la capacité des souches cliniques de *Candida* à former des biofilms. Diverses méthodes ont été employées afin d'évaluer cette formation *in vitro*, la coloration au cristal violet, étant largement utilisée pour quantifier la biomasse totale des biofilms. Toutefois, en raison de la nature non spécifique de cette méthode, il est recommandé d'explorer des approches complémentaires basées sur la mesure de l'activité métabolique. Des sels de tétrazolum réducteurs ont été largement utilisés pour évaluer la capacité de formation de biofilms, tant chez les bactéries (Oleksy-Wawrzyniak et *al.*, 2022 ; Song et *al.*, 2020 ; Sabaeifard et *al.*, 2014) que chez les espèces de *Candida* (Muadcheingka & Tantivitayakul, 2015 ; Marcos-Zambrano et *al.*, 2014 ; Thein et *al.*, 2007).

Dans cette investigation, la quantification des biofilms par coloration au violet de gentiane a révélé que la biomasse totale du biofilm de *C. albicans* était relativement faible par rapport aux espèces de *Candida* non-*albicans*. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Muadcheingka & Tantivitayakul (2015). En revanche, Ferreira et *al.* (2013) n'ont observé aucune différence significative dans la production de biofilms entre les deux groupes.

Parmi les souches non-*albicans*, *C. glabrata* a montré la plus grande capacité de formation de biofilms, avec 33% des souches produisant un biofilm intense. Ce résultat contraste avec les observations de Tulasidas et *al.* (2018) et de Sahal & Bilkay (2018), qui ont identifié *C. tropicalis* comme l'espèce produisant le biofilm le plus intense. Par ailleurs, les études de Pathak et *al.* (2012) et Silva et *al.* (2010) ont démontré que *C. glabrata* présente une forte capacité de formation de biofilms sur des surfaces en acrylique et en silicone, respectivement. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la formation de biofilm ne dépend pas nécessairement de la morphologie hyphale, *C. glabrata* étant constitué exclusivement de blastospores et ne présentant pas d'hyphes (Seneviratne et *al.*, 2009).

Cette étude a utilisé la réduction des sels de tétrazolum (TTC) pour évaluer l'activité métabolique des biofilms de *Candida*. Une corrélation a été observée entre cette méthode et la coloration au violet de gentiane. Environ 27% des souches de *C. glabrata* ont présenté une activité métabolique intense, suivies de *C. albicans* à 10%. Ces résultats corroborent ceux de

Sánchez-Vargas et al. (2013) et Marcos-Zambrano et al. (2014), qui ont également constaté que *C. glabrata* possédait la plus haute activité métabolique. En revanche, Tulasidas et al. (2018) ont observé une activité métabolique plus élevée chez *C. tropicalis*.

Une observation notable concerne *C. tropicalis*, qui a montré une biomasse de biofilm importante mais une activité métabolique relativement faible. Marcos-Zambrano et al. (2014) ont rapporté des observations similaires, suggérant que la densité de la matrice extracellulaire dans le biofilm de cette espèce pourrait limiter l'accès des nutriments et de l'oxygène.

Nos résultats indiquent que la méthode TTC est efficace pour détecter les biofilms de *Candida*, permettant la visualisation par la formation d'un précipité rouge de formazan, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de cellules viables (Oleksy-Wawrzyniak et al., 2022).

L'activité métabolique se révèle comme un indicateur crucial de la pathogénicité, souvent associée à l'expression des facteurs de virulence et à la résistance aux antifongiques (Ferreira et al., 2013). Tumbarello et al. (2012) ont mis en évidence l'impact clinique majeur de la production de biofilms, avec des taux de mortalité plus élevés chez les patients infectés par des souches formant des biofilms par rapport à ceux infectés par des souches non-formantes, ainsi qu'une augmentation du coût et de la durée du traitement. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de notre enquête, où une majorité des souches résistantes aux antifongiques étaient également des formateurs de biofilms. De plus, Tulasidas et al. (2018) ont noté une résistance accrue au fluconazole chez les souches produisant des biofilms par rapport aux souches non-productrices.

II.1.9 Conclusion

Ces résultats montrent que *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée, suivie par *C. glabrata*. Le fluconazole est plus efficace que l'amphotéricine B pour traiter ces infections. L'analyse de la capacité de formation de biofilms par les deux méthodes a mis en évidence des variations significatives, avec *C. glabrata* présentant la plus grande capacité de production de biofilms. Ces résultats soulignent l'importance clinique des biofilms dans les infections à *Candida* et mettent en évidence la nécessité de poursuivre les recherches pour améliorer les stratégies thérapeutiques et les méthodes de détection, notamment pour les souches capables de former des biofilms.

II.2 Partie II : Plantes médicinales

II.2.1 Rendement et caractérisation organoleptique des huiles essentielles

Le Tableau 11 montre le rendement et les caractéristiques des huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium*. Les deux huiles sont huileuses, mais elles diffèrent par leur couleur et leur odeur. L'huile essentielle d'*O. vulgare* a un rendement élevé de 3.8%, comparé à celui de *M. pulegium*, qui est de 0.58%.

Tableau 11: Rendement et caractères organoleptiques des huiles essentielles.

Huile essentielle	<i>O. vulgare</i>	<i>M. pulegium</i>
Aspect	Volatil	Volatil
Couleur	Jaune foncé	Jaune clair
Odeur	Aromatique forte	Aromatique modérée
Rendement (%)	3.8	0.58

II.2.2 Analyse chimique par GC-MS

Dans cette étude, une analyse GC-MS/GC-FID a été réalisée pour évaluer les huiles essentielles extraites par hydrodistillation des deux plantes médicinales choisies. Les résultats de l'analyse, présentés dans le Tableau 12, montrent les composés identifiés, ainsi que leurs pourcentages. Pour *M. pulegium*, les principaux composants sont le pulégone (70,50%), le néomenthol (6,24%), l'isomenthone (5,62%) et la menthone (3,71%). En ce qui concerne *O. vulgare*, les principaux constituants sont le thymol (53,23%), le gamma-terpinène (21,92%), le p-cymène (7,03%) et le carvacrol (5,89%).

Tableau 12: Temps de rétention et pourcentage des composés détectés.

N°	TR (min)	Constituants	<i>O. vulgare</i> %	<i>M. pulegium</i> %
1	8,00	alpha-Pinene	0,25	0,06
2	8,09	alpha-Thuyene	0,38	-
3	10,81	bêta-Pinene	0,10	0,09
4	11,31	Sabinene	0,01	0,02
5	12,52	delta3-Carene	0,06	
6	13,15	bêta-Myrcene	1,48	0,02
7	13,29	alpha-Phellandrene	0,42	-
8	13,46	psi-Limonene	-	0,01
9	14,01	alpha-Terpinene	2,15	-
10	14,94	Limonene	0,36	0,49

11	15,38	1,8-Cineole	0,04	0,08
12	15,43	bêta-Phellandrene	0,25	-
13	17,71	gamma-Terpinene	21,92	0,03
14	17,83	trans-bêta-Ocimene	0,10	-
15	17,93	3-Octanone	0,07	0,15
16	18,97	p-Cymene	7,03	0,08
17	19,62	Terpinolene	0,09	-
18	20,93	Aliphatic ester	-	0,10
19	22,82	3-Octanol acetate	-	0,10
20	26,27	3-Octanol	-	1,00
21	29,87	1-Octen-3-ol	0,39	-
22	30,81	trans-Thuyanol	0,47	-
23	30,89	Menthone	-	3,71
24	32,10	Menthofurane	-	0,06
25	32,66	Isomenthone	-	5,62
26	32,88	alpha-Copaene	-	0,02
27	34,51	bêta-Bourbonene	-	0,07
28	35,13	Neomenthyl acetate	-	0,14
29	36,06	cis-Thuyanol	0,23	-
30	36,13	Linalol	0,98	0,03
31	36,71	1-Octanol	0,02	-
32	37,09	Isopulegol	-	0,10
33	37,66	cis-Isopulegone	-	0,51
34	38,32	Menthyl acetate		0,07
35	38,44	trans-Isopulegone	-	1,12
36	39,12	Methyl thymol ether	0,49	-
37	39,38	Neomenthol	-	6,24
38	39,39	bêta-Caryophyllene	0,78	0,15
39	39,51	Terpinene-4-ol	0,53	0,15
40	39,75	Methyl carvacrol ether	0,11	-
41	39,88	cis-Dihydrocarvone	0,03	-
42	41,46	Neoisomenthol	-	0,70
43	42,69	Pulegone	-	70,50
44	43,46	Menthol	-	0,05
45	43,59	delta-Terpineol	-	0,02

46	43,72	trans-Verbenol	-	0,02
47	43,76	alpha-Humulene	0,10	0,22
48	44,10	Ipsdienol	0,02	-
49	45,23	alpha-Terpineol	0,29	0,10
50	45,43	Borneol	0,15	0,03
51	46,17	Germacrene D	-	0,03
52	46,34	Carvenone	0,03	-
53	46,96	Piperitone	-	0,16
54	47,28	bêta-Bisabolene	0,04	-
55	47,41	Carvone	0,02	0,08
56	48,50	trans-Isopiperitenol	-	0,02
57	49,02	delta-Cadinene	0,02	-
58	49,12	gamma-Cadinene	0,02	-
59	52,82	trans-Anethol	-	0,02
60	53,17	trans-Carveol	-	0,10
61	53,38	Isopiperitenone	-	0,04
62	53,92	p-Cymene-8-ol	0,02	0,02
63	54,87	cis-Carveol	-	0,05
64	57,95	Piperitenone	-	1,72
65	59,83	Piperitenoneoxide	-	0,02
66	61,53	Caryophyllene oxide	0,17	0,54
67	61,89	2-allyl-4-methylphenol	0,02	0,12
68	64,49	epoxy-6,7-humulene	0,02	0,69
69	65,59	Caprylic acid	-	0,03
70	68,71	Spathulenol	0,15	-
71	70,66	Isothymol	0,09	-
72	71,63	Thymol	53,23	0,03
73	72,31	Isocarvacrol	0,12	-
74	72,88	Carvacrol	5,89	0,02
75	77,27	Mint lactone	-	0,47
76	79,62	Mint lactone isomere	-	0,08
TOTAL			99,12	96,07

TR: Temps de Rétention (min).

II.2.3 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles a été évaluée en mesurant le pouvoir réducteur et la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Les différents tests ont été réalisés avec des standards, ainsi que les huiles essentielles à diverses concentrations. Les valeurs des EC₅₀ et des IC₅₀ calculées ont été rapportées dans le Tableau 13. L'huile essentielle d'*O. vulgare* a montré le pouvoir réducteur le plus élevé, avec une EC₅₀ de 1,12 mg/ml. En revanche, l'huile essentielle de *M. pulegium* a présenté une capacité réductrice plus faible, avec une EC₅₀ de 17,85 mg/ml. Des résultats similaires ont été observés pour l'inhibition du radical DPPH, l'huile d'*O. vulgare* ayant démontré le pouvoir le plus élevé avec une IC₅₀ de 1,84 mg/ml, suivie de l'huile de *M. pulegium* avec une IC₅₀ de 9,49 mg/ml.

Tableau 13: Activité antioxydante des huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium*.

Huiles essentielles / standard	FRAP	DPPH
	(EC ₅₀) mg/ml	(IC ₅₀) mg/ml
Acide ascorbique	0.02694 ± 0.00147	0.00742 ± 0.0006
Acide gallique	-	0.00232 ± 0.9
<i>O. vulgare</i>	1.12 ± 0.07	1.84 ± 0.05
<i>M. pulegium</i>	17.85 ± 2.05	9.49 ± 2.28

II.2.4 Activité antifongique

II.2.4.1 Aromatogramme

Le Tableau 14 résume les résultats du test de diffusion en disque pour les huiles essentielles, indiquant une différence significative ($P < 0,05$) entre les deux huiles contre *C. albicans* sur l'ensemble des souches testées. L'huile essentielle d'*O. vulgare* a présenté les plus grandes zones d'inhibition, avec des diamètres allant de 40,8 à 57,3 mm, tandis que celle de *M. pulegium* a montré des zones d'inhibition variant de 24,6 à 37,3 mm.

Tableau 14: Test de sensibilité des huiles essentielles contre *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>		DZI (mm)	
		<i>O. vulgare</i> (10 µl)	<i>M. pulegium</i> (10 µl)
<i>C. albicans</i> ATCC10237		44.6 ± 0.1 ExS	26.6 ± 0.1 ExS
<i>C. albicans</i> ATCC10231		40.8 ± 0.2 ExS	29.2 ± 0.2 ExS
AMB-R ^A	CA1	44 ± 0.0 ExS	24.8 ± 0.2 ExS
FLC-DD ^B	CA2	57.3 ± 0.5 ExS	33.4 ± 0.1 ExS
AMB-S ^a FLC-S ^b	CA4	54.6 ± 0.1 ExS	34 ± 0.0 ExS
	CA6	51.5 ± 0.2 ExS	37.3 ± 0.5 ExS
	CA8	42 ± 0 ExS	24.6 ± 0.1 ExS
	CA9	42.2 ± 0.2 ExS	35 ± 0 ExS
	CA10	54.4 ± 0.1 ExS	31.8 ± 0.2 ExS

DZI: Diamètre des zones d'inhibition ; ExS: extrêmement sensibles ;

^A AMB-R: Amphotericin B-Resistant, ^b AMB-S: Amphotericin B-Sensible;

^B FLC-DD : Fluconazole-dose dépendante, ^b FLC-S : Fluconazole-Sensible.



Figure 32: Diamètre des zones d'inhibition des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans*.

II.2.4.2 Détermination des CMI et CMF

Les deux huiles ont été testées par la méthode de microdilution sur les souches de *C. albicans*. Les résultats sont représentés dans le Tableau 15 et Figure 33. *O. vulgare* a présenté des CMI plus importantes, comprises entre 620 et 1250 µg/ml, tandis que *M. pulegium* a montré des CMI plus élevées, allant de 2500 à 5000 µg/ml. Une différence significative a été observée entre les effets des deux huiles ($P < 0,05$). Les résultats des analyses de CMF/CMI ont révélé que les huiles possédaient des propriétés fongicides contre toutes les souches de *C.*

albicans. La nystatine a démontré une efficacité supérieure, avec des CMI variant de 2 à 4 µg/ml.

Tableau 15: Test de sensibilité antifongique des huiles et de la nystatine contre *C. albicans*.

Souches		Nystatine (µg/ml)		<i>O. vulgare</i> (µg/ml)		<i>M. pulegium</i> (µg/ml)	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>C. albicans</i> ATCC10237		2	2	620	620	2500	5000
<i>C. albicans</i> ATCC10231		4	4	620	1250	2500	5000
AMB-R ^A	CA1	2	2	1250	1250	5000	5000
FLC-DD ^B	CA2	4	4	620	1250	2500	5000
AMB-S ^a FLC-S ^b	CA4	2	2	1250	2500	2500	2500
	CA6	2	2	1250	1250	2500	2500
	CA8	4	4	1250	2500	2500	2500
	CA9	2	2	620	1250	2500	2500
	CA10	2	2	1250	2500	2500	2500

CMI: Concentration minimal inhibitrice, CMF: Concentration minimale fongicide ;

^A AMB-R: Amphotericin B-Résistante, ^b AMB-S: Amphotericin B-Sensible;

^B FLC-DD : Fluconazole-dose dépendante, ^b FLC-S : Fluconazole-Sensible.

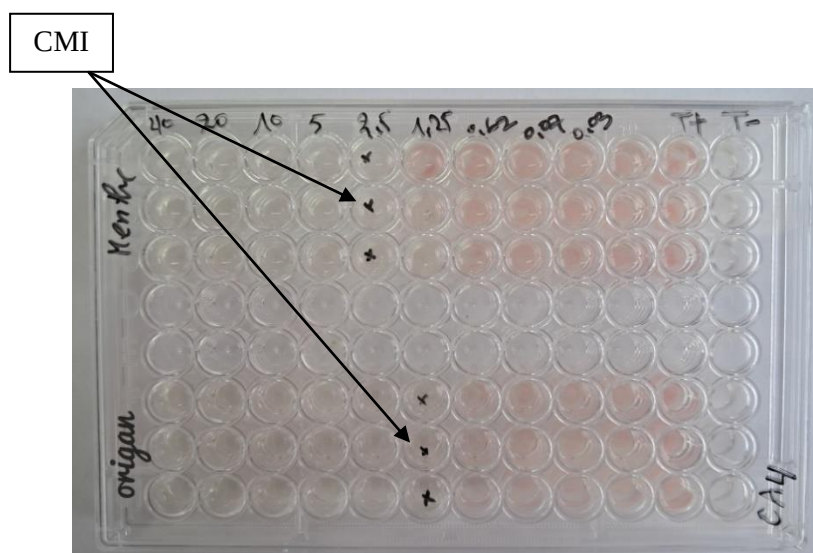


Figure 33: Détermination des CMI par la méthode de microdilution.

II.2.5 Discussion

Cette étude a évalué les propriétés antifongiques de deux huiles essentielles extraites de plantes médicinales du nord de l'Algérie, en examinant leur capacité à inhiber la croissance de *C. albicans* sous sa forme levurienne. L'activité antifongique a été testée sur 7 souches de *C. albicans*, identifiées par des méthodes phénotypiques et moléculaires. Compte tenu de l'émergence de nouvelles espèces pathogènes et des variations dans la susceptibilité aux antifongiques, une identification précise des souches de *Candida* au niveau de l'espèce est essentielle (ElFeky et al., 2016). Il convient de souligner que deux souches (CA1 et CA2) ont montré une résistance à l'amphotéricine B, tout en présentant une sensibilité dose-dépendante au fluconazole (Annexe N° 4).

L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque, une technique fréquemment utilisée pour l'évaluation rapide des composés bioactifs naturels (Devkatte et al., 2005). Les résultats expérimentaux ont montré que les deux huiles possédaient une efficacité notable contre *C. albicans*. L'huile d'*O. vulgare*, avec une zone d'inhibition de 57,3 mm, a présenté l'inhibition la plus élevée observée. Une étude similaire réalisée par Shaik & Redd (2017) et Lakhrissi et al. (2016) sur l'origan, a révélé des zones d'inhibition de 30 mm. L'huile essentielle de *M. pulegium* a également montré des zones d'inhibition significatives, variant de 24,6 à 37,3 mm dans cette étude. Abdelli et al. (2016) avaient observé une zone d'inhibition plus petite de 19 mm pour la même huile.

Après avoir confirmé l'action antifongique des huiles essentielles étudiées, les CMI et les CMF ont été déterminées par la méthode de microdilution. L'huile d'*O. vulgare* a montré des effets fongicides, avec des CMI variant de 620 à 1250 µg/ml. En comparaison, Benziane et al. (2023) ont rapporté que *O. glandulosum* du nord-ouest de l'Algérie avait des CMI allant de 250 à 500 µg/ml. Toutefois, nos résultats sont plus prometteurs que ceux de Stringaro et al. (2023) et Sartoratto et al. (2004), qui ont obtenu des CMI de 1560 µg/ml et 2 mg/ml, respectivement. D'autre part, des valeurs de CMI plus importantes ont été observées pour l'huile essentielle de *M. pulegium*, avec des valeurs allant de 2500 à 5000 µg/ml, comparées aux résultats de Zahraoui et al. (2023) et Gourich et al. (2022), qui ont rapporté des CMI de 1,419 à 2,828 mg/ml et > 5000 µg/ml, respectivement. D'autres recherches ont également confirmé l'effet fongicides de ces deux huiles (Mahboubi & Haghi, 2008 ; Brum Cleff et al., 2010 ; Delic et al., 2013 ; Baj et al., 2020).

Il est important de noter qu'une corrélation existe entre la présence de certains composés chimiques dans les huiles essentielles et leurs propriétés antifongiques. En effet, des études ont montré que les huiles essentielles contenant un pourcentage plus élevé de monoterpènes oxygénés, par rapport à celles contenant principalement des hydrocarbures monoterpéniques, présentent une action antimicrobienne plus remarquable (Abdelli et *al.*, 2016).

Dans les huiles essentielles examinées dans cette étude, les principaux composés oxygénés incluent le pulegone, le néométhol et l'isolimonène dans *M. pulegium*, ainsi que le thymol, le carvacrol et le linalol dans *O. vulgare*. D'autres recherches sur ces mêmes plantes, comme celles de Morteza-Semnani et *al.* (2011) et Hmiri et *al.* (2011), ont montré que les composants majeurs de *M. pulegium* sont le pulegone et le menthol, avec quelques variations mineures dans leurs proportions. Mahboubi & Haghi (2008) ont démontré que l'activité antimicrobienne élevée observée dans une huile essentielle de type pipéritone/pipéritenone de *M. pulegium* collectée dans le sud de l'Iran, était due à sa forte teneur en pipéritone. D'autre part, Baj et *al.* (2020) et Brum Cleff et *al.* (2010) ont identifié le carvacrol (57,3%) et le 4-terpinéol (47,95%) comme les principaux composants actifs de l'origan. Selon Benziane et *al.* (2023), les principaux constituants de l'huile essentielle d'origan sont le thymol, le γ -terpinène et le p -cymène. Ces différences peuvent être dues au lieu d'origine des plantes et aux variations physiologiques influençant la composition chimique des huiles essentielles, comme décrit par Aimad et *al.* (2021).

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée à l'aide de deux méthodes *in vitro* couramment utilisées (test du pouvoir réducteur ferrique FRAP et test de piégeage des radicaux DPPH). Les résultats montrent que l'huile essentielle d'*O. vulgare* possède un pouvoir réducteur avec une IC_{50} de 1,84 mg/ml et un EC_{50} de 1.12 mg/ml. Des résultats similaires ont été rapportés par Teixeira et *al.* (2013), avec une IC_{50} de 1509,1 μ g/ml et une EC_{50} de 38.5 μ mol Fe^{2+} /g, de même les travaux de Béjaoui et *al.* (2013) ont rapporté des valeurs d' IC_{50} et EC_{50} respectivement de 0.625 et 0.89 mg/ml. En revanche, des études réalisées par Bouhaddouda et *al.* (2016) et Hussain et *al.* (2011) ont rapporté des valeurs d' IC_{50} plus faibles, respectivement de 461,62 μ g/ml et 65,5 μ g/ml, indiquant ainsi une activité antioxydante plus élevée dans ces études. Cependant, nos résultats apparaissent plus prometteurs comparés à ceux de Sahin et *al.* (2004), qui ont rapporté une IC_{50} de 8900 μ g/ml. Les résultats pour l'huile essentielle de *M. pulegium* montrent une activité antioxydante modérée avec une IC_{50} de 9,49 mg/ml et une EC_{50} de 17,85 mg/ml. Ces valeurs sont

supérieures à celles rapportées par Ed-Dra et *al.* (2019) et Ben Haj Yahia et *al.* (2019), qui ont trouvé des IC₅₀ de 5,11 mg/ml et 3,9 mg/ml, respectivement. En comparaison, Bouyahya et *al.* (2017) ont observé une activité antioxydante beaucoup plus forte avec des IC₅₀ de 321,41 µg/ml et 58,27 µg/ml. Ces différences peuvent être dues à des variations dans la composition chimique de l'huile essentielle, influencées par des facteurs tels que l'origine géographique, la saison de récolte, et les méthodes d'extraction.

II.2.6 Conclusion

Les résultats de cette étude mettent en évidence l'impact antifongique significatif des huiles essentielles testées, en grande partie attribuable à leur teneur élevée en monoterpènes oxygénés. L'huile essentielle d'*O. vulgare* a montré une forte activité antifongique contre les souches de *C. albicans*, surpassant celle de *M. pulegium*. De plus, l'étude a mis en évidence des différences significatives dans l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium*, reflétant l'influence de leur composition chimique et des facteurs environnementaux sur leur potentiel thérapeutique. Ces observations renforcent l'intérêt pour l'utilisation des huiles essentielles en tant qu'alternatives naturelles dans la lutte contre les infections fongiques résistantes aux traitements conventionnels.

III. Partie III : Évaluation de l'activité anti-Quorum Sensing

III.1 Inhibition de la formation des tubes germinatifs

Le Tableau 16 présente l'effet des huiles essentielles et de la nystatine sur la formation des tubes germinatifs par *C. albicans*. Comparé au témoin, les traitements avec les huiles essentielles et la nystatine ont significativement réduit le nombre des tubes germinatifs. À la concentration CMI $\times \frac{1}{2}$, *O. vulgare* a montré une inhibition de 92%, avec en moyenne 20 tubes germinatifs sur 300 cellules. La nystatine à la même concentration a atteint une inhibition de 90%, réduisant le nombre de tubes germinatifs à 26,4 sur 300 cellules. À leur concentration minimale inhibitrice (CMI), *O. vulgare* et la nystatine ont respectivement atteint des inhibitions de 97% et 96%. *M. pulegium* a également montré une inhibition notable, avec 94% à la CMI et 88% à la CMI $\times \frac{1}{2}$. Toutes les inhibitions observées étaient statistiquement significatives par rapport au contrôle ($P < 0,05$).

Tableau 16: Effet des huiles essentielles et la nystatine sur la formation des tubes germinatifs.

	Contrôle	Nystatine		<i>O. vulgare</i>		<i>M. pulegium</i>	
		CMI	CMI×½	CMI	CMI×½	CMI	CMI×½
N° de TG/300cellules (Moy ± SD) (n=09)	257± 12.0	10.4± 3.9*	26.4± 9.6*	8.5± 3.2*	20± 8.4*	15.3± 5.4*	29.6± 7.4*
Taux d'inhibition %	-	96 ± 1.5*	90 ± 3.8*	97 ± 1.3*	92 ± 3.2*	94 ± 2.1*	88 ± 2.8*

TG: Tube germinatif ;

* $P < 0.05$ comparé au control (Student's t-test).

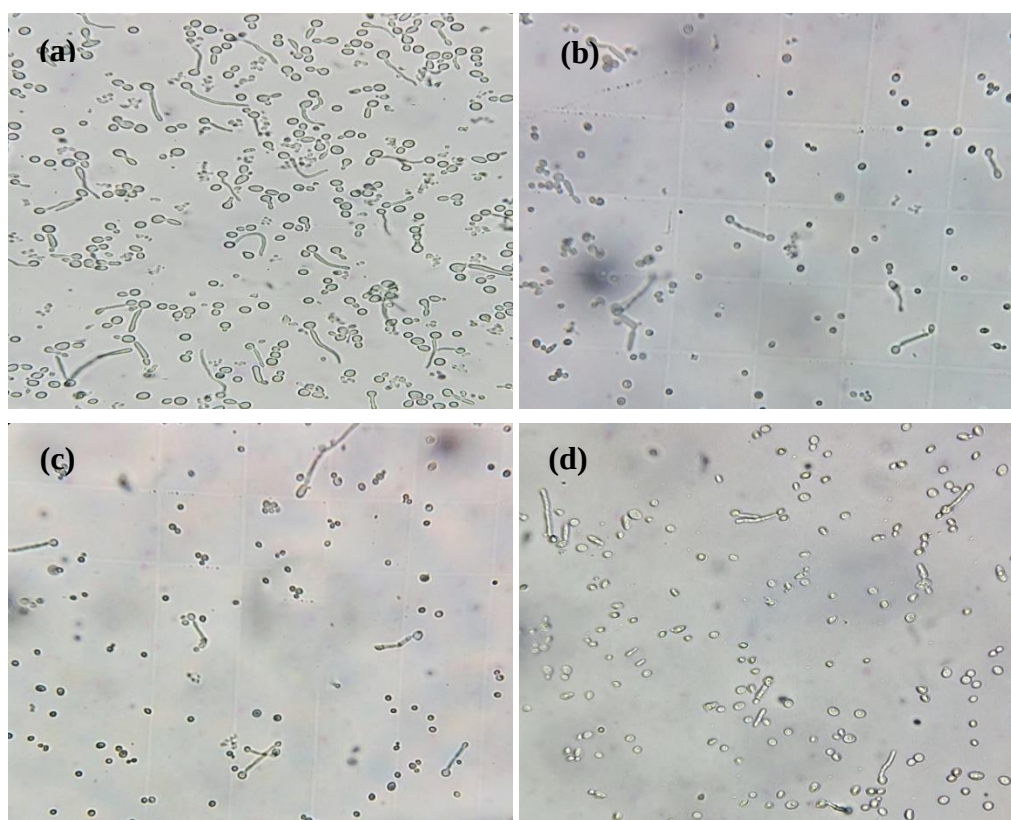


Figure 34: Formation des tubes germinatifs par *C. albicans* en présence d'huiles essentielles et de nystatine.

(a) Représente le groupe témoin, tandis que (b), (c) et (d) montrent l'inhibition de tubes germinatifs en présence de nystatine, d'huile essentielle d'*O. vulgare* et de *M. pulegium*, respectivement, à la concentration CMI.

III.2 Adhésion des cellules

L'effet des deux huiles essentielles et de la nystatine, à leur concentration minimale inhibitrice, sur la phase initiale de formation du biofilm des souches isolées et de référence de *C. albicans* est illustré dans les figures 35, 36 et 37.

Le pourcentage d'adhésion cellulaire a été déterminé en comparaison avec le témoin. Les résultats ont révélé une réduction significative de l'adhésion initiale par les huiles essentielles pour la majorité des souches testées ($P < 0,05$). La souche CA1 a présenté une adhésion à seulement 58% en présence de l'huile d'*O. vulgare* et à 55% avec la nystatine. À l'opposé, la souche CA2 a démontré une forte résistance aux agents testés, avec des pourcentages d'adhésion de 95%, 95% et 96% respectivement pour *O. vulgare*, *M. pulegium*, et la nystatine. Les souches d'origine buccale se sont révélées globalement plus résistantes que celles d'origine vaginale.

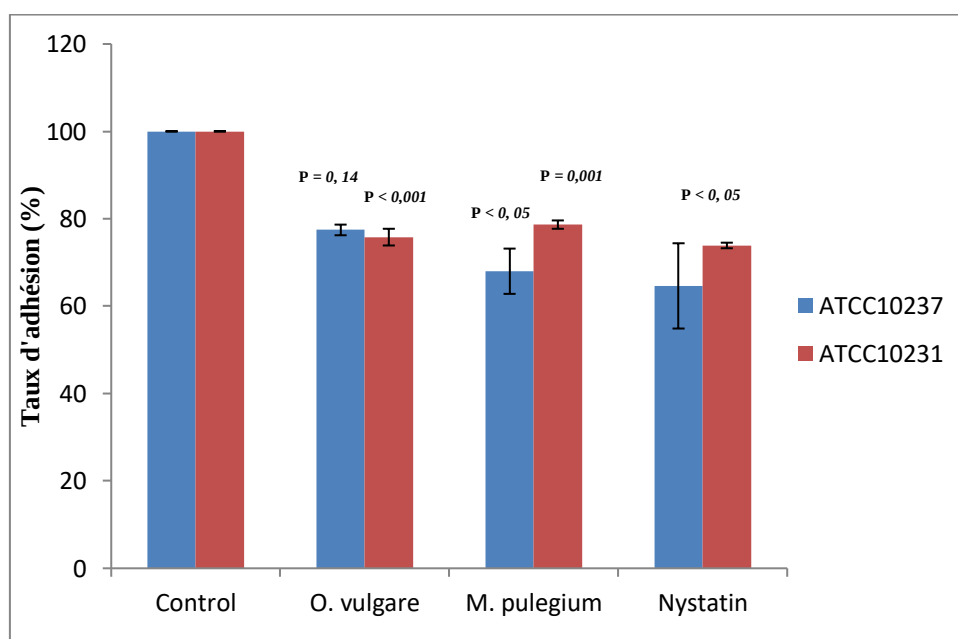


Figure 35: Inhibition de l'adhésion des souches de référence de *C. albicans* par les huiles essentielles et la nystatine.

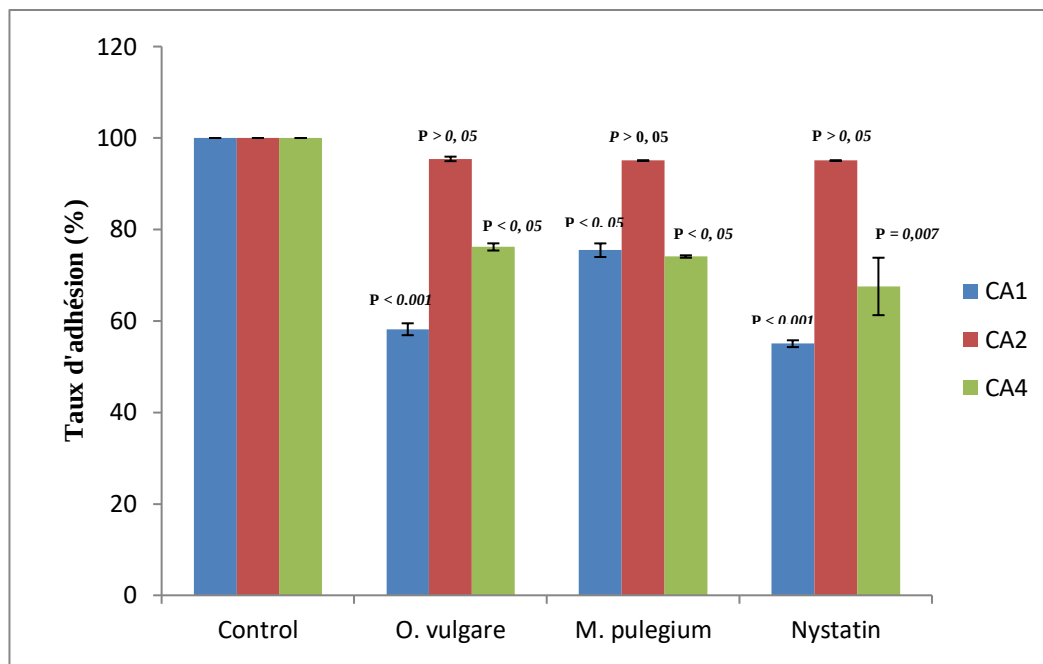


Figure 36: Inhibition de l'adhésion des souches d'origine vaginale de *C. albicans* par les huiles essentielles et la nystatine.

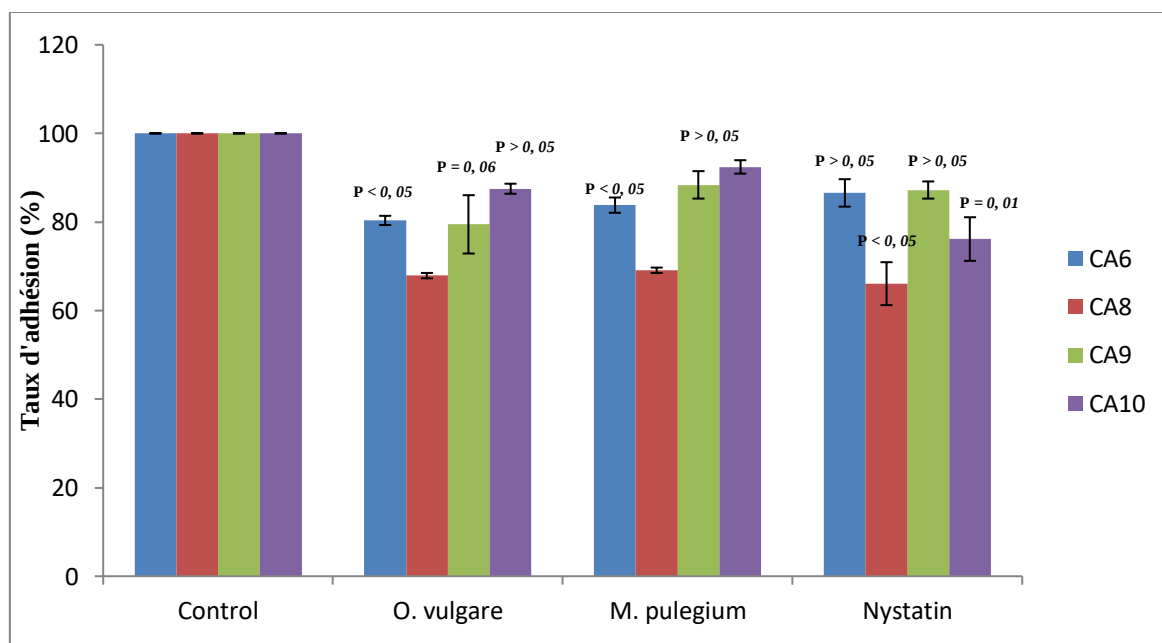


Figure 37: Inhibition de l'adhésion des souches d'origine buccale de *C. albicans* par les huiles essentielles et la nystatine.

III.3 Effet inhibiteur des biofilms

Le Tableau 17 présente les résultats des concentrations minimales inhibitrices des biofilms (MBIC_{80%}) pour la nystatine et les huiles essentielles, évalués sur des souches de référence et des souches isolées à l'aide du test TTC. Les huiles essentielles ont montré des MBIC_{80%} significativement différentes ($P < 0,05$), avec des valeurs comprises entre 1250 et 2500 µg/ml pour *O. vulgare*, et entre 5000 et 20000 µg/ml pour *M. pulegium*. En comparaison, la nystatine s'est révélée beaucoup plus efficace pour l'ensemble des souches, avec des MBIC_{80%} allant de 2 à 8 µg/ml. Il est à noter que les valeurs de MBIC_{80%} pour les biofilms étaient nettement plus élevées que les CMI observées pour les cellules planctoniques.

III.4 Effet éradicateur des biofilms

Le Tableau 17 illustre l'effet des huiles essentielles sur l'éradication des biofilms préformés, évalué par la méthode TTC. *O. vulgare* a montré une MBEC_{80%} variant entre 2500 et 10000 µg/ml, tandis que *M. pulegium* a présenté des valeurs comprises entre 20000 et 40000 µg/ml. Les valeurs de MBEC_{80%} pour *M. pulegium* étaient supérieures à celles des MBIC_{80%}. En revanche, les MBIC_{80%} et les MBEC_{80%} pour *O. vulgare* étaient généralement similaires, à l'exception des souches CA1, CA2 et CA6. De plus, la nystatine a présenté des valeurs de MBEC_{80%} allant de 4 à 8 µg/ml, confirmant son efficacité supérieure contre les biofilms préformés.

Tableau 17: Effet antibiofilm des huiles essentielles contre *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	Catégorie de biofilm	Nystatine (µg/ml)		<i>O. vulgare</i> (µg/ml)		<i>M. pulegium</i> (µg/ml)	
		MBIC _{80%}	MBEC _{80%}	MBIC _{80%}	MBEC _{80%}	MBIC _{80%}	MBEC _{80%}
ATCC10237	Modérée	4	8	2500	2500	20000	40000
ATCC10231	Modérée	4	4	2500	2500	20000	20000
CA 1	Intense	4	8	2500	5000	10000	20000
CA 2	Intense	8	8	2500	10000	5000	40000
CA 4	Modérée	4	4	2500	2500	10000	40000
CA 6	Modérée	4	4	1250	2500	10000	20000
CA 8	Modérée	4	4	2500	2500	10000	20000
CA 9	Faible	4	4	2500	2500	5000	20000
CA 10	Modérée	2	4	2500	2500	5000	20000

MBIC: Concentration minimale inhibitrice de biofilm ;

MBEC: Concentration minimale éradicatrice de biofilm.

III.5 Effet synergique entre les huiles et la nystatine contre les formes planctoniques et sessiles de *C. albicans*

Le Tableau 18 présente les effets combinés de la nystatine et des huiles essentielles contre *C. albicans* (souche CA1). Les indices de fractionnement inhibiteur combiné (FICI) ont révélé que l'association de *O. vulgare* et de la nystatine a exercé un effet synergique à la fois sur les formes planctoniques (FICI = 0,50) et les formes sessiles (FICI = 0,38). En revanche, l'association de *M. pulegium* et de la nystatine a montré un effet synergique uniquement sur les cellules planctoniques (FICI = 0,38), tandis qu'un effet additif a été observé sur les biofilms (FICI = 0,63).

Tableau 18: Effet de l'interaction entre les huiles essentielles et la nystatin.

Huiles essentielles		Forme planctonique	Forme sessile
<i>O. vulgare</i>	FIC d' <i>O. vulgare</i>	0.25	0.25
	FIC de la nystatine	0.25	0.125
	FICI	0.50	0.38
	Interprétation	Synergique	Synergique
<i>M. pulegium</i>	FIC de <i>M. pulegium</i>	0.125	0.125
	FIC de la nystatine	0.25	0.5
	FICI	0.38	0.63
	Interprétation	Synergique	Addition

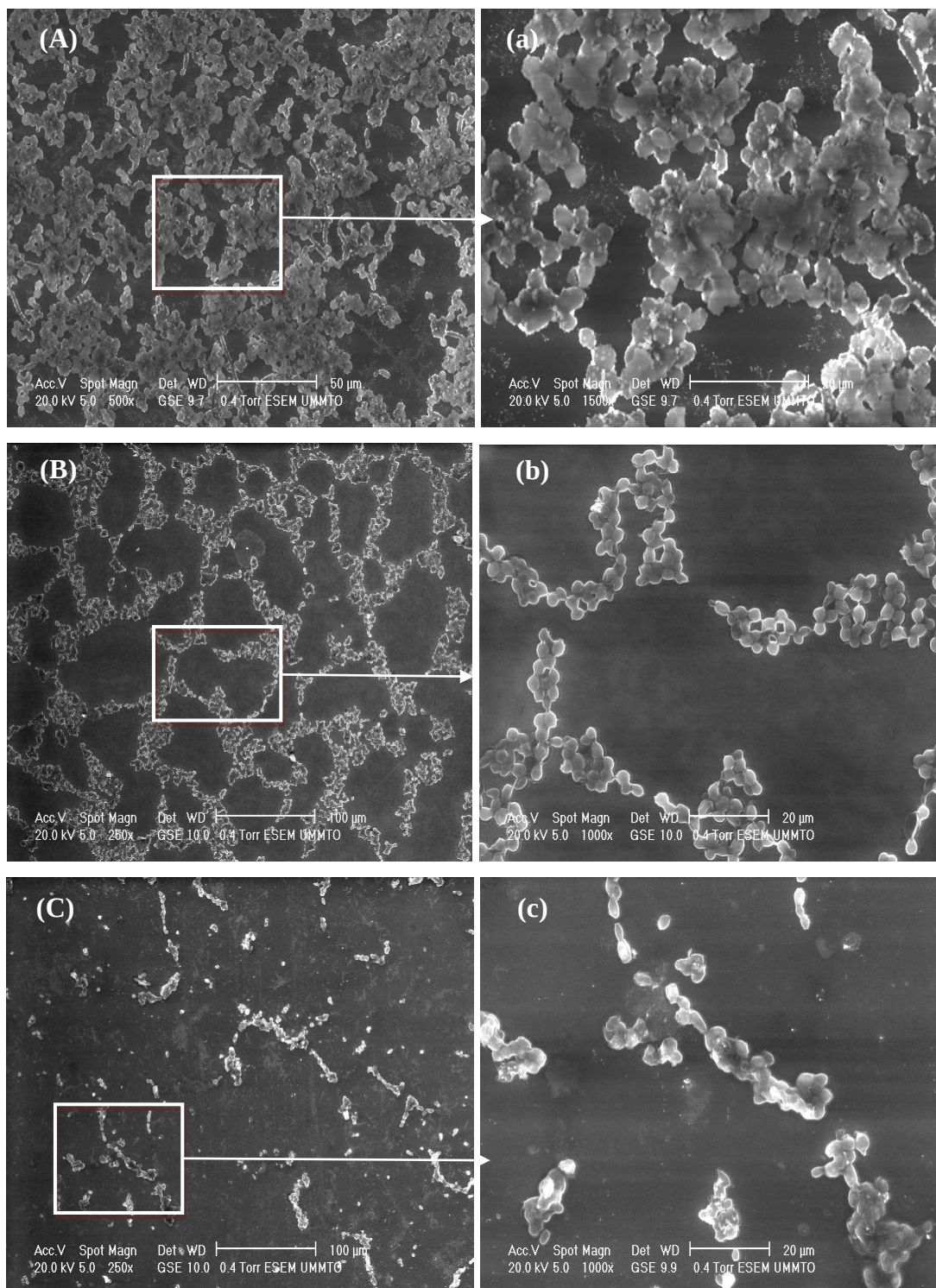
FIC: Indice de concentration inhibitrice ;

FICI: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire.

III.6 Observation des biofilms au microscope électronique à balayage

La Figure 38 illustre les images obtenues par MEB des biofilms traités ou non avec l'huile essentielle d'*O. vulgare* à des concentrations correspondant à la CMI $\times$ 2, CMI $\times$ 4 et CMI $\times$ 8.

Dans le biofilm de *C. albicans* non traité (CA1), une structure multicouche était observée, composée de cellules levuriennes et d'hyphes intégrés dans une matrice dense. En revanche, après traitement avec l'huile essentielle, une transformation significative de la structure du biofilm a été observée : on notait une diminution marquée de la densité cellulaire et une élimination substantielle de la matrice extracellulaire. De plus, le nombre de cellules du biofilm diminuait proportionnellement à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle.



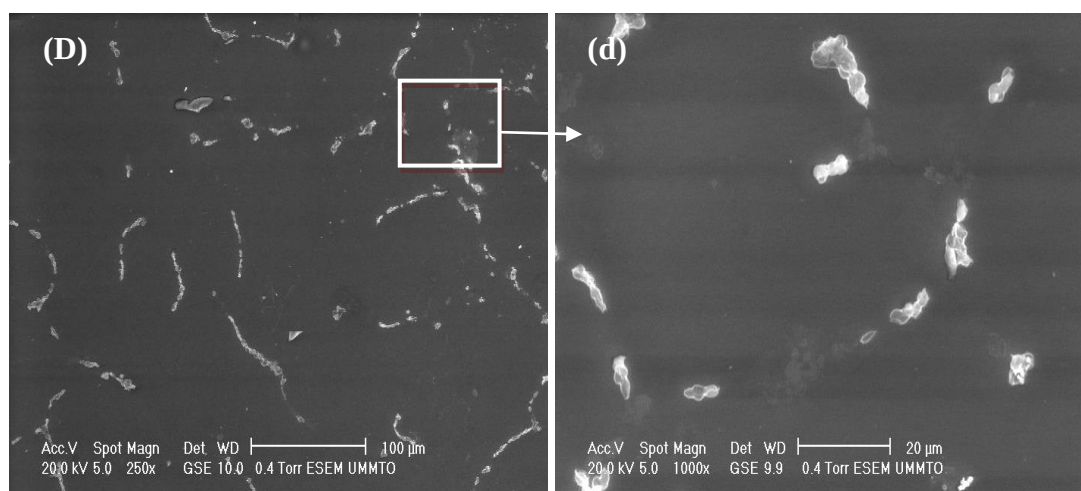


Figure 38: Images au microscope électronique à balayage d'un biofilm formé par *C. albicans*.

- (A), (a) : Contrôle montrant une structure multicouche de cellules et d'hyphes ;
- (B), (b) : Huile d'*O. vulgare* à CMI×2 réduisant la filiation et le nombre de cellules ;
- (C), (c) : CMI×4 éliminant la matrice et réduisant davantage le nombre de cellules ;
- (D), (d) : CMI×8 provoquant l'éclatement des cellules et l'élimination des agrégats.

III.7 Discussion

L'objectif principal de cette recherche était d'étudier l'effet inhibiteur et éradicateur des huiles essentielles sur les biofilms de *C. albicans*. Pour cette étude, sept souches identifiées de *C. albicans* ont été sélectionnées. L'évaluation de leur capacité à former des biofilms a révélé que la majorité des souches présentaient une formation modérée, tandis que deux d'entre elles ont montré une formation de biofilm intense (Annexe N° 5).

La capacité de *C. albicans* à adhérer aux surfaces biotiques et abiotiques contribue à sa virulence en favorisant la formation d'un biofilm, qui constitue une étape initiale cruciale dans le développement de l'infection. Dans le cadre de cette étude, nous avons examiné l'effet des deux huiles essentielles sur la capacité d'adhésion et observé des résultats significatifs pour la majorité des souches. Des résultats similaires pour l'huile d'*O. vulgare* ont été rapportés par Cid-Chevecich et al. (2022), qui ont noté un pourcentage d'adhésion de 60% à une concentration de CMI.

Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*O. vulgare* possède une activité inhibitrice et éradicatrice sur les biofilms de *C. albicans*, avec des valeurs de MBIC_{80%} comprises entre 1250 et 2500 µg/ml, et de MBEC_{80%} allant de 2500 à 10000 µg/ml, selon le test de réduction du TTC. Dans une étude similaire, Benziane et al. (2023) ont trouvé que l'huile essentielle d'*O. glandulosum* avait un impact sur *C. albicans* avec des valeurs de MBIC

et MBEC de 500 et 1000 µg/ml, respectivement. En revanche, l'activité antibiofilm de l'huile essentielle de *M. pulegium* s'est révélée moins efficace, avec des valeurs de MBIC_{80%} et MBEC_{80%} comprises entre 5000 et 20000 µg/ml et entre 20000 et 40000 µg/ml, respectivement, ce qui est significativement plus élevé que les valeurs observées à l'état de blastospore. Peu de travaux ont exploré l'activité antibiofilm de l'huile essentielle de *M. pulegium*, bien que plusieurs terpènes aient été étudiés. Giovana et *al.* (2016) ont rapporté que la menthone et le pulégone inhibaient les biofilms à des concentrations de 0,25 mg/ml et 1 mg/ml, respectivement. Par ailleurs, Loaiza Oliva et *al.* (2023) ont montré que le thymol pouvait éradiquer 38,88% des biofilms de *C. albicans* à une concentration de 2048 µg/ml, tandis que Sharifzadeh et *al.* (2021) ont démontré une inhibition de 72% des biofilms par le thymol à 24,5 µg/ml.

Les valeurs de MBIC_{80%} et MBEC_{80%} des deux huiles essentielles ont également été comparées à celles de la nystatine, qui étaient largement supérieures dans cette étude. La nystatine, un antifongique polyénique couramment utilisé, agit en se liant à l'ergostérol de la membrane cellulaire des champignons, entraînant une perméabilité et une lyse cellulaire. En revanche, les huiles essentielles perturbent principalement l'intégrité de la paroi cellulaire fongique et inhibent la synthèse de l'ergostérol, leur efficacité antifongique variant en fonction de leur composition. Il est aussi important de noter que les différents composants peuvent avoir des effets synergiques et antagonistes, ce qui pourrait modifier l'activité des huiles essentielles (Baj et *al.*, 2020).

Cette étude a révélé que les souches CA1 et CA2 présentaient une éradication réduite des biofilms par tous les agents antimicrobiens testés, probablement en raison de la forte biomasse des biofilms produites par ces souches. En effet, la matrice extracellulaire protectrice et la structure tridimensionnelle complexe des biofilms limitent la diffusion des agents antifongiques, réduisant ainsi leur efficacité (Benziane et *al.*, 2023; Sardi et *al.*, 2013).

De plus, l'une des propriétés pathogènes majeures de *C. albicans* est sa capacité à former des tubes germinatifs, une étape transitoire entre les cellules bourgeonnantes et les cellules hyphales, ce qui facilite l'adhésion aux cellules hôtes (Bernardes et *al.*, 2012). Nos résultats ont mis en évidence le potentiel des huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium* à inhiber la formation des tubes germinatifs. Selon Vale-Silva et *al.* (2012), l'huile essentielle d'*O. vulgare* a montré une inhibition complète de la croissance des tubes germinatifs à des concentrations sous-inhibitrices. En revanche, l'étude de Cid-Chevecich et

al. (2022) ont observé une réduction moins significative de la formation des tubes germinatifs, allant de 35 à 41%. Les résultats de Piras et *al.* (2021) sur l'huile de *M. pulegium* ont révélé une inhibition de 42,3% à une concentration de $\frac{1}{8} \times \text{CMI}$. Cette inhibition par les huiles est essentielle, car elle diminue à la fois la virulence associée à la candidose et la formation de biofilms.

Dans notre étude, nous avons observé des interactions synergétiques entre la nystatine et l'huile essentielle d'*O. vulgare* contre les formes planctoniques et sessiles de *C. albicans*, sans aucune combinaison antagoniste. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Benziane et *al.* (2023). Par ailleurs, Ermenlieva et *al.* (2022) ont également mis en évidence une synergie entre la nystatine et l'huile essentielle d'origan à des concentrations de 2 µg/ml, avec des valeurs de l'indice de concentration fractionnée (FIC) de 0,29. La combinaison de l'huile essentielle de *M. pulegium* avec la nystatine a démontré une activité synergétique en conditions planctoniques et des effets additifs dans les formes biofilms. Les propriétés hydrophobes des huiles essentielles semblent jouer un rôle clé en augmentant la perméabilité des membranes cellulaires et en facilitant la pénétration des agents antifongiques, améliorant ainsi leur efficacité (Benziane et *al.*, 2023). Cette synergie peut offrir des avantages dans le traitement des infections fongiques en réduisant la résistance aux antifongiques et la toxicité des médicaments (Norouzi et *al.*, 2021).

L'observation au microscope électronique à balayage a corroboré le potentiel de l'huile essentielle d'*O. vulgare* sur les biofilms préformés. La Figure 38 révèle que le biofilm de contrôle présente un mélange composé de cellules de levure, de pseudohyphes et d'hyphes. Cependant, le traitement des biofilms avec $2 \times \text{CMI}$ de l'huile essentielle a entraîné une réduction significative de la matrice extracellulaire et une lyse des cellules sessiles. Ces observations confirment que les huiles essentielles peuvent influencer la structure des biofilms. D'autres études ont également démontré que les huiles essentielles exercent un effet antibiofilm contre *C. albicans* et influencent les membranes cellulaires des cellules du biofilm tout en modifiant leur morphologie (Benziane et *al.*, 2023; M. S. A. Khan & Ahmad, 2012; Tyagi & Malik, 2010).

III.8 Conclusion

Cette étude a mis en évidence l'efficacité des huiles essentielles d'*O. vulgare* et de *M. pulegium* contre les biofilms de *C. albicans*. Les résultats montrent que l'huile d'*O. vulgare* possède une activité antibiofilm significative, réduisant la biomasse des biofilms et inhibant la

formation des tubes germinatifs. En comparaison, *M. pulegium* a montré une activité moins prononcée. L'analyse par microscopie électronique à balayage a confirmé que l'huile d'*O. vulgare* est capable de réduire la matrice extracellulaire des biofilms et de provoquer la lyse des cellules. De plus, l'huile d'*O. vulgare* a montré une interaction synergique avec la nystatine, affectant à la fois la forme planctonique et sessile de *C. albicans*. Ces résultats soulignent la nécessité de mener des recherches approfondies sur chaque composant des huiles essentielles, ainsi que sur leur efficacité individuelle et en combinaison avec des agents antifongiques contre les biofilms fongiques. Il est également crucial de valider ces résultats par des études in vivo futures.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

Les infections fongiques causées par des espèces du genre *Candida*, telles que *C. albicans*, représentent un problème de santé important en raison de leur pathogénicité et de leur capacité à résister aux traitements conventionnels. Ces infections peuvent être de nature superficielle, telles que les infections vaginales, mais aussi évoluer vers des formes systémiques potentiellement graves, telles que les candidoses rénales, cérébrales ou hépatiques.

La pathogénicité de *Candida* est favorisée par divers facteurs, tels que le déséquilibre du Ph et de la trophicité, ainsi que la formation de biofilms. Ces biofilms, en particulier, compliquent le traitement en augmentant la résistance des cellules fongiques aux agents antifongiques. La recherche de nouvelles alternatives naturelles pour le traitement des infections fongiques est devenue cruciale en raison de la montée croissante de la résistance aux antifongiques conventionnels et des effets secondaires associés à ces traitements. Les huiles essentielles, en raison de leurs propriétés antifongiques et de leur origine naturelle, offrent une alternative prometteuse et potentiellement moins toxique aux médicaments traditionnels.

Le présent travail a permis d'isoler diverses espèces de *Candida* à partir de patients atteints de candidoses. L'analyse morphologique et pathologique a conduit à l'identification de quatre espèces du genre *Candida* : *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* et *C. albicans*, révélant que cette dernière était l'espèce prédominante. Les résultats ont montré que les souches présentant une formation intense de biofilms ont présentés une forte résistance aux antifongiques, rendant le traitement des infections fongiques plus complexe. Cette observation souligne la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour surmonter ces défis.

Dans le cadre de la recherche d'alternatives naturelles, sept souches de *C. albicans* isolées ont été sélectionnées pour évaluer l'efficacité des huiles essentielles extraites de deux plantes médicinales de la région de Kabylie (*Origanum vulgare* L. et *Mentha pulegium* L.).

L'analyse de la composition des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a mis en évidence que le thymol et le pulegone sont les constituants majeurs de l'huile essentielle d'*O. vulgare* et de *M. pulegium*,

respectivement. Les monoterpènes oxygénés présents jouent un rôle clé dans l'activité antifongique.

En parallèle, l'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée à l'aide des tests du pouvoir réducteur ferrique (FRAP) et du piégeage des radicaux DPPH. Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*O. vulgare* possède un pouvoir réducteur le plus important avec une IC₅₀ de 1,84 mg/ml et une EC₅₀ de 1,12 mg/ml.

L'évaluation de l'activité antifongique a été réalisée par les méthodes de diffusion sur disque et de microdilution. L'huile essentielle d'*O. vulgare* a montré un effet significatif contre les souches de *C. albicans*, à l'état planctonique. Une activité inhibitrice et éradicatrice notable contre les biofilms a été également enregistrée par cette huile. Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont confirmé ces résultats.

De plus, l'évaluation de l'effet synergique entre les huiles essentielles et la nystatine a révélé des résultats prometteurs, suggérant une potentialité pour une utilisation combinée dans le traitement des infections fongiques résistantes.

Les résultats obtenus ouvrent la voie à plusieurs perspectives intéressantes pour de futures recherches :

- Réaliser des études *in vivo* pour confirmer l'efficacité et la sécurité des huiles essentielles contre les infections fongiques.
- Explorer des formulations qui combinent les huiles essentielles avec des antifongiques conventionnels pour créer des traitements plus efficaces contre *Candida*.
- Investiguer comment les huiles essentielles agissent sur les biofilms de *Candida* pour mieux comprendre leur mode d'action.

Ces recherches pourraient améliorer les traitements antifongiques en utilisant des alternatives naturelles comme les huiles essentielles, surtout face à la résistance croissante aux médicaments traditionnels.

References

Reference

- Abdel-Rhman, S. H., El-Mahdy, A. M., & El-Mowafy, M. (2015). Effect of Tyrosol and Farnesol on Virulence and Antibiotic Resistance of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMed Research International*, 2015, 456463. <https://doi.org/10.1155/2015/456463>
- Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., & Maachi, R. (2016). Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 94, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.042>
- Abu-Elteen, K. H., Hamad, M. A., & Salah, S. A. (2006). Prevalence of oral *Candida* infections in diabetic patients. *Bahrain Medical Bulletin*, 28(1), 12–17.
- AFNOR. (2000). Huiles Essentielles. Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles. Tome 2 (AFNOR (ed.); 6th ed.).
- Aimad, A., Sanae, R., Anas, F., Abdelfattah, E. M., Bourhia, M., Mohammad Salamatullah, A., Alzahrani, A., Alyahya, H. K., Albadr, N. A., Abdelkrim, A., El Barnossi, A., & Noureddine, E. (2021). Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Insecticidal Properties of Essential Oil from *Mentha pulegium* L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1108133>
- Aissat, F. Z., & Denning, D. W. (2023). Fungal infections in Algeria. *Mycoses*, 66(7), 594–603. <https://doi.org/10.1111/myc.13585>
- Alekseeva, M., Zagorcheva, T., Atanassov, I., & Rusanov, K. (2020). *Origanum vulgare* L. – A review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(6), 1183–1197.
- Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., & Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1770–1779. <https://doi.org/10.1128/EC.00219-06>
- Alhussaini, M. S. (2013). Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida* Species in Urine Samples from Renal Failure Patients. *Science Journal of Clinical Medicine*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.11648/j.sjcm.20130201.13>
- Alo, M. N., Anyim, C., Onyebuchi, a K., & Centre, F. M. (2012). Prevalence of asymptomatic Co-Infection of Candidiasis and Vaginal Trichomoniasis among Pregnant Women in Abakaliki ., 2(7), 87–92.
- Aniszewski, T. (2007). Alkaloids - secrets of life: Aklaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. In *Alkaloids - Secrets of Life: Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52736-3.X5000-4>
- Ann Chai, L. Y., Denning, D. W., & Warn, P. (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(4), 282–298. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.489506>
- Atiencia-Carrera, M. B., Cabezas-Mera, F. S., Tejera, E., & Machado, A. (2022). Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 17(2 February), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263522>
- Badia, V., de Oliveira, M. S. R., Polmann, G., Milkiewicz, T., Galvão, A. C., & da Silva Robazza, W.

- (2020). Effect of the addition of antimicrobial oregano (*Origanum vulgare*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on lactic acid bacteria growth in refrigerated vacuum-packed Tuscan sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 289–301. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00146-7>
- Baj, T., Biernasiuk, A., Wróbel, R., & Malm, A. (2020). Chemical composition and in vitro activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. And *Thymus vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Open Chemistry*, 18(1), 108–118. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0011>
- Baktir, A., Suwito, H., Safinah, M., & Kunsah, B. (2012). Novel Materials for Eradication of Biofilm Extracell Matrix of Pathogenic *Candida*. *Journal of Materials Science and Engineering B*, 2(12), 650–658.
- Bariz, K., Trabelsi, L., Lahcene, S., M. Salem-Bekhit, M., Elossaily, G. M., Alzahrani, H. A., Alharbi, O. O., Abbaci, M., Abbaci, H., Benguerba, Y., & Houali, K. (2023). Evaluating the Synergistic Potency of Essential Oils and Antibiotics Against *Klebsiella pneumoniae* BLSE Strains. *Cellular and Molecular Biology*, 69(3), 198–206. <https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.3.29>
- Bassetti, M., Righi, E., Montravers, P., & Cornely, O. A. (2018). What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, i14–i25. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx445>
- Bates, S. (2018). *Candida albicans* Cdc15 is essential for mitotic exit and cytokinesis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27157-y>
- Béjaoui, A., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(32), 2429–2435. <https://doi.org/DOI:10.5897/JMPR11.902>
- Bekhechi Chahrazed. (2009). Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-MS et RMN et étude de leur pouvoir antibactérien. 2 p.
- Ben-Ami, R. (2018). Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. *Journal of Fungi*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/jof4030097>
- Ben Haj Yahia, I., Bouslimi, W., Messaoud, C., Jaouadi, R., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2019). Comparative evaluation of Tunisian *Mentha* L. species essential oils: selection of potential antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Essential Oil Research*, 31(3), 184–195. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1550021>
- Benarba, B. (2016). Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(4), 320–330. <https://doi.org/10.5455/jice.20160814115725>
- Benitez, L. L., & Carver, P. L. (2019). Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. *Drugs*, 79(8), 833–853. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01127-8>
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(2), 184–196. <https://doi.org/10.1177/154411130201300208>
- Benziane, M. Y., Bendahou, M., Benbelaïd, F., Khadir, A., Belhadef, H., Benaissa, A., Ouslimani, S., Mahdi, F., & Muselli, A. (2023). Efficacy of endemic Algerian essential oils against single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Archives of Oral Biology*, 145(November 2022), 105584. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105584>

- Bernardes, I., Felipe Rodrigues, M. P., Bacelli, G. K., Munin, E., Alves, L. P., & Costa, M. S. (2012). Aloe vera extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*. *Mycoses*, 55(3), 257–261. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02079.x>
- Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
- Bhavan, P. S., Rajkumar, R., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., & Kannan, S. (2010). Culture and Identification of *Candida albicans* from Vaginal Ulcer and Separation of Enolase on SDS-PAGE. *International Journal of Biology*, 2(1), 84–93. <https://doi.org/10.5539/ijb.v2n1p84>
- Biernasiuk, A., Baj, T., & Malm, A. (2023). Clove Essential Oil and Its Main Constituent, Eugenol, as Potential Natural Antifungals against *Candida* spp. Alone or in Combination with Other Antimycotics Due to Synergistic Interactions. *Molecules*, 28(1). <https://doi.org/10.3390/molecules28010215>
- Bona, E., Cantamessa, S., Pavan, M., Novello, G., Massa, N., Rocchetti, A., Berta, G., & Gamalero, E. (2016). Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1530–1545. <https://doi.org/10.1111/jam.13282>
- Borman, A. M., Muller, J., Walsh-Quantick, J., Szekely, A., Patterson, Z., Palmer, M. D., Fraser, M., & Johnson, E. M. (2020). MIC distributions for amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, flucytosine and anidulafungin and 35 uncommon pathogenic yeast species from the UK determined using the CLSI broth microdilution method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(5), 1194–1205. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz568>
- Böttcher, B., Pöllath, C., Staib, P., Hube, B., & Brunke, S. (2016). *Candida* species rewired hyphae developmental programs for chlamydospore formation. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01697>
- Bouhaddouda, N., Aouadi, S., & Labiod, R. (2016). Evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (DESF.) Ietswaart from Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(1), 104–112.
- Boukhebt, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4), 267–275. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:99398547>
- Boutabia, L., Telailia, S., Guenadil, F., & Chefrou, A. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. growing in North-East of Algeria. *Analele Universitatii Din Oradea, Fascicula Biologie*, 27(2), 143–148.
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbaui, A., Fellah, H., Abrini, J., & Dakka, N. (2017). Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis*, 111, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.015>
- Brum Cleff, M., Raquel Meinerz, A., Xavier, M., Filipe Schuch, L., Carlos Araújo Meireles, M., Regina Alves Rodrigues, M., & Roberto Braga de Mello, J. (2010). In Vitro Activity of *Origanum Vulgare* Essential Oil Against *Candida* Species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 116–123.

- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants (Tec et Doc (ed.); 2nd ed.).
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cardinale, V. (2018). Les candidoses vaginales récidivantes à *Candida albicans* To cite this version : HAL Id : hal-01732305 soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr.
- Carolus, H., Pierson, S., Lagrou, K., & Van Dijck, P. (2020). Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof6040321>
- Ceylan, O., Sarac, N., Ugur, A., & Sahin, M. D. (2014). The antimicrobial and antibiofilm activities of *Origanum vulgare* ssp. viride essential oils, endemic in Turkey. *Journal of Selcuk University Natural and Applied Science*, 3(2), 28–34.
- Chang, H. C., Huang, G. J., Agrawal, D. C., Kuo, C. L., Wu, C. R., & Tsay, H. S. (2007). Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as “Gusuibu.” *Botanical Studies*, 48(4), 397–406.
- Chekiri-Talbi, M., & Denning, D. W. (2017). Burden of fungal infections in Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(6), 999–1004. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2917-8>
- Cho, K. S., Lim, Y. R., Lee, K., Lee, J., Lee, J. H., & Lee, I. S. (2017). Terpenes from forests and human health. *Toxicological Research*, 33(2), 97–106. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.2.097>
- Christianson, D. W. (2008). Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.12.008>
- Cid-Chevecich, C., Müller-Sepúlveda, A., Jara, J. A., López-Muñoz, R., Santander, R., Budini, M., Escobar, A., Quijada, R., Criollo, A., Díaz-Dosque, M., & Molina-Berríos, A. (2022). *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* spp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin in vitro. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03518-z>
- Cordeiro, R. de A., Teixeira, C. E. C., Brilhante, R. S. N., Castelo-Branco, D. S. C. M., Alencar, L. P., de Oliveira, J. S., Monteiro, A. J., Bandeira, T. J. P. G., Sidrim, J. J. C., Moreira, J. L. B., & Rocha, M. F. G. (2015). Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Research*, 15(4), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov012>
- Coronado-Castellote, L., & Jiménez-Soriano, Y. (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(5), 279–286. <https://doi.org/10.4317/jced.51242>
- Cremer, J., Vatou, V., & Braveny, I. (1999). *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 170, 170, 319–325.
- Cugini, C., Calfee, M. W., Farrow, J. M., Morales, D. K., Pesci, E. C., & Hogan, D. A. (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 65(4), 896–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05840.x>
- Czechowicz, P., Nowicka, J., & Gościński, G. (2022). Virulence Factors of *Candida* spp. and Host

- Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 1/21. <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>
- de Sousa, L. L., de Andrade, S. C. A., Athayde, A. J. A. A., de Oliveira, C. E. V., de Sales, C. V., Madruga, M. S., & de Souza, E. L. (2013). Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.001>
- De Toledo, L. G., Dos Santos Ramos, M. A., Spósito, L., Castilho, E. M., Pavan, F. R., De Oliveira Lopes, É., Zocolo, G. J., Silva, F. A. N., Soares, T. H., dos Santos, A. G., Bauab, T. M., & De Almeida, M. T. G. (2016). Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081252>
- Delic, D., Skrobonja, J., Karaman, M., Matavulj, M., & Bogavac, M. (2013). Antifungal activity of essential oils of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against three *Candida albicans* strains. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 124, 203–211. <https://doi.org/10.2298/zmspn1324203d>
- Delma, F. Z., Al-Hatmi, A. M. S., Brüggemann, R. J. M., Melchers, W. J. G., de Hoog, S., Verweij, P. E., & Buil, J. B. (2021). Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. *Journal of Fungi*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/jof7110909>
- Derengowski, L. S., De-Souza-Silva, C., Braz, S. V., Mello-De-Sousa, T. M., Báó, S. N., Kyaw, C. M., & Silva-Pereira, I. (2009). Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-13>
- Deveau, A., Piispanen, A. E., Jackson, A. A., & Hogan, D. A. (2010). Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell*, 9(4), 569–577. <https://doi.org/10.1128/EC.00321-09>
- Devkotte, A. N., Zore, G. B., & Karuppayil, S. M. (2005). Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.02.003>
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>
- Ed-Dra, A., Rhazi Filali, F., Lo Presti, V., Zekkor, B., Nalbone, L., Bentayeb, A., Giuffrida, A., & Giarratana, F. (2019). Evaluation of Chemical Composition, Antioxidant and Anti *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Activity of the Essential Oil of *Mentha pulegium* and *Mentha suaveolens* Collected in Morocco. Preprints, May, 1–15. www.preprints.org
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308–323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
- El-Baz, A. M., Mosbah, R. A., Goda, R. M., Mansour, B., Sultana, T., Dahms, T. E. S., & El-Ganiny,

- A. M. (2021). Back to Nature: Combating *Candida albicans* Biofilm, Phospholipase and Hemolysin Using Plant Essential Oils. *Antibiotics*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010081>
- ElFeky, D. S., Gohar, N. M., El-Seidi, E. A., Ezzat, M. M., & AboElew, S. H. (2016). Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis . *Alexandria Journal of Medicine*, 52(3), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2015.10.001>
- Ermenlieva, N., Georgieva, E., Mihaylova, S., Stamova, S., Laleva, K., Tsankova, G., & Tsvetkova, A. (2022). Synergistic Interaction Between *Lamiaceae* Essential Oils and Antifungal Drugs Against *Candida albicans* Atcc 10231. *Farmacia*, 70(4), 720–725. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.4.18>
- Fang, J., Huang, B., & Ding, Z. (2021). Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 125(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.12.025>
- Fanou, B. A., Natitingou, D., & Nationale, U. (2022). Prévalence et facteurs associés aux candidoses vulvovaginales chez les femmes admises en consultation à l'Hôpital de Zone de Mènonin (Bénin). *Pan African Medical Journal*, 42(215).
- Fardin Ali Malayeri, Ali Akbar Rezaei, O. R. (2018). Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *Journal of Basic Research in Medical Science*, 5(2), 48–55.
- Ferreira, A. V., Prado, C. G., Carvalho, R. R., Dias, K. S. T., & Dias, A. L. T. (2013). *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*, 175(3–4), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9638-z>
- Freires, I. D. A., Murata, R. M., Furletti, V. F., Sartoratto, A., De Alencar, S. M., Figueira, G. M., Rodrigues, J. A. D. O., Duarte, M. C. T., & Rosalen, P. L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086>
- Gabrielli, E., Sabbatini, S., Roselletti, E., Kasper, L., Perito, S., Hube, B., Cassone, A., Vecchiarelli, A., & Pericolini, E. (2016). In vivo induction of neutrophil chemotaxis by secretory aspartyl proteinases of *Candida albicans*. *Virulence*, 7(7), 819–825. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1184385>
- García-Díez, J., Alheiro, J., Pinto, A. L., Soares, L., Falco, V., Fraqueza, M. J., & Patarata, L. (2017). Influence of food characteristics and food additives on the antimicrobial effect of garlic and oregano essential oils. *Foods*, 6(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/foods6060044>
- Geiger, A. M., Foxman, B., & Sobel, J. D. (1995). Chronic vulvovaginal candidiasis: Characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no candida. *Genitourinary Medicine*, 71(5), 304–307. <https://doi.org/10.1136/sti.71.5.304>
- Ghaddar, N., Anastasiadis, E., Halimeh, R., Ghaddar, A., Dhar, R., Alfouzan, W., Yusef, H., & El Chaar, M. (2020). Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4736-2>

- Ghazi, S., Rafei, R., Osman, M., El Safadi, D., Mallat, H., Papon, N., Dabboussi, F., Bouchara, J. P., & Hamze, M. (2019). The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. *Journal de Mycologie Medicale*, 29(3), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.07.006>
- Ghosh, S., Howe, N., Volk, K., Tati, S., Nickerson, K. W., & Petro, T. M. (2010). *Candida albicans* cell wall components and farnesol stimulate the expression of both inflammatory and regulatory cytokines in the murine RAW264.7 macrophage cell line. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 60(1), 63–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00717.x>
- Ghosh, S., Kebaara, B. W., Atkin, A. L., & Nickerson, K. W. (2008). Regulation of Aromatic Alcohol Production in *Candida albicans* □. 74(23), 7211–7218. <https://doi.org/10.1128/AEM.01614-08>
- Giovana, C. B., Simone, N. B. de F., Priscilla, de L. S., Paula, C. A., Marcelo, F. G. B., Marcelle, M. B.-R., Janaina, P. B., Thais, R. de O., & Jose, F. H. (2016). Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from *Mentha* spp. *African Journal of Plant Science*, 10(10), 203–210. <https://doi.org/10.5897/ajps2016.1454>
- Gourich, A. A., Bencheikh, N., Bouhrim, M., Regragui, M., Rhafouri, R., Drioiche, A., Asbabou, A., Remok, F., Mouradi, A., Addi, M., Hano, C., & Zair, T. (2022). Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Four Moroccan North Middle Atlas Medicinal Plants' Essential Oils: *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha pulegium* L., *Salvia officinalis* L., and *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (Boiss. Chemistry (Switzerland), 4(4), 1775–1788. <https://doi.org/10.3390/chemistry4040115>
- Guenther, E., Krrlka, K., & Rogers, J. A. (1959). Essential oils a n d related products. East, 31(4), 679–687.
- Gunther, L. S. A., Martins, H. P. R., Gimenés, F., De Abreu, A. L. P., Consolaro, M. E. L., & Svidzinski, T. I. E. (2014). Prevalência de *Candida albicans* e não *albicans* isoladas de secreção vaginal: Avaliação comparativa entre colonização, candidíase vaginal e candidíase vaginal recorrente em mulheres diabéticas e não diabéticas. *Sao Paulo Medical Journal*, 132(2), 116–120. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2014.1322640>
- Han, T. L., Cannon, R. D., & Villas-Bôas, S. G. (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*, 48(8), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.04.002>
- Hart, P. H., Brand, C., Carson, C. F., Riley, T. V., Prager, R. H., & Finlay-Jones, J. J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 49(11), 619–626. <https://doi.org/10.1007/s000110050639>
- Hashemi, S. E., Shokohi, T., Abastabar, M., Aslani, N., Ghadamzadeh, M., & Haghani, I. (2019). Species distribution and susceptibility profiles of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of *C. Lusitaniae*. *Current Medical Mycology*, 5(4), 26–34. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.4.2062>
- Hazen, K. C., & Cutler, J. E. (1983). Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *Journal of Biochemistry*, 94(3), 777–783. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134419>
- Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., & El Ajjouri, M. (2011). Évaluation Du Potentiel Antifongique Des Huiles Essentielles De *Mentha Pulegium* Et D'*Eucalyptus Camaldulensis* Dans La Lutte Biologique Contre Les Champignons Responsables De La

- Détérioration Des Pommes En Conservation. Bulletin de La Societe Royale Des Sciences de Liege, 80, 824–836.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., & Nickerson, K. W. (2001). Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982–2992. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001>
- Hsu, C. C., Lai, W. L., Chuang, K. C., Lee, M. H., & Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 51(5), 473–482. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.743051>
- Hussain, A. I., Anwar, F., Rasheed, S., Nigam, P. S., Janneh, O., & Sarker, S. D. (2011). Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 943–952. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000165>
- Ietswaart, J. H. (1980). A taxonomic revision of the Genus *Origanum* [Vrije Universiteit, Amsterdam 1980]. In Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research. <https://doi.org/10.2307/4107984>
- ISO. (1997). International Organization for Standardization (ISO). Aromatic natural raw materials - Vocabulary (ISO 9235:2).
- Jamil, B., Bokhari, M. T. M., Saeed, A., Bokhari, M. Z. M., Hussain, Z., Khalid, T., Bokhari, H., Imran, M., & Abbasi, S. A. (2017). Candidiasis: Prevalence and resistance profiling in a tertiary care hospital of Pakistan. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(5), 688–692.
- Javadikasgari, H., Soltesz, E. G., & Gillinov, A. M. (2018). Surgery for Atrial Fibrillation. *Atlas of Cardiac Surgical Techniques*, 479–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46294-5.00028-5>
- Joung, H. J., & Jetten, A. M. (2008). NF-κB-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65/RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16391–16399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800945200>
- Kabera, Edmond, S., Ally, M., & Xin, H. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties Kabera, Edmond, S., Ally, M., & Xin, H. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(January), 377–392.
- Kalaiaarasan, K., Singh, R., & Chaturvedula, L. (2017). Fungal profile of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(3), DC06–DC09. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23578.9475>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2010). *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in Microbiology*, 161(10), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.008>
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*,

- 140(2), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.045>
- Khan, Z., Ahmad, S., Chandy, R., & Joseph, L. (2012). A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 72(3), 285–287. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.11.017>
- Khlif, M., Sellami, A., Sellami, H., Makni, F., & Ayadi, A. (2011). *Candida dubliniensis*: méthodes d'identificationet implications épidémiologiques. *Pathologie Biologie*, 59(3), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.09.011>
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M., & Parsa, S. (2011). Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Medicale*, 21(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.01.006>
- Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R., & Lanaras, T. (2004). Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 16(6), 588–593. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698805>
- Kokkini, S., Karousou, R., & Hanlidou, E. (2003). HERBS | Herbs of the *Labiatae*. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 3082–3090). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00593-9>
- Kovács, R., & Majoros, L. (2020). Fungal quorum-sensing molecules: A review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. *Journal of Fungi*, 6(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/jof6030099>
- Kruppa, M., Krom, B. P., Chauhan, N., Bambach, A. V., Cihlar, R. L., & Calderone, R. A. (2004). The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 1062–1065. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.1062-1065.2004>
- Lakhdar, L., Farah, A., Lahlou, I., Rida, S., Bouziane, A., & Ennibi, O. (2017). Antibacterial effectiveness of selected moroccan essential oils against the highly virulent jp2 clone of aggregatibacter actinomycet emcomitans. *International journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences*, 9(2), 47. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i2.13406>
- Lakhrissi, B., Boukhraz, A., Barrahi, M., Hartiti, H. EL, & Ouhssine, M. (2016). Antifungal Activity of Essential Oil of Oregano (*Origanum vulgare*), Marjoram (*Origanum majorana*) and Synergy of Two Essential Oils against *Candida albicans*. *Online) International Journal of Research Studies in Science, Engineering and Technology*, 3(12), 14–17.
- LANDAU, J. W., DABROWA, N., & NEWCOMER, V. D. (1965). the Rapid Formation in Serum of Filaments By *Candida albicans*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 44(3), 171–179. <https://doi.org/10.1038/jid.1965.31>
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*, 121(6), 3390–3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148(December 2019), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Lingappa, B. T., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D. F., & Biemann, K. (1969). Phenethyl alcohol and tryptophol: Autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science*, 163(3863), 192–194. <https://doi.org/10.1126/science.163.3863.192>

- Loaiza Oliva, M., Morales Uchima, S. M., Puerta Suárez, J., Mesa Arango, A. C., & Martínez Pabón, M. C. (2023). Lippia origanoides derivatives in vitro evaluation on polymicrobial biofilms: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 148(February). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105656>
- Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., & Cañigüeral, S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 519–524. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000600016>
- Lossinsky, A. S., Jong, A., Fiala, M., Mukhtar, M., Buttle, K. F., & Ingram, M. (2006). The histopathology of *Candida albicans* invasion in neonatal rat tissues and in the human blood-brain barrier in culture revealed by light, scanning transmission and immunoelectron microscopy. *Histology and Histopathology*, 21(10–12), 1029–1041. <https://doi.org/10.14670/HH-21.1029>
- Lu, S. Y. (2021). Oral candidosis: Pathophysiology and best practice for diagnosis, classification, and successful management. *Journal of Fungi*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/jof7070555>
- Lukas, B., Schmiderer, C., Mitteregger, U., & Novak, J. (2010). Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*, 121(1), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.028>
- Lukas, B., Schmiderer, C., & Novak, J. (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 119, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.008>
- Mahboubi, M., & Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 325–327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023>
- Malinová, Z., Čonková, E., & Václav, P. (2023). Biofilm Formation in Medically Important *Candida* Species. *Journal of Fungi*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/jof9100955>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Marak, M. B., & Dhanashree, B. (2018). Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. Isolated from clinical samples. *International Journal of Microbiology*, 2018, 6–11. <https://doi.org/10.1155/2018/7495218>
- Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2014). Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1192–1198. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012>
- Marinho, S. A., Teixeira, A. B., Santos, O. S., Cazanova, R. F., Ferreira, C. A. S., Cherubini, K., & de Oliveira, S. D. (2010). Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 286–294. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200004>
- Maruyama, N., Sekimoto, Y., Ishibashi, H., Inouye, S., Oshima, H., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, 2, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-2-1>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- McManus, B. A., & Coleman, D. C. (2014). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 166–178.

- <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.008>
- Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J. A., Serra, M. C., & Khouja, M. L. (2016). Les activités biologiques et les propriétés de l'huile de l'*Origanum glandulosum* Desf. *Phytotherapie*, 14(2), 102–108. [https://doi.org/DOI 10.1007/s10298-015-0963-x](https://doi.org/DOI%2010.1007/s10298-015-0963-x)
- Meddour, R., Meddour, O., & Derridj, A. (2011). Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Algeria): an ethnobotanical survey. *Planta Medica*, 77(12). <https://doi.org/10.1055/s-0031-1282417>
- Mendoza-Juache, A., Aranda-Romo, S., Bermeo-Escalona, J. R., Gómez-Hernández, A., Pozos-Guillén, A., & Sánchez-Vargas, L. O. (2017). The essential oil of *Allium sativum* as an alternative agent against *Candida* isolated from dental prostheses. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(3), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.008>
- Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019). Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16(March 2017), 100262. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100262>
- Miraj, S., & Kiani, S. (2016). Study of pharmacological effect of *Ocimum basilicum*: A review. *Der Pharmacia Lettre*, 8(9), 276–280.
- Mohamadi, J., Motaghi, M., panahi, J., Havasian, M. R., Delpisheh, A., Azizian, M., & Pakzad, I. (2014). Anti-fungal resistance in *Candida* isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation*, 10(11), 667–670. <https://doi.org/10.6026/97320630010667>
- Mohammed, A. N., Abdulbaqi, J. N., & Ajah, A. H. (2017). Epidemiological Study of *Candida* Species among Vaginal and Oral Candidiasis from different clinical states. *International Journal of ChemTech Research*, 10(5), 844–857.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., & Akbarzadeh, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* L. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 14(2), 208–213. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643923>
- Muadcheingka, T., & Tantivitayakul, P. (2015). Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.002>
- Müller-Sepúlveda, A., Chevecich, C. C., Jara, J. A., Belmar, C., Sandoval, P., Meyer, R. S., Quijada, R., Moura, S., López-Muñoz, R., Díaz-Dosque, M., & Molina-Berríos, A. (2020). Chemical Characterization of *Lavandula dentata* Essential Oil Cultivated in Chile and Its Antibiofilm Effect against *Candida albicans*. *Planta Medica*, 86(16), 1225–1234. <https://doi.org/10.1055/a-1201-3375>
- Naglik, J. R., Rodgers, C. A., Shirlaw, P. J., Dobbie, J. L., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, D., Agabian, N., & Challacombe, S. J. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *Journal of Infectious Diseases*, 188(3), 469–479. <https://doi.org/10.1086/376536>
- Nagy, G., Hennig, G. W., Petrenyi, K., Kovacs, L., Pocs, I., Dombradi, V., & Banfalvi, G. (2014). Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 5185–5194. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5696-5>

- Nakatsu, T., Lupo, A. T., Chinn, J. W., & Kang, R. K. L. (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, 571–631. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80014-9)
- Navarathna, D. H. M. L. P., Nickerson, K. W., Duhamel, G. E., Jerrels, T. R., & Petro, T. M. (2007). Exogenous farnesol interferes with the normal progression of cytokine expression during candidiasis in a mouse model. *Infection and Immunity*, 75(8), 4006–4011. <https://doi.org/10.1128/IAI.00397-07>
- Neppelenbroek, K. H., Seó, R. S., Urban, V. M., Silva, S., Dovigo, L. N., Jorge, J. H., & Campanha, N. H. (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases*, 20(4), 329–344. <https://doi.org/10.1111/odi.12123>
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
- Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., Tuch, B. B., Andes, D. R., & Johnson, A. D. (2012). A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 148(1–2), 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048>
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2018). *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*, 15(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157.Candida>
- Norouzi, N., Alizadeh, F., Khodavandi, A., & Jahangiri, M. (2021). Antifungal activity of menthol alone and in combination on growth inhibition and biofilm formation of *Candida albicans*. *Journal of Herbal Medicine*, 29(July), 100495. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100495>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, 3–5. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Odds, F. C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 12(1), 45–93. doi:10.3109/10408418509104425
- Oh, K. B., Miyazawa, H., Naito, T., & Matsuoka, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4664–4668. <https://doi.org/10.1073/pnas.071404698>
- Oleksy-Wawrzyniak, M., Junka, A., Brożyna, M., Paweł, M., Kwiek, B., Nowak, M., Mączyńska, B., & Bartoszewicz, M. (2022). The In Vitro Ability of *Klebsiella pneumoniae* to Form Biofilm and the Potential of Various Compounds to Eradicate It from Urinary Catheters. *Pathogens*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens11010042>
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(May), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Park, H. K., Ha, M. H., Park, S. G., Kim, M. N., Kim, B. J., & Kim, W. (2012). Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. *PLoS ONE*,

- 7(2), 3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032847>
- Pathak, A. K., Sharma, S., & Shrivastva, P. (2012). Multi-species biofilm of. *J Appl Oral Sci*, 20(1), 70–75.
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>
- Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S., & de Moraes, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
- Pezzani, R., Vitalini, S., & Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1253–1268. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9535-z>
- Pianetti, C. (2015). Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à *Candida*. Enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy et comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes mannanes et anticorps anti-mannanes. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732226%0Ahttps://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732226/document>
- Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2021). Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata* L. and *Mentha pulegium* L. growing wild in Sardinia island (Italy). *Natural Product Research*, 35(6), 993–999. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1610755>
- Polke, M., Leonhardt, I., Kurzai, O., & Jacobsen, I. D. (2018). Farnesol signalling in *Candida albicans*—more than just communication. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2), 230–243. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1337711>
- Pradebon Brondani, L., Alves da Silva Neto, T., Antonio Freitag, R., & Guerra Lund, R. (2018). Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.001>
- Proškovcová, M., Čonková, E., Váczi, P., Harčárová, M., & Malinovská, Z. (2021). Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the *lamiaceae* family against *Candida albicans* clinical isolates. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(2), 260–266. <https://doi.org/10.26444/aaem/135892>
- Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Vol. 2, CN).
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. (2009). Our Current Understanding of Fungal Biofilms Fungal biofilms Gordon Ramage et al. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 340–355. <https://doi.org/10.3109/10408410903241436>
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5459–5463. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>
- Ramage, G., & Wickes, B. L. (2001). Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of. *Society*, 45(9), 2475–2479. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2475>
- Rautemaa, R., & Ramage, G. (2011). Oral candidosis Clinical challenges of a biofilm disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(4), 328–336. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.585606>

- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275–297. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>
- Ríos, J. L. (2015). Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>
- Rodrigues, C. F., & Černáková, L. (2020). Farnesol and tyrosol: Secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. *Genes*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/genes11040444>
- Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2019). *Candida* sp. Infections in patients with diabetes mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, 8(1), 1–41. <https://doi.org/10.3390/jcm8010076>
- Rodríguez-Cerdeira, C., Gregorio, M. C., Molares-Vila, A., López-Barcenas, A., Fabbrocini, G., Bardhi, B., Sinani, A., Sánchez-Blanco, E., Arenas-Guzmán, R., & Hernandez-Castro, R. (2019). Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174(November 2018), 110–125. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.011>
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Leong, S. Y., Khelfa, A., Greiner, R., & Chemat, F. (2017). Extraction Methods of Essential Oils From Herbs and Spices. In *Essential Oils in Food Processing* (pp. 21–55). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119149392.ch2>
- Ruhnke, M. (2006). Epidemiology of *Candida albicans* Infections and Role of Non-*Candida albicans* Yeasts. *Current Drug Targets*, 7(4), 495–504. <https://doi.org/10.2174/138945006776359421>
- Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Soudi, M. R., & Dinarvand, R. (2014). Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.024>
- Sabra, A., Bessoule, J., Atanasova-penichon, V., & Noël, T. (2014). Host-Pathogen Interaction and Signaling Molecule Secretion Are Modified in the dpp3 Knockout Mutant of *Candida lusitanae*. 82(1), 413–422. <https://doi.org/10.1128/IAI.01263-13>
- Sahal, G., & Bilkay, I. S. (2018). Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(5), 644–650. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0136-2018>
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.009>
- Sánchez-Vargas, L. O., Estrada-Barraza, D., Pozos-Guillen, A. J., & Rivas-Caceres, R. (2013). Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of Oral Biology*, 58(10), 1318–1326. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.06.006>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART1), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>
- Sebaa, S., Boucherit-Otmani, Z., & Courtois, P. (2019). Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. *Molecular Medicine Reports*, 19(4), 3201–3209. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9981>
- Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Kunkel, D. (2015). Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida* sp. Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.003>
- Selles, S. M. A., Kouidri, M., Belhamiti, B. T., & Ait Amrane, A. (2020). Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 2352–2358. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00482-5>
- Semighini, C. P., Hornby, J. M., Dumitru, R., Nickerson, K. W., & Harris, S. D. (2006). Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Molecular Microbiology*, 59(3), 753–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04976.x>
- Seneviratne, C. J., Silva, W. J., Jin, L. J., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2009). Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 54(11), 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.08.002>
- Shaik, J. A., & Reddy, R. K. (2017). Review Article Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(September), 11–19. <https://doi.org/10.4103/ccd.ccd>
- Sharifzadeh, A., Shokri, H., & Katiraei, F. (2021). Anti-adherence and anti-fungal abilities of thymol and carvacrol against *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis in comparison with fluconazole and voriconazole. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(1). <https://doi.org/10.5812/JJNPP.65005>
- Sharma, M., & Prasad, R. (2011). The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4834–4843. <https://doi.org/10.1128/AAC.00344-11>
- Shea, J. M., & Del Poeta, M. (2006). Lipid signaling in pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.003>
- Sheehan, D. J., Brown, S. D., Pfaller, M. A., Warnock, D. W., Rex, H. J., Chaturvedi, F. V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Moore, L. S., Odds, F. C., Rinaldi, M. G., & Walsh, T. J. (2004). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS Document MA44-A. In N (Vol. 24, Issue 15).
- Shirliff, M. E., Krom, B. P., Meijering, R. A. M., Peters, B. M., Zhu, J., Scheper, M. A., Harris, M. L., & Jabra-Rizk, M. A. (2009). Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2392–2401. <https://doi.org/10.1128/AAC.01551-08>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021).

- Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(3), 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2010). Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. Journal of Medical Microbiology, 59(7), 747–754. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017517-0>
- Singh, R. (2015). Medicinal plants: A review. Journal of Plant Sciences, 3(1–1), 50–55. <https://doi.org/10.11648/j.jps.s.2015030101.18>
- Soliman, S., Alnajdy, D., El-Keblawy, A. A., Mosa, K. A., Khoder, G., & Noreddin, A. M. (2017). Plants' Natural Products as Alternative Promising Anti-*Candida* Drugs. Pharmacognosy Reviews, 11(1), 104–122. <https://doi.org/10.4103/phrev.phrev>
- Song, Y. M., Zhou, H. Y., Wu, Y., Wang, J., Liu, Q., & Mei, Y. F. (2020). In Vitro Evaluation of the Antibacterial Properties of Tea Tree Oil on Planktonic and Biofilm-Forming *Streptococcus mutans*. AAPS PharmSciTech, 21(6), 1–12. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01753-6>
- Soylu, E. M., Kurt, Ş., & Soylu, S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143(3), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Soylu, E. M., Soylu, S., & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161(2), 119–128. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Sticher, O. (2008). Natural product isolation. In Natural Product Reports (Vol. 25, Issue 3). <https://doi.org/10.1039/b700306b>
- Stoyanova, A., Georgiev, E., Kula, J., & Majda, T. (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. Journal of Essential Oil Research, 17(5), 475–476. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698968>
- Stratakis, A. C., & Koidis, A. (2015). Methods for Extracting Essential Oils. In Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Stringaro, A., Colone, M., Cecchetti, S., Zeppetella, E., Spadaro, F., & Angiolella, L. (2023). “In vivo” and “in vitro” antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil and its two phenolic compounds on clinical isolates of *Candida* spp. Archives of Microbiology, 205(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03355-1>
- Tafrihi, M., Imran, M., Tufail, T., Gondal, T. A., Caruso, G., Sharma, S., Sharma, R., Atanassova, M., Atanassov, L., Fokou, P. V. T., & Pezzani, R. (2021). The wonderful activities of the genus *Mentha*: Not only antioxidant properties. Molecules, 26(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules26041118>
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. Journal of Fungi, 7(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>

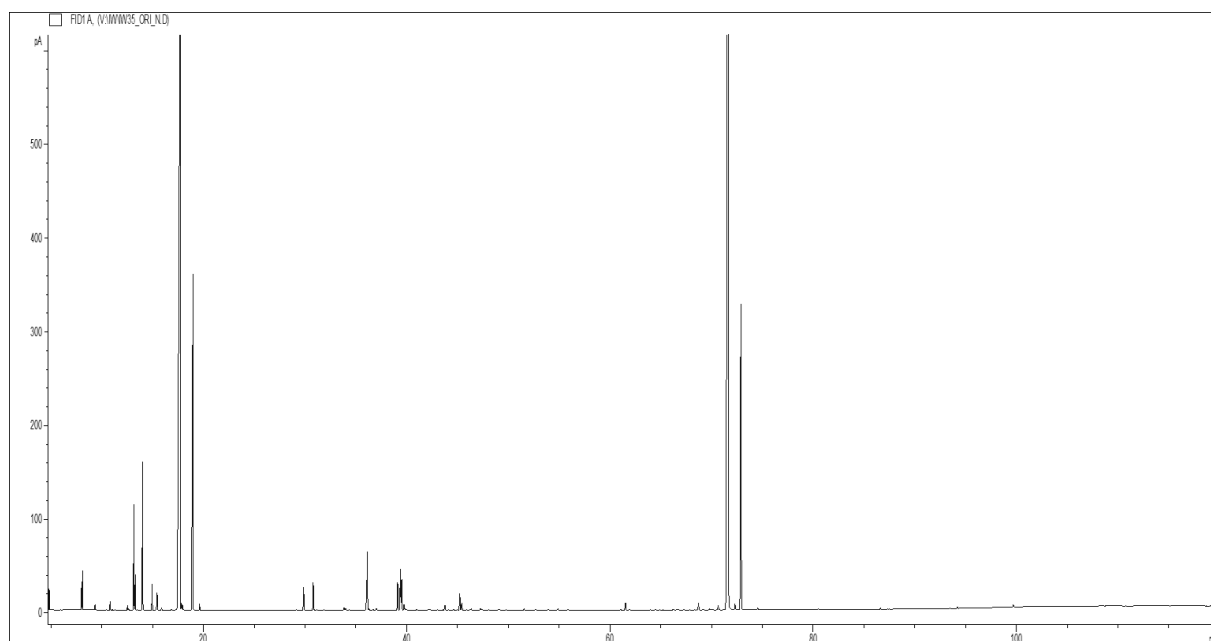
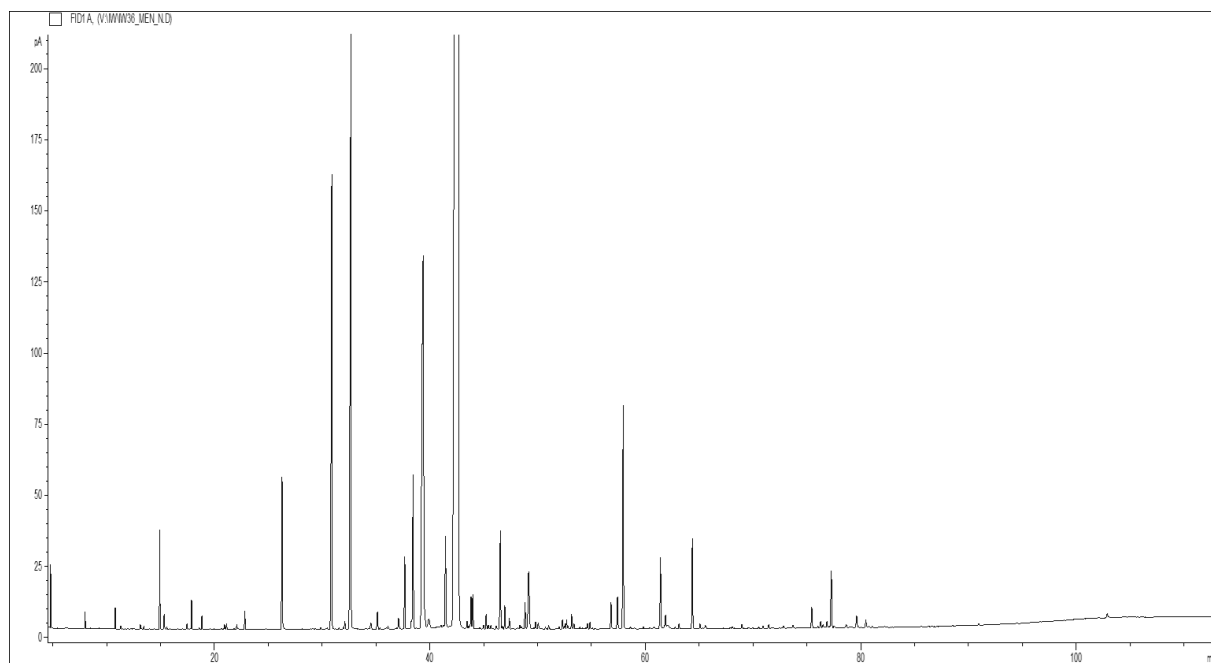
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707–2714. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>
- Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2007). In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52(8), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.01.009>
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1128/EC.05085-11>
- Tian, X., Ding, H., Ke, W., & Wang, L. (2021). Quorum Sensing in Fungal Species. *Annual Review of Microbiology*, 75, 449–469. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-060321-045510>
- Tulasidas, S., Rao, P., Bhat, S., & Manipura, R. (2018). A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2443–2448. <https://doi.org/10.2147/IDR.S179462>
- Tumbarello, M., Fiori, B., Trecarichi, E. M., Posteraro, P., Losito, A. R., de Luca, A., Sanguinetti, M., Fadda, G., Cauda, R., & Posteraro, B. (2012). Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS ONE*, 7(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033705>
- Turan, H., & Demirbilek, M. (2018). Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.05.003>
- Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: Microscopic observations and chemical characterization of cymbopogon citratus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-65>
- Udawatte, N. S., Kang, S. W., Wang, Y., Arumugam, T. V., & Seneviratne, C. J. (2020). Predictive Nephrotoxicity Profiling of a Novel Antifungal Small Molecule in Comparison to Amphotericin B and Voriconazole. *Frontiers in Pharmacology*, 11(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00511>
- Udemezue, O. I. (2021). Therapeutic Potentials of Natural Compounds for Cutaneous. NNAMDI AZIKIWE UNIVERSITY, AWKA MAY,.
- Vale-Silva, L., Silva, M. J., Oliveira, D., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., & Pinto, E. (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*, 61(2), 252–260. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036988-0>
- van Wyk, C., & Steenkamp, V. (2011). Host factors affecting oral candidiasis. *Southern African Journal of Epidemiology and Infection*, 26(1), 18–21. <https://doi.org/10.1080/10158782.2011.11441414>
- Vercauteren, J. (2012). Plan, Formules et illustrations du cours.
- Voigt, V., Franke, H., & Lachenmeier, D. W. (2024). Risk Assessment of Pulegone in Foods Based on Benchmark Dose–Response Modeling. *Foods*, 13(18), 2906. <https://doi.org/10.3390/foods13182906>

- Wendy QUEVAREC. (2023). Prise en charge des candidoses cutanéomuqueuses à l'officine. université de Limoges.
- Westwater, C., Balish, E., & Schofield, D. A. (2005). *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: A possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic Cell*, 4(10), 1654–1661. <https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1654-1661.2005>
- Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, M. A. O. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontology* 2000, 55(1), 250–265. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x>
- Wilson, D., Naglik, J. R., & Hube, B. (2016). The Missing Link between *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis and Host Cell Damage. *PLoS Pathogens*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005867>
- Wu, X., Zhang, S., Li, H., Shen, L., Dong, C., Sun, Y., Chen, H., Xu, B., Zhuang, W., Deighton, M., & Qu, Y. (2020). Biofilm Formation of *Candida albicans* Facilitates Fungal Infiltration and Persister Cell Formation in Vaginal Candidiasis. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01117>
- Yen, G. C., & Duh, P. Der. (1993). Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(4), 383–386. <https://doi.org/10.1007/BF02552711>
- Zahraoui, E. M., Amghar, S., & Ababou, B. (2023). Anticandidal activity of two essential oils from Morocco : *Thymus satureioides* Anticandidal activity of two essential oils from Morocco : *Thymus satureioides* and *Mentha pulegium* L . December.
- Zuzarte, M., Vale-Silva, L., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Vaz, S., Canhoto, J., Pinto, E., & Salgueiro, L. (2012). Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. Essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(7), 1359–1366. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1450-4>

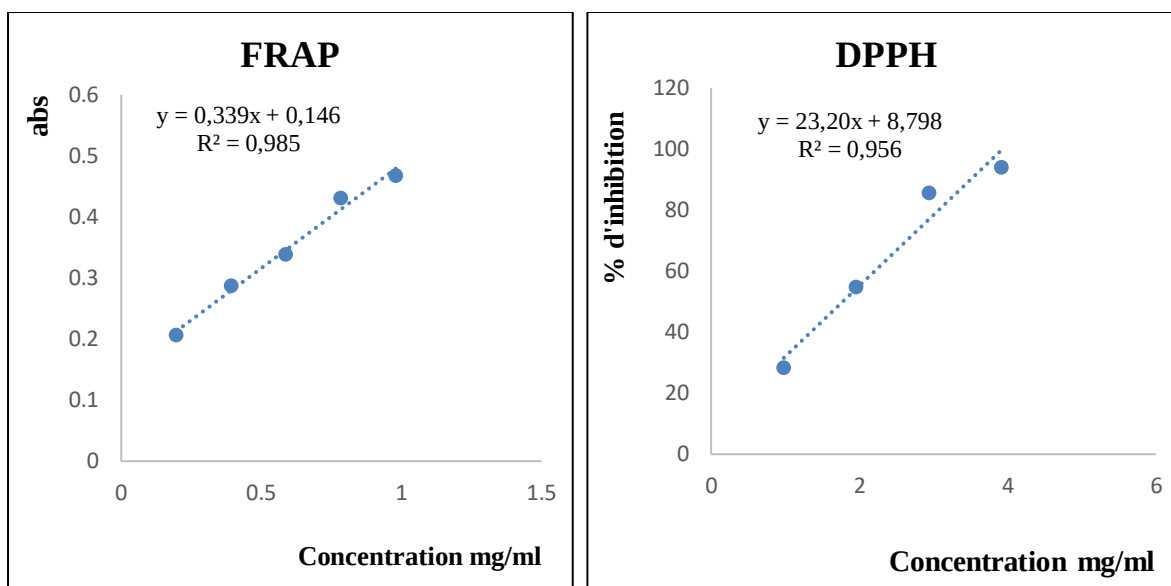
Annexe

Annexe

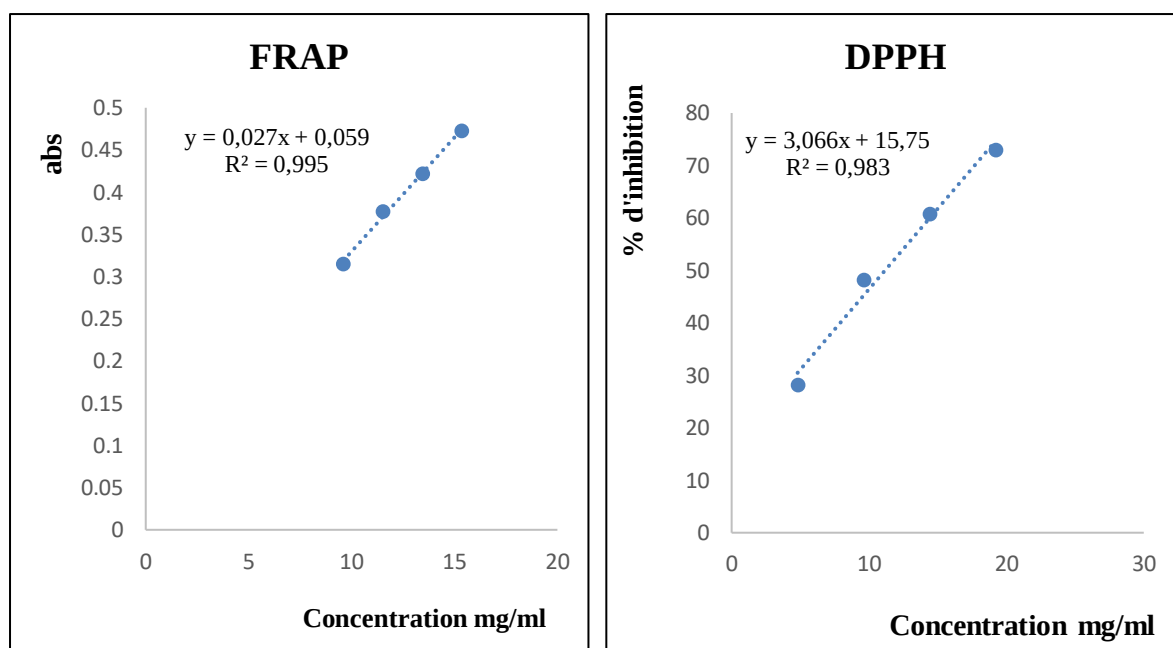
Annexe 1 : Analyse CG-MS/CG-FID

Profil chromatographique pour l'huile d'*O. vulgare*Profil chromatographique pour l'huile de *M. pulegium*

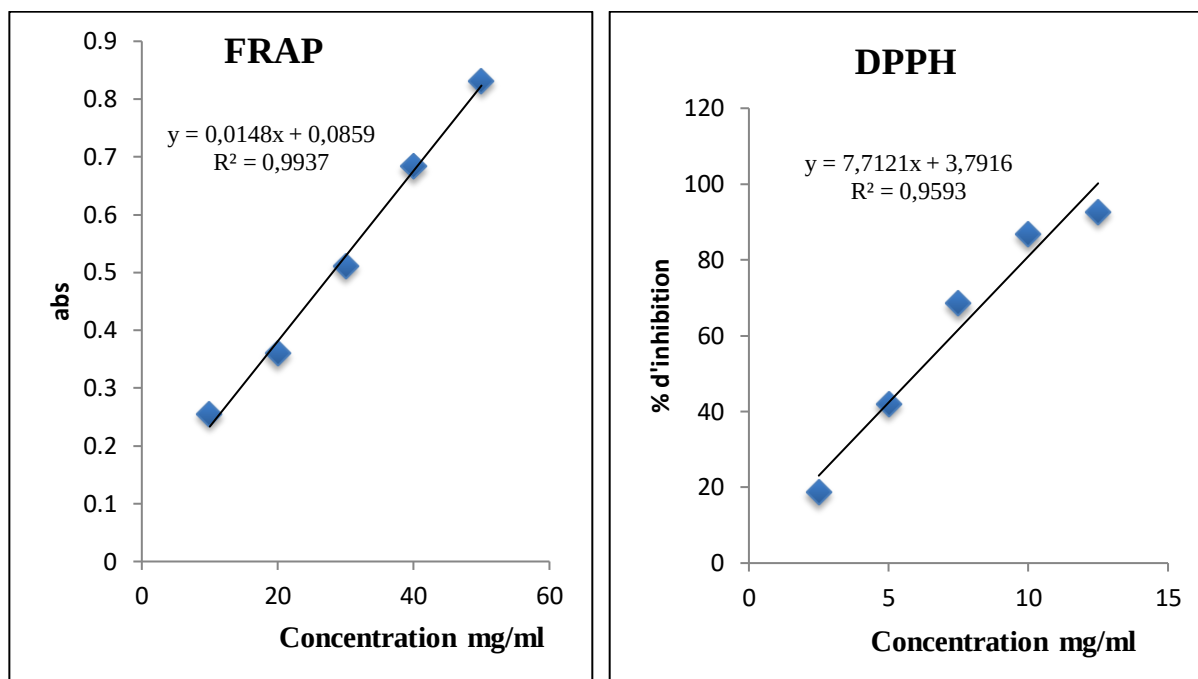
Annexe 2 : Courbe de calibration pour l'activité antioxydante



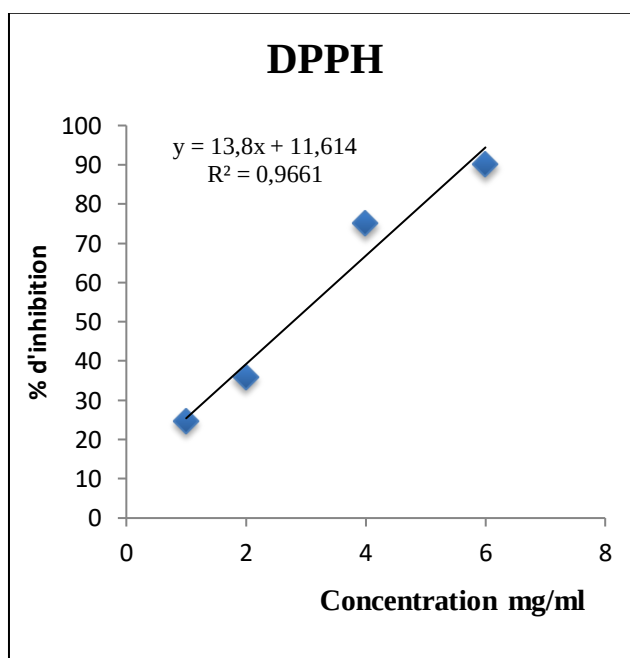
Corrélation du pouvoir réducteurs et DPPH de l'huile d'*O. vulgare*.



Corrélation du pouvoir réducteurs et DPPH de l'huile de *M. pulegium*.



Corrélation du pouvoir réducteurs et DPPH de l'acide ascorbique.



DPPH de l'acide gallique

Annexe 3 : Inhibition des tubes germinatifs

Effet de l'agent nystatine sur la formation des tubes germinatifs

Strains	Control /Nystatine		CMI x 1/2		CMI	
	GT/300 (Moy)	% d'inhibition	GT/300 (CMI x1/2) (Moy)	% d'inhibition	GT/300 (CMI x1/2) (Moy)	% d'inhibition
ATCC10237	259,5	0	26,3	90	6,3	98
ATCC10231	273	0	17,0	94	5,7	98
CA1	252	0	13,0	95	7,3	97
CA2	273	0	32,3	88	13,7	95
CA4	246	0	34,3	86	12,7	95
CA6	246	0	27,0	89	11,7	95
CA8	241	0	36,0	85	12,7	95
CA9	255	0	14,0	95	7,3	97
CA10	267,5	0	37,3	86	16,7	94

Effet de l'huile essentielle d'*O. vulgare* sur la formation des tubes germinatifs

Strains	Control /Origan		CMI x 1/2		CMI	
	GT/300 (Moy)	% d'inhibition	GT/300 (CMI x1/2) (Moy)	% d'inhibition	GT/300 (CMI x1/2) (Moy)	% d'inhibition
ATCC10237	259,5	0	20,5	92	12,3	95
ATCC10231	273	0	21,0	92	7,0	97
CA1	252	0	10,0	96	5,0	98
CA2	273	0	10,3	96	4,3	98
CA4	246	0	27,5	89	12,0	95
CA6	246	0	21,0	91	9,7	96
CA8	241	0	10,3	96	5,0	98
CA9	255	0	25,3	90	10,7	96
CA10	267,5	0	33,5	87	10,7	96

Effet de l'huile essentielle d'*M. pulegium* sur la formation des tubes germinatifs

Strains	Control /Menthe		CMI x 1/2		CMI	
	GT/300 (Moy)	% d'inhibition	GT/300 (CMI x1/2) (Moy)	% d'inhibition	GT/300 (CMI x1/2) (Moy)	% d'inhibition
ATCC10237	259,5	0	31,3	88	16,0	94
ATCC10231	273	0	29,0	89	17,3	94
CA1	252	0	34,7	86	18,7	93
CA2	273	0	40,7	85	22,7	92
CA4	246	0	30,7	88	14,7	94
CA6	246	0	18,3	93	6,3	97
CA8	241	0	34,3	86	19,7	92
CA9	255	0	18,3	93	7,5	97
CA10	267,5	0	29,3	89	14,7	95

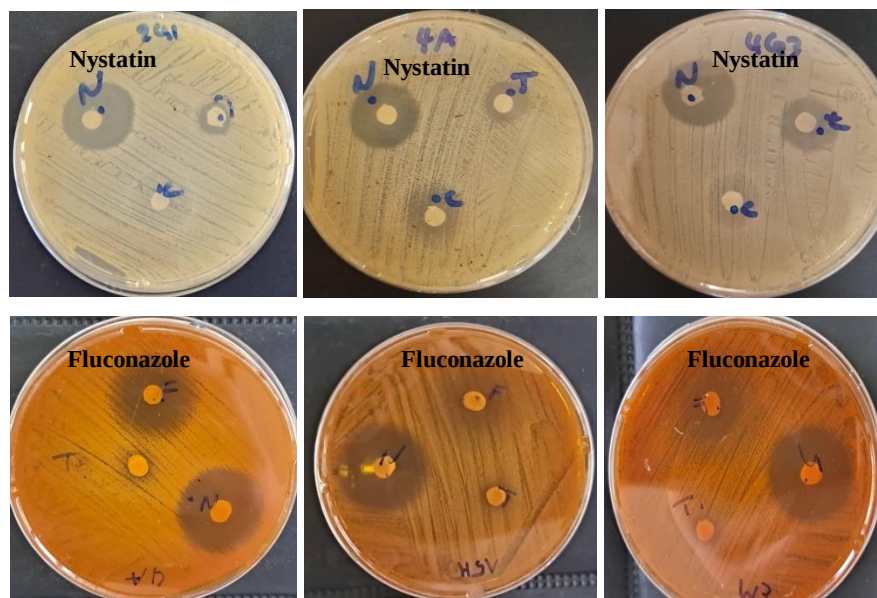
Annexe 4 : Test de sensibilité aux agents antifongiques

Test de sensibilité des souches de *C. albicans* aux antifongiques standards

<i>C. albicans</i> souches	DZI (mm)		
	Amphotericin B	Fluconazole	Nystatine
	(20 µg)	(25 µg)	(50 µg)
ATCC10237	14.7 ± 0.5S	18.8 ± 2.1S	25.8 ± 0.2S
ATCC10231	12.0 ± 0.0S	28.7 ± 0.5S	27.7 ± 2.4S
CA1	10.7 ± 0.0R	15.7 ± 1.9SDD	25.8 ± 0.7S
CA2	10.7 ± 0.5R	16.3 ± 0.5SDD	25.2 ± 0.2S
CA4	12.7 ± 0.5S	28.7 ± 0.9S	27.0 ± 2.4S
CA6	14.0 ± 0.0S	23.7 ± 0.5S	25.2 ± 0.2S
CA8	12.0 ± 0.07S	21.7 ± 0.0S	23.0 ± 0.9SDD
CA9	13.0 ± 0.0S	20.3 ± 0.9S	25.7 ± 0.5S
CA10	14.0 ± 0.0S	14.8 ± 1.9SDD	24.5 ± 0.7SDD

DZI : Diamètre de la zone d'inhibition (valeurs moyennes avec écart-type SD)

R : Résistant ; S : Sensible ; SDD : Sensibilité dépendante de la dose.



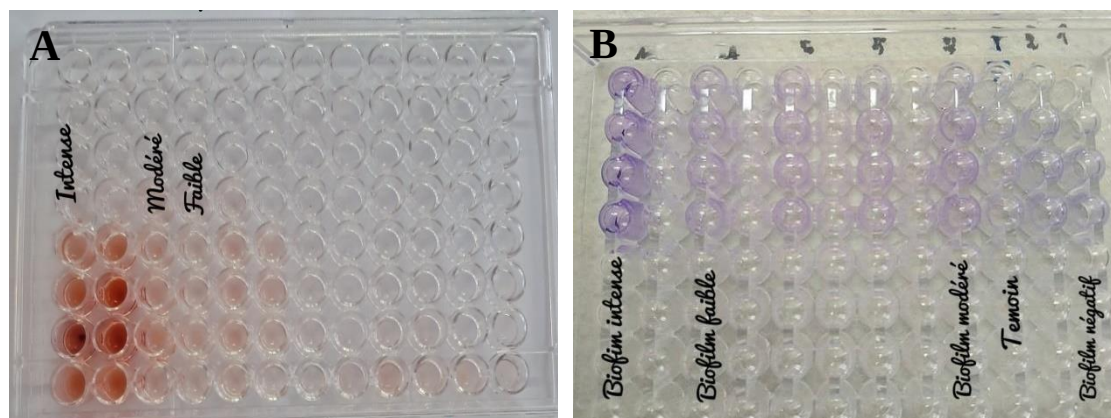
Test de sensibilité des souches aux antifongiques

Annexe 5 : Test de formation de biofilm

Quantification des biofilms mesuré par le test de CV, exprimé en moyenne $\pm$ SD.

<i>C. albicans</i> souches	Biofilm formation	
	Moyenne d'absorbance à 630 nm $\pm$ écart-type	Catégories
ATCC10237	0,161 $\pm$ 0,004	Modéré
ATCC10231	0,142 $\pm$ 0,007	Modéré
CA1	0,271 $\pm$ 0,020	Intense
CA2	0,915 $\pm$ 0,015	Intense
CA4	0,162 $\pm$ 0,008	Modéré
CA6	0,142 $\pm$ 0,038	Modéré
CA8	0,211 $\pm$ 0,050	Modéré
CA9	0,132 $\pm$ 0,008	Faible
CA10	0,141 $\pm$ 0,008	Modéré

Une différence significative a été observée entre les souches ($P < 0.05$, one-way ANOVA).



Formation de biofilm sur microplaques. (A) technique de TTC, (B) technique de CV

Publication



ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY AND COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOFILM PRODUCTION AND METABOLIC ACTIVITY IN CANDIDA SPP. ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Amel Benmessaoud^{1*}, Wassim Yezli^{2,3}, Mohamed Ouassini Bensaid^{3,4}, Sidahmed Saadi⁵, Samira Nair^{1,6}

¹Laboratoire de recherche en Géo-Environnement et Développement des Espaces (LGEDE), University of Mascara, BP 763, 29000 Mascara, Algeria

²Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria.

³Faculty of Nature and Life Sciences (SNV), Ibn Khaldoun University, P.O. BOX 78, 14000 Tiaret, Algeria

⁴Laboratoire d'Elaboration et de Caractérisation des Matériaux, Faculty of Technology, DjillaliLiabès University of Sidi Bel-Abbès, P.O. BOX 89, 22000 Sidi Bel-Abbès, Algeria

⁵Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16 050 Kouba, Algeria

⁶Faculty of SNV, Department of Biology; University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

Candida, known as a commensal yeast in the oral and vaginal canals, can also cause a range of opportunistic diseases. Its ability to form biofilms is what underlies its infectious pathogenicity. This research aimed to examine clinical *Candida* isolates regarding their ability to form biofilms and their susceptibility to antifungal drugs. Samples from vaginal and oral sites were collected and identified using phenotypic tests such as CHROMagar, and carbohydrate assimilation. Total biofilm biomass and metabolic activity were assessed using crystal violet staining and tetrazolium salt reduction, respectively. Out of 120 *Candida* species isolated, *C. albicans* was the most common (85%), followed by *C. glabrata* (12.5%), *C. dubliniensis* (1.67%), and *C. tropicalis* (0.83%). The majority of isolates showed high sensitivity to fluconazole (93.3%), followed by amphotericin B (79.2%). A significant correlation was observed between biofilm biomass and metabolic activity, with non-*albicans* *Candida* strains exhibiting the highest biofilm formation, followed by *C. albicans* strains. These findings emphasize the importance of considering these factors when managing *Candida* infections.

Keywords: Biofilm biomass, metabolic activity, *Candida albicans*, non-*albicans* *Candida*

INTRODUCTION

Candida species are ubiquitous fungi, found on mucous membrane surfaces, including the gastrointestinal and genital tracts of healthy individuals. These opportunistic organisms can cause a range of ailments in vulnerable individuals such as the elderly, hospitalized patients, or those with weakened immune systems¹. *Candida*-related fungal

infections can vary from superficial mucocutaneous proliferations to invasive conditions affecting multiple organs². Accurate identification of *Candida* species is crucial for appropriate treatment and management of candidiasis. Various methods, including phenotypic techniques like chromogenic media and carbohydrate assimilation, as well as molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR), have

been employed for characterizing *Candida* species³. *Candida albicans* is typically the predominant species responsible for these infections, although there has been a rise in non-*albicans* *Candida* species like *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, and *C. kefyr* in recent years. Vaginal and oral candidiasis are the most common, with approximately 90% of oral candidiasis cases attributed to these species, and prevalence ranging from 22.5% to 83.3% in children worldwide. Genital candidiasis affects about 75% of women at least once in their lifetime, with recurrence rates estimated between 5% and 8%^{1,4,5}. The increased prevalence of these isolated *Candida* species is linked to excessive use of antifungal drugs, leading to resistance, and the rise in patients undergoing immunosuppressive therapy^{6,7}.

The formation of biofilms in *Candida* species is one of the principal virulence factors promoting the development and persistence of candidiasis. These biofilms have a complex three-dimensional structure providing a protective environment for microorganisms. The biofilm formation process includes initial adhesion, intermediate multiplication with extracellular matrix production, maturation, and dispersion phases. Unfortunately, biofilms often confer resistance to standard antibiotic treatments, making subsequent infections challenging to treat^{8,9}. Moreover, different *Candida* species show variations in biofilm-forming ability and sensitivity to antifungal agents. This study aims to identify clinical *Candida* isolates from oral and vaginal mucosa, assess their biofilm-forming capacity, and examine their sensitivity to antifungal agents.

MATERIAL AND METHODS

Clinical isolates

A total of 155 cases with vaginal, and oral thrush symptoms were studied over a one-year period (May 2021 to April 2022). These patients sought medical consultation at Youcef Damardji Hospital in Tiaret, Algeria, where clinical assessments were conducted by specialized doctors. *Candida* was isolated by rubbing a sterile swab across the candidal lesion on the vaginal or oral mucosa. Subsequently, the samples were immediately

cultured on sabouraud chloramphenicol (SC) medium, with and without actidione and then incubated at 37 °C for 48 h. After confirming that the colonies belonged to the *Candida* species, the isolates were purified through successive plating until a pure isolated colony was obtained.

Phenotypic identification of *Candida* isolates Chromogenic agar culture

Chromogenic media are utilized to differentiate various *Candida* species based on the color of their colonies¹⁰. Pure yeast isolates were cultured on CHROMagar *Candida* (Realab, Tizi-ouzou, Algeria) and incubated for 48 h at 37 °C. According to the manufacturer's instructions, colonies of *C. albicans* or *C. dubliniensis* should show up green, metallic blue for *C. tropicalis*, pale rose for *C. krusei* and pink for *C. glabrata*.

Germ tube formation test

The purpose of this test was to look for germ tube formation, a characteristic observed only by *C. albicans* and *C. dubliniensis*¹¹. One to two well-defined colonies were inoculated into 0.5 ml of fresh human serum and incubated for 3 h at 37 °C. Following incubation, a drop of the suspension was placed between a slide and coverslip and examined under microscope to determine the presence of germ tubes^{12,13}.

Chlamydospore formation test

The principle of this technique was to inoculate a *Candida* colony onto a nutrient-poor medium in order to observe the formation of resistance spores that distinguish strains of *C. dubliniensis*, *C. albicans* and very infrequently *C. tropicalis*¹⁴. On rice agar tween (RAT) (Realab, Tizi-ouzou, Algeria) medium, a drop of previous preparation (serum + inoculum) was inoculated and covered with a coverslip. After 48 h of incubation at 37 °C, observations were made directly under microscope.

Carbohydrate assimilation test

Differences in carbohydrate assimilation capacity between species are utilized for their determination. This method relies on the species' ability to assimilate specific sugars as their sole source of carbon¹⁴. Furthermore,

several studies have shown that *C. dubliniensis* can be differentiated from *C. albicans* by its inability to assimilate D-xylose^{15,16}. According to Khan et al.¹⁶, a basal medium promoting yeast growth in the presence of appropriate substrates was prepared with 6.7 g of yeast nitrogen base, 10 g of carbon sources, and 20 g of agar. Yeast suspension was prepared, adjusted to an optical density of 0.15 and then seeded onto the medium. Each plate was inoculated with 8 isolates and incubated for 48h at 37 °C. Carbohydrate assimilation was indicated by yeast growth around the corresponding seeding site.

C. albicans ATCC10237 and *C. albicans* ATCC10231 served as reference strains for all tests.

In-vitro antifungal susceptibility

Candida spp. were tested for susceptibility to antifungal drugs using the disk diffusion method following the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M44-A guidelines¹⁷. After obtaining a turbidity standard of 0.5 McFarland, the fungal solution was inoculated on Mueller Hinton agar supplemented with 0.5 µg/mL methylene blue and 2% glucose, and allowed to dry for 5 to 15 minutes. Subsequently, amphotericin B (20 µg) and fluconazole (25 µg) discs were placed onto the agar surface. Following incubation for 24 h at 37 °C, the zones of inhibition around the discs were measured and interpreted according to the predefined criteria: susceptible (S) for fluconazole at zone diameters of 19 mm and amphotericin B at 11 mm; susceptible dose-dependent (SDD) for fluconazole at zone diameters of 15 to 18 mm; and resistant (R) for fluconazole at zone diameters of 14 mm and amphotericin B at zone diameters of 10 mm¹⁸.

Biofilm assay

The ability of *Candida* species to form biofilms was evaluated using the microtiter plate method. Pure colonies of *C. albicans* and *Candida non-albicans* were suspended in yeast peptone dextrose broth (YPD) and cultured for 18 h at 37 °C. The cell density was adjusted to $1-1.5 \times 10^6$ CFU/ml using spectrophotometry¹⁹. Biofilms were formed by transferring 100 µl of standardized cell suspensions into selected wells of round bottom microplates and incubating for 48 h at 37 °C. Each strain was

introduced into three wells, and at least six wells were reserved as negative controls (only broth). After biofilm formation, the medium was aspirated and non-adherent cells were removed by washing three times with sterile phosphate buffered saline (PBS).

Measurement of biofilm formation

The biomass and metabolic activity of the formed biofilms were assessed using two different approaches.

Crystal violet assay

The crystal violet (CV) test was used to quantify biofilm formation as previously described, with some modifications²⁰. Briefly, 100 µl of Gentian violet was applied for 20 min, followed by four washes with PBS. The dye-bound biofilm was then removed using 100 µl of 95% ethanol, and optical density (OD) was measured at 630 nm for each well using a microplate reader (Maé SAS, France).

TTC reduction assay

The 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction test was performed to measure the biofilm metabolic activity as previously described with some adjustments²¹. Briefly, 200 µl of YPD broth, supplemented with TTC (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 0.05% (w/v) was added to each well and incubated at 37 °C overnight. Following incubation, the plates were rinsed three times with PBS. Subsequently, methanol (96%) was used to remove the red-colored TTC visible in the wells. the OD of the wells was measured at 490 nm.

Biofilms were divided into four categories (**Table 1**) based on the optical density cut-off value (ODc) which were determined as follows:

$$\text{ODc} = \text{average OD of negative control} + (3 \times \text{standard deviation (SD) of negative control}).$$

All tests were carried out in three replicates, and the average OD values were estimated^{22,23}.

Statistical Analysis

A statistical analysis was completed with the support of the SPSS program (version 26). Chi-square test was used to compare

percentages significantly between groups. Mann-Whitney test was used to compare differences values of biomass and the metabolic activity of biofilms between the *Candida* groups. The correlation between the CV test and the TTC test was examined using Spearman's rank correlation.

Table 1: Categories of formed biofilms.

OD values' average	Biofilm production
$OD \leq OD_C$	Lack
$OD_C \leq OD \leq 2 \times OD_C$	Weak
$2 \times OD_C \leq OD \leq 4 \times OD_C$	Moderate
$4 \times OD_C \leq OD$	Strong

RESULTS AND DISCUSSION

Results

Identification of *Candida* species from oral and vaginal isolates

In this study, 155 clinical specimens were evaluated, of which 14 were isolated from an oral swab and 141 from a vaginal swab. Most

patients in the cases of oral thrush were children, ranging in age from five months to three years. In cases of vaginal thrush, the average age of the patients was 40 years (range 19 – 64 years); women receiving therapy were spared. After culturing on sabouraud-chloramphenicol agar, 120 cultures screened positive for *Candida* (77.42%), while 35 (22.58%) of samples showed no candidal growth (**Table 2**). There was no significant difference between the positive and negative results of *Candida* strains from oral and vaginal swabs ($P > 0.05$).

Distribution of *Candida* spp. isolated from patients with oral and vaginal candidiasis

As demonstrated in **Table 3**, a variety of *Candida* species were identified in the clinical samples. Out of the 120 cultures analyzed, 102 tested positive for *C. albicans* (85%). Additionally, 18 isolates were classified as non-*albicans* yeasts, with *C. glabrata* representing 12.5% of cases, *C. dubliniensis* 1.67%, and *C. tropicalis* 0.83%.

Table 2: Positive and negative results of *Candida* species from oral and vaginal swabs.

<i>Candida</i> spp.	Oral swab no. (%)	Vaginal swab no. (%)	Total no. (%)
Positive	12 (85.71)	108 (76.60)	120 (77.42)
Negative	2 (14.29)	33 (23.40)	35 (22.58)
Total no.	14	141	155 (100)
Chi-square $-\chi^2$	0.606	0.606	-
P-value	> 0.05	> 0.05	-

Table 3: Distribution of *Candida* spp. in oral and vaginal swabs.

<i>Candida</i> spp.	Oral swab no. (%)	Vaginal swab no. (%)	Total no. (%)
<i>C. albicans</i>	12 (100)	90 (83.33)	102 (85)
<i>C. glabrata</i>	0 (0)	15 (13.89)	15 (12.5)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0)	2 (1.85)	2 (1.67)
<i>C. tropicalis</i>	0 (0)	1 (0.93)	1 (0.83)
Total no.	12 (100)	108 (100)	120 (100)

Antifungal susceptibility test

Table 4 displayed the in vitro sensitivity profiles of *Candida* spp. to fluconazole and amphotericin B. As indicated in the table, the majority of yeast isolates showed sensitivity to both antifungal agents, with fluconazole being the most effective. Out of the 120 isolates, 112 (93.3%) were sensitive to fluconazole, 4 (3.3%) showed intermediate sensitivity and 4 (3.3%) resistance. This was followed by amphotericin B, with 95 isolates (79.2%) displaying susceptibility and 25 (20.8%) exhibiting resistance.

Biofilm forming of *Candida* spp

Table 5 demonstrated the metabolic activity and biomass of biofilms formed for each species using the tetrazolium reduction and crystal violet staining methods, respectively. The biofilm biomass recorded for

C. albicans species showed a remarkable variation, with ODs ranging from 0.055 to 1.605, which is the cause of the significant standard deviation. Similar findings were noted for metabolic activity, with values ranging from 0.015 to 0.561. For both procedures, the analysis revealed significant differences between the groups ($P < 0.05$). When compared to *C. albicans*, the biofilm biomass produced by *C. glabrata*, and *C. tropicalis* was higher. *C. dubliniensis*, with a DO of 0.148, exhibited the least significant production. The metabolic activity rates varied greatly among the species, with *C. glabrata* having the highest rate with an OD of 0.141. A significant correlation was noted between the biomass of biofilm and the metabolic activity in both *C. albicans* ($r = 0.806$, $P < 0.001$) and *Candida non-albicans* strains ($r = 0.645$, $P = 0.004$).

Table 4: In vitro antifungal susceptibility of *Candida* isolates by disk diffusion method.

<i>Candida</i> strains		No.	Antifungal agents no. (%)						
			Fluconazole (25 µg)				Amphotericin B (20 µg)		
			Range (mm) ^a	S	SDD	R	Range (mm) ^a	S	R
Vaginal swab	<i>C. albicans</i>	90	14.3 – 42.7	85 (94.4)	3 (3.3)	2 (2.2)	9.0 – 22.3	70 (77.8)	20 (22.2)
	<i>C. dubliniensis</i>	2	13.3 – 26.3	1 (50)	0 (0)	1 (50)	18.7 – 19.7	2 (100)	0 (0)
	<i>C. tropicalis</i>	1	30,3	1 (100)	0 (0)	0 (0)	19,7	1 (100)	0 (0)
	<i>C. glabrata</i>	15	18.7 – 27.7	14 (93.3)	1 (6.7)	0 (0)	9.0 – 15.3	11 (73.3)	4 (26.7)
Oral swab	<i>C. albicans</i>	12	13.7 – 49.3	11 (91.7)	0 (0)	1 (8.3)	9.7 – 18.7	11 (91.7)	1 (8.3)
Total no. (%)		120	13.3 – 49.3	112 (93.3)	4 (3.3)	4 (3.3)	9.0 – 22.3	95 (79.2)	25 (20.8)
Ref. Strains	<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	28.3	-	-	-	12.0	-	-
	<i>C. albicans</i> ATCC10237	-	17.3	-	-	-	15.0	-	-

^a Diameter of zone of inhibition (mean values); R: Resistant; S: Sensible; SDD: Susceptible dose dependent.

Table 5: *Candida* spp. biofilm development as measured by the two methods of TTC reduction and CV staining; Data are based on values obtained by optical density and expressed as mean ± SD and range.

<i>Candida</i> spp.	No.	OD/Mean ± SD (range)	
		TTC assay	CV assay
<i>C. albicans</i>	102	0,106 ± 0,08 (0,015-0,561)	0,165 ± 0,19 (0,055-1,605)
<i>C. non-albicans</i>	18	0,139 ± 0,066 (0,035-0,236)	0,250 ± 0,139 (0,074-0,594)
<i>P-Value</i> ^a	-	$P = 0.023$	$P = 0.009$
<i>C. dubliniensis</i>	2	0,137 ± 0,086 (0,076-0,197)	0,148 ± 0,011 (0,140-0,155)
<i>C. tropicalis</i>	1	0,112	0,234
<i>C. glabrata</i>	15	0,141 ± 0,069 (0,035-0,236)	0,264 ± 0,185 (0,074-0,594)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	0.077 ± 0.011	0.134 ± 0.005
<i>C. albicans</i> ATCC10237	-	0.146 ± 0.030	0.165 ± 0.005

^a Comparison between groups (*Candida albicans* / *Candida non-albicans*).

Biofilm categories of *Candida* spp

Fig. 1 represented the percentage of biofilm categories generated by each species as a function of cut-off optical density values: CV staining test (lack biofilm formation (LBF) $OD \leq 0.066$, weak biofilm formation (WBF) $0.066 < OD \leq 0.133$, moderate biofilm formation (MBF) $0.133 < OD \leq 0.265$, high biofilm formation (HBF) $OD > 0.265$); and TTC reduction test (lack metabolic activity (LMA) $OD \leq 0.050$, weak metabolic activity (WMA) $0.050 < OD \leq 0.10$, moderate metabolic activity (MMA) $0.10 < OD \leq 0.201$, high metabolic activity (HMA) $OD > 0.201$). According to the CV test, 51% of *C. albicans* strains formed a weak biofilm, while the TTC method revealed that 39% of these strains showed low metabolic activity. Among *C. glabrata* strains, 33% exhibited intense biofilm formation as measured by the CV test, followed by *C. albicans* with a percentage of 11%. A moderate biofilm was observed in *C. dubliniensis* and *C. tropicalis*.

Assessment of biofilm-forming ability in resistant *Candida* strains

Table 6 illustrated the biofilm formation status among strains resistant to amphotericin B and fluconazole. Results are differentiated between *C. albicans* and non-*albicans* species. For amphotericin B-resistant *C. albicans* strains, out of a total of 21 strains, 85.7% exhibited biofilm formation, with 38.1% characterized by intense biofilm. Among non-*albicans* species, all strains resistant to amphotericin B formed biofilm, with 50% exhibiting intense biofilm. For fluconazole-resistant strains, biofilm formation was observed in 33.3% of *Candida albicans* strains, while all non-*albicans* species showed biofilm formation. Notably, intense biofilm formation was not observed within this group.

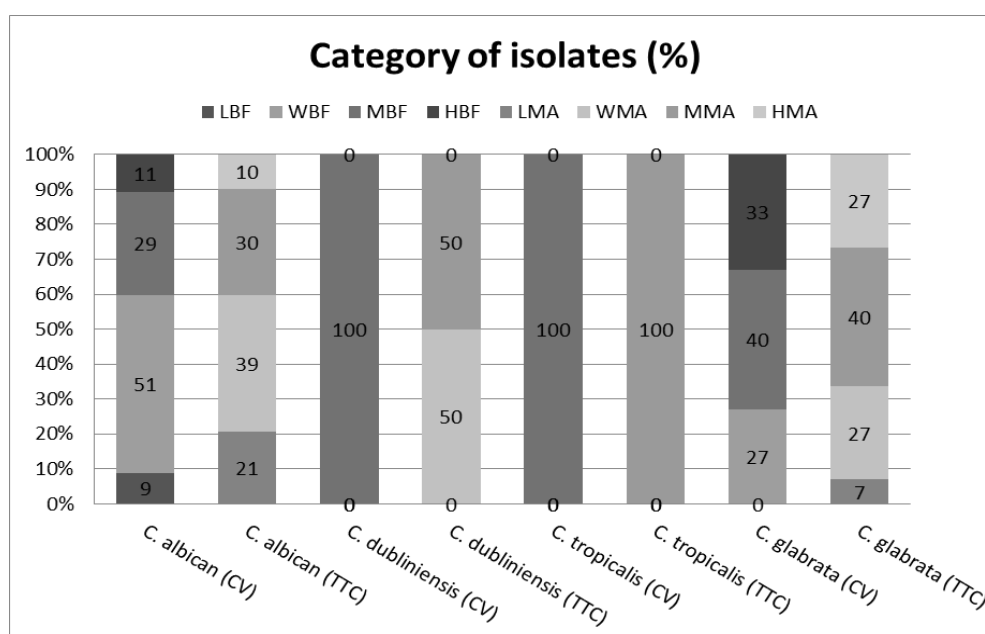


Fig. 1: Percentages of biofilm categories formed by each species as evaluated by the two methods, CV staining and TTC reduction. LBF: lack biofilm formation; WBF: weak biofilm formation; MBF: moderate biofilm formation; HBF: high biofilm formation; LMA: lack metabolic activity; WMA: weak metabolic activity; MMA: moderate metabolic activity; HMA: high metabolic activity.

Table 6: Biofilm formation status in amphotericin B and fluconazole-resistant *Candida* species.

<i>Candida</i> spp.	Number	Strains no. (%)	
		Biofilm former	Hight biofilm former
<i>C. albicans</i> AMP-R ^a	21	18 (85.7)	8 (38.1)
<i>Candida non albicans</i> AMP-R	4	4 (100)	2 (50)
<i>C. albicans</i> FLC-R ^b	3	1 (33.3)	0 (0)
<i>Candida non albicans</i> FLC-R	1	1 (100)	0 (0)

^a AMP-R: Amphotericin B-resistant.

^b FLC-R: Fluconazole-resistant.

Discussion

The objective of this study was to assess the distribution of *Candida* strains in Tiaret, Algeria, as well as their susceptibility to two antifungal agents and ability to form biofilms. In the course of our investigation, we analyzed 155 isolates obtained from patients. Based on cultural and microscopic characteristics, all *Candida* isolates exhibited robust growth on SC media after 24 to 48 h of incubation at 37 °C. Conventional methods such as the germ tube test, chlamydospore production, and sugar assimilation were employed to identify *Candida* species. In addition to these traditional tests, a chromogenic medium (CHROMagar *Candida*) was utilized. This medium is distinguished by its capacity to simplify and accelerate the identification procedure by exploiting chromogenicity to differentiate *Candida* species based on biochemical characteristics¹⁰. However, it should be noted that CHROMagar medium, although a valuable tool, may exhibit reduced reliability in identifying certain species. On this medium, pink colonies can be observed, suggesting the possibility of *C. glabrata* or *C. krusei*. Discrimination between these two species is based primarily on the formation of pseudohyphae, which are present in *C. krusei* but not in *C. glabrata*¹⁰. Similarly, differentiating *C. albicans* from *C. dubliniensis* on this medium can pose challenges, as both can yield green colonies. However, an additional distinguishing factor lies in their xylose assimilation capacity, where *C. albicans* demonstrates xylose uptake while for the most part *C. dubliniensis* does not^{15,16}.

Our findings show that *C. albicans* predominates in cases of vaginal candidiasis, accounting for 83.33% of the isolates investigated. This high prevalence of *C. albicans* is consistent with previous research

that identified this species as the most common cause of genital fungal infections^{24,25}. However, several studies in this field have reported divergent distributions of *C. albicans* prevalence compared to our findings. Notably, Hashemi et al.²⁶ identified 55.78% non-*albicans Candida*, with *C. lusitanae* being the most predominant species. while a study reported by Kalaiarasan et al.²⁷ highlighted *C. glabrata* (45.1%) as the most prevalent of *Candida* species in their findings. Indeed, in recent years, non-*albicans Candida* species have dominated the distribution of *Candida* species in the context of vaginal candidiasis. This incidence may be attributed to factors such as geography, the investigated population, and numerous clinical and physiological variables^{28,29}. In oral candidiasis, our research indicates that all isolates belong to the species *C. albicans*. Nonetheless, the natural diversity within this species, as well as the possibility of other species present in the oral cavity, highlight the need for a more comprehensive approach with larger samples to validate and extend our conclusions. Our findings align with those of several other studies, including the work by Mohammed et al.¹³ who reported a prevalence of 47%, and Mohamadi et al.³⁰ who identified *C. albicans* at a rate of 64.4%.

In our investigation, we conducted in-vitro susceptibility testing of isolated strains to two antifungal agents. Fluconazole showed higher efficacy, with a susceptibility rate of 93.3%, followed by amphotericin B at 79.2%. Comparatively, the study by Tulasidas et al.³¹ found that among species isolated from patients with vulvovaginal candidiasis, 79.1% showed susceptibility to fluconazole. Similarly, ElFeky et al.¹⁸, observed a susceptibility rate of 77.8% for strains to this antifungal, while 98.4% of isolates were susceptible to amphotericin B. Furthermore, in the investigation by Marak &

Dhanashree ⁹, all tested *Candida* isolates exhibited susceptibility to amphotericin B.

The biofilm-forming ability of clinical *Candida* strains was investigated in this study. Various methods have been employed by researchers to investigate in vitro biofilm formation, with crystal violet standing out as one of the most common techniques for determining the total biomass of the biofilm. However, due to the non-specific character of this method, a supplementary approach based on the measure of metabolic activity should be explored. Many researchers have used reducing tetrazolium salts, to assess the biofilm-forming capacity in bacteria^{21,32,33} and in fungal species^{3,34,35}. In This investigation, quantification of biofilm using crystal violet staining revealed that the total biofilm biomass of *C. albicans* was comparatively low relative to *Candida* non *albicans* species. These findings are consistent with those reported by Muadcheingka & Tantivitayakul ³. Conversely, Ferreira et al. ³⁶ found no difference in biofilm production between the two groups. Among non-*albicans* *Candida* strains, *C. glabrata* exhibited the highest biofilm-producing capacity, with 33% of strains producing intense biofilm. This result contrasts with those of Tulasidas et al. ³¹ and Sahal & Bilkay ⁷, who reported significant biofilm formation in *C. tropicalis*, identified as the most intense biofilm-forming species. In another study conducted by Pathak et al. ³⁷ and Silva et al. ³⁸, it was reported that *C. glabrata* exhibits a strong ability to form biofilms on acrylic surfaces and silicone, respectively. These findings support the theory of several researchers that biofilm production does not depend on hyphal morphology, as *C. glabrata* is exclusively composed of blastospores and lacks hyphae ³⁹.

In this study, TTC salt reduction was utilized for the measurement of metabolic activity. A correlation was observed between this method and crystal violet staining, indicating higher metabolic activity in non-*albicans* *Candida* species. Approximately 27% of *C. glabrata* strains exhibited intense metabolic activity, followed by *C. albicans* at 10%. Consistently, Sánchez-Vargas et al. ⁴⁰ and Marcos-Zambrano et al. ³⁴ similarly identified *C. glabrata* as having the highest metabolic activity. Conversely, Tulasidas et al. ³¹ observed higher metabolic activity in *C.*

tropicalis. An intriguing observation pertained to *C. tropicalis*, which exhibited a significant biofilm biomass but relatively low metabolic activity. Similarly, Marcos-Zambrano et al. ³⁴ reported a comparable finding, suggesting that this might be explained by the biofilm of this species' dense extracellular matrix, which might obstruct the flow of nutrients and oxygen. Our results demonstrated that this approach was suitable for detecting biofilms of *Candida* species, enabling visual detection through the formation of a red formazan precipitate whose intensity is correlated with the concentration of viable fungi ³². Several studies, notably those by Sabaeifard et al. ²¹ and Attaran & Falsafi ⁴¹, have shown the effectiveness of TTC in evaluating biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Helicobacter pylori*, respectively. However, a study conducted by Brown et al. ⁴² demonstrated the inefficacy of TTC staining on *Campylobacter jejuni*.

Metabolic activity emerges as a key indicator of pathogenicity, given its frequent association with the expression of virulence factors and resistance to antifungal agents³⁶. Tumbarello et al. ⁴³ highlighted the substantial clinical impact of biofilm production, revealing higher mortality rates among patients infected by biofilm-forming strains compared to those infected by non-biofilm-forming strains, in addition to the greater time and cost of therapy. This finding aligns with the results of our investigation, where the majority of antifungal-resistant strains were found to be biofilm-forming. Similarly, Tulasidas et al. ³¹ noted a greater degree of resistance to fluconazole among biofilm-producing strains compared to non-producers.

Conclusion

This study revealed that *C. albicans* was the most frequently encountered species, followed by *C. glabrata*. Fluconazole exhibited superior efficacy compared to amphotericin B in terms of antifungal susceptibility. Moreover, our assessment of the biofilm-forming ability of clinical *Candida* strains, using CV staining and the TTC salt reduction test, showed significant variations, with *C. glabrata* displaying the highest capacity of biofilm production. Additionally, we noted a correlation between metabolic activity and

biofilm biomass across the strains. These findings demonstrate the clinical significance of biofilms in *Candida* infections and emphasize the imperative for further investigation to advance therapeutic approaches and detection methodologies, particularly for strains capable of generating biofilms.

Ethical Approval

For this study, an ethics committee's approval was not necessary since a hospital provided the clinical samples. In addition, this study was validated by the scientific committee of the Faculty of Life and Nature Sciences, Mustapha Stambouli University, Mascara, Algeria.

Acknowledgements

This research project was supported by the Faculty of Natural and Life Sciences, Mustapha Stambouli University, Mascara, Algeria.

REFERENCES

1. P.Czechowicz, J. Nowicka and G.Gościński, "Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis", *Int J Mol Sci*, 23(22), 1-21 (2022).
2. Y. Lee, E. Puumala, N. Robbins and L. E. Cowen, "Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond", *Chem Rev*, 121(6), 3390–3411 (2021).
3. T. Muadcheingka and P.Tantivitayakul, "Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities", *Arch Oral Biol*, 60(6), 894–901 (2015).
4. J. Fang, B. Huang and Z.Ding, "Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis", *J Prosthet Dent*, 125(2), 257–265 (2021).
5. S. Y. Lu, "Oral candidosis: Pathophysiology and best practice for diagnosis, classification, and successful management", *J Fungi*, 7(7), 555 (2021).
6. C. Cid-Chevecich, A. Müller-Sepúlveda, J. A. Jara, *et al.*, "Origanum vulgare L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* spp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin in vitro", *BMC Complement Med Ther*, 22(1), 1–14 (2022).
7. G. Sahal and I. S. Bilkay, "Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates", *Rev Soc Bras Med Trop*, 51(5), 644–650 (2018).
8. M.Proškovcová, E. Čonková, P.Váczi, M.Harčárová and Z.Malinovská, "Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the lamiaceae family against *Candida albicans* clinical isolates", *Ann Agric Environ Med*, 28(2), 260–266 (2021).
9. M. B. Marak and B. Dhanashree, "Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. Isolated from clinical samples", *Int J Microbiol*, 2018, 6–11 (2018).
10. M. S. Alhussaini, "Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida* Species in Urine Samples from Renal Failure Patients", *Sci J Clin Med*, 2(1), 14 (2013).
11. S. A. Marinho, A. B. Teixeira, O. S. Santos, *et al.*, "Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR", *Brazilian J Microbiol*, 41(2), 286–294 (2010).
12. J. W. Landau, N. Dabrowa and V. D. Newcomer, "The Rapid Formation in Serum of Filaments By *Candida Albicans*", *J Invest Dermatol*, 44, 171–179 (1965).
13. A. N.Mohammed, J. N. Abdulbaqi and A. H. Ajah, "Epidemiological Study of *Candida* Species among Vaginal and Oral Candidiasis from different clinical states", *Int J ChemTech Res*, 10(5), 844–857 (2017).
14. K. H. Neppelenbroek, R. S. Seó, V. M.Urban, *et al.*, "Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques", *Oral Dis*, 20(4), 329–344 (2014).
15. M. Khlif, A.Sellami, H. Sellami, F. Makni

- and A. Ayadi, "Candida dubliniensis: méthodes d'identification et implications épidémiologiques", *Pathol Biol*, 59, 166–172 (2011).
16. Z. Khan, S. Ahmad, R.Chandy and L.Joseph, "A simple xylose-based agar medium for the differentiation of Candida dubliniensis and Candida albicans", *Diagn Microbiol Infect Dis*, 72(1), 285–287 (2012).
 17. D. J. Sheehan, *et al.*, "Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline", *NCCLS Document MA44-A. N*, 24, (2004).
 18. D. S.ElFeky, N. M.Gohar, E. A.El-Seidi, M. M. Ezzat and S. H. AboElew, "Species identification and antifungal susceptibility pattern of Candida isolates in cases of vulvovaginal candidiasis", *Alexandria J Med*, 52(3), 269–277 (2016).
 19. G. Ramage and B. L.Wickes, "Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms", *Antimicrob Agents Chemother*, 45(9), 2475–2479 (2001).
 20. G. A. O'Toole, "Microtiter dish Biofilm formation assay", *J Vis Exp*, 30,(47) 2437 (2011).
 21. P. Sabaeifard, A. Abdi-Ali, M. R. Soudi and R. Dinarvand, "Optimization of tetrazolium salt assay for Pseudomonas aeruginosa biofilm using microtiter plate method", *J Microbiol Methods*, 105, 134–140 (2014).
 22. S. Stepanović, D.Vuković, I. Dakić, B.Savić and M.Švabić-Vlahović, "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation", *J Microbiol Methods*, 40(2), 175–179 (2000).
 23. H. Turan and M.Demirbilek, "Biofilm-forming capacity of blood-borne Candida albicans strains and effects of antifungal agents", *Rev Argent Microbiol*, 50(1), 62–69 (2018).
 24. L. S. A. Gunther, H. P. R. Martins, F. Gimenes, *et al.*, "Prevalência de candida albicans e não albicans isoladas de secreção vaginal: Avaliação comparativa entre colonização, candidíase vaginal e candidíase vaginal recorrente em mulheres diabéticas e não diabéticas", *Sao Paulo Med J*, 132(2), 116–120 (2014).
 25. B.Jamil, M.T.M. Bokhari, A. Saeed *et al.*, "Candidiasis: Prevalence and resistance profiling in a tertiary care hospital of Pakistan", *J Pak Med Assoc*, 67(5), 688–692 (2017).
 26. S. E. Hashemi, T. Shokohi, M. Abastabar *et al.*, "Species distribution and susceptibility profiles of Candida species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of C. Lusitaniae", *Curr Med Mycol*, 5(4), 26–34 (2019).
 27. K. Kalaiarasan, R. Singh and L.Chaturvedula, "Fungal profile of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital", *J Clin Diagnostic Res*, 11(3), DC06–DC09 (2017).
 28. N.Ghaddar, E. Anastasiadis, R. Halimeh *et al.*, "Prevalence and antifungal susceptibility of Candida albicans causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon", *BMC Infect Dis*, 20(1), 1–9 (2020).
 29. B. A. Fanou, D.Natitingou and U.Nationale, "vulvovaginales chez les femmes admises en consultation à l ' Hôpital de Zone de Mènonin (Bénin), *Pan Afr Med J*, 42, 215 (2022).
 30. J. Mohamadi, M. Motaghi, J. Panahi, *et al.*, "Anti-fungal resistance in candida isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates", *Bioinformation*, 10(11), 667–670 (2014).
 31. S.Tulasidas, P. Rao, S. Bhat and R.Manipura, "A study on biofilm production and antifungal drug resistance among Candida species from vulvovaginal and bloodstream infections", *Infect Drug Resist*, 11, 2443–2448 (2018).
 32. M. Oleksy-Wawrzyniak, A. Junka, M. Brożyna, *et al.*, "The In Vitro Ability of Klebsiella pneumoniae to Form Biofilm and the Potential of Various Compounds to Eradicate It from Urinary Catheters", *Pathogens*, 11(1), 42 (2022).
 33. Y. M. Song, *et al.*, "In Vitro Evaluation of the Antibacterial Properties of Tea Tree Oil on Planktonic and Biofilm-Forming Streptococcus mutans", *AAPS PharmSciTech*, 21(6), 1–12 (2020).

34. L. J. Marcos-Zambrano, P. Escribano, E. Bouza and J. Guinea, "Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points", *Int J Med Microbiol*, 304(8), 1192–1198 (2014).
35. Z. M. Thein, Y. H. Samaranayake and L. P. Samaranayake, "In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions", *Arch Oral Biol*, 52(8), 761–767 (2007).
36. A. V. Ferreira, C. G. Prado, R. R. Carvalho, K. S. T. Dias and A. L. T. Dias, "*Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections", *Mycopathologia*, 175 (3-4), 265–272 (2013).
37. A. K. Pathak, S. Sharma and P. Shrivastva, "Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate", *J Appl Oral Sci*, 20(1), 70–75 (2012).
38. S. Silva, M. Negri M. Henriques, *et al.*, "Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine", *J Med Microbiol*, 59(Pt 7), 747–754 (2010).
39. C. J. Seneviratne, W. J. Silva, L. J. Jin, Y. H. Samaranayake and L. P. Samaranayake, "Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms", *Arch Oral Biol*, 54(11), 1052–1060 (2009).
40. L. O. Sánchez-Vargas, D. Estrada-Barraza, A. J. Pozos-Guillen and R. Rivas-Caceres, "Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species", *Arch Oral Biol*, 58, 1318–1326 (2013).
41. B. Attaran, and T. Falsafi, "Identification of factors associated with biofilm formation ability in the clinical isolates of *Helicobacter pylori*", *Iran J Biotechnol*, 15(1), 58–66 (2017).
42. H. L. Brown, A. H. M. van Vliet, R. P. Betts and M. Reuter, "Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model", *J Appl Microbiol*, 115(5), 1212–1221 (2013).
43. M. Tumbarello, B. Fiori, E. M. Trecarichi, *et al.*, "Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital", *PLoS One*, 7(3), 1–9 (2012).



نشرة العلوم الصيدلانية جامعة أسيوط



القابلية المضادة للفطريات والتحليل المقارن لإنتاج الأغشية الحيوية والنشاط الأيضي في الكانديدا المعزولة من العينات السريرية

أمل بن مسهود^{١*} – وسيم يزلي^٢ – محمد واسيني بن سعيد^٣ – سيد أحمد سعدي^٤ –
سميرة ناير^٥

^١مختبر البحث في البيئة الجغرافية والتنمية المكانية (LGEDE)، جامعة معسكر، ص.ب ٧٦٣، ٢٩٠٠٠ معسكر، الجزائر

^٢مختبر الأحياء الدقيقة التطبيقية، قسم الأحياء، كلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة وهران ١ أحمد بن بلة، وهران، الجزائر

^٣كلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة ابن خلدون، ص.ب ٧٨، ١٤٠٠٠ تيارت، الجزائر

^٤مختبر تطوير وتوصيف المواد، كلية التكنولوجيا، جيلالي، جامعة سيدي بلعباس، ص.ب ٨٩، ٢٢٠٠٠ سيدي بلعباس، الجزائر

^٥مختبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية (LBSM)، المدرسة العليا للأساتذة بكوبا، ص.ب ٩٢، ١٦٠٥٠ القبة، الجزائر

^٦كلية SNV، قسم الأحياء، جامعة مصطفى السطمبولي، معسكر، الجزائر

تُعرف Candida بأنها خميرة متعايشة في قنوات الفم والمهبل ويمكن أن تسبب مجموعة من الأمراض الانتهازية. قدرتها على تكوين البيوفيلم هي ما يكمن وراء العدوى ومن بين المسبب الرئيسي لها. هذه الدراسة تهدف إلى استكشاف القدرة على تكوين البيوفيلم والحساسية للأدوية المضادة للفطريات لعزلات Candida. تم جمع العينات من المواقع المهبلية والفموية وتم تحديدها باستخدام اختبارات النمط الظاهري مثل CHROMagar، و carbohydrate assimilation. تم تقدير الكتلة الحيوية الكلية للبيوفيلم والنشاط الأيضي باستخدام طريقة التلوين بالـ crystal violet واختزال ملح tetrazolium على التوالي. من بين ١٢٠ نوعاً من Candida المعزولة، تنصدر سلالة كان (85% C. albicans)، تليها بنسبة أقل C. glabrata (12.5%)، C. dubliniensis (1.66%)، و C. tropicalis (0.83%). أظهرت غالبية العزلات حساسية عالية تجاه (93.3% fluconazole)، يليه amphotericin B (٧٩.٢%). لوحظ وجود ترابط كبير بين الكتلة الحيوية للبيوفيلم والنشاط الأيضي، حيث أظهرت سلالات non-albicans Candida تكويناً أعلى للافغشية الحيوية، تليها سلالات Candida albicans. تؤكد هذه النتائج أهمية مراعاة هذه العوامل عند التعامل مع عدوى Candida.