

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Aboubekr Belkaïd -TLEMCEEN-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de
l'Univers



Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Option :

Biochimie Appliquée

Thème :

**Contribution à l'étude de l'effet inhibiteur de l'huile
essentielle et de l'hydrolat de la cannelle de Chine
(*Cinnamomum cassia*) vis-à-vis des biofilms de
*Candida albicans***

Présenté par : Mlle BENGHENIMA Samia

Soutenu le : 12/07/2017

Devant le jury composé de :

Mme Boucherit - Otmani Z.	Professeur	Présidente
Mme kazi Tani-Baba Ahmed Z.Z.	M. C. B	Examinatrice
Mme Bouhafsi - Merghache D.	M. C. B	Promotrice

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique », Département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

Au début j'adresse par mes remerciement à ALLAH de m'avoir aidé pour accomplir ce présent travail.

J'exprime mes plus sincères remerciements à Madame Bouhafsi-Merghache D., maitre de conférences classe B au département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd- Tlemcen, pour l'honneur d'avoir proposé ce thème, pour m'avoir aidé par ses connaissances et ses précieux conseils.

Je remercie particulièrement Madame Boucherit-Otmani Z., Professeur au département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd- Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame kazi Tani-Baba Ahmed Z.Z., maitre de conférences classe B au département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd- Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également, vivement monsieur Seddiki S.M.L., Maitre de conférences classe A au Centre universitaire de Naâma, pour son aide, sa contribution ainsi que ses idées constructives.

Je suis infiniment reconnaissante à monsieur Chikhi I., maitre de conférences classe B au centre universitaire Belhadj Bouchaib- Ain Témouchent, pour sa contribution.

Je tiens particulièrement à remercier toute mes parent qu'ils n'ont pas hésité d'offrir toutes les possibilités quel que soit ses natures et dans toutes les conditions, pour m'avoir encouragé et conseillé.

Je dois remercier tous les membres de ma famille pour leur soutien.

Je remercie sincèrement à tous mes amies.

Et enfin un remerciement général à tous mes collègu(e)s de promotion biochimie appliquée.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire,

- ✓ *À Mes très chers parents qui m'ont soutenue et encouragé durant toute la période de mes études.*

 - ✓ *À mes sœurs et frères. Pour votre soutien moral et vos encouragements.*

 - ✓ *À toutes mes amies qui ont partagé avec moi tous les moments de joie et de bonheur.*
-

Summary

Our study focused on the evaluation of the antifungal activity of essential oil and the hydrosol from the bark of Chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*) against three reference strains of *Candida albicans* by determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Sessile Minimum Inhibitory Concentration (SMIC). The obtained results showed that the essential oil exhibited a good antifungal effect against *Candida albicans* strains with the MIC that range from 0.19 μ g/mL to 6.10 μ g/mL and the SMIC of 9.37x10³ μ g/mL. On the other hand, the hydrosol revealed a weak antifungal activity against these same strains with MIC varying between 1.56 x10³ μ g/mL and 12.5 x10³ μ g/mL and SCMI higher than 400 x10³ μ g/mL.

Keywords: *Cinnamomum cassia*, essential oil, hydrosol, *Candida albicans*, biofilms, antifungal activity.

ترتكز دراستنا علي تقييم نشاط مضاد للفطريات للزيت الأساسي و المياه العطرية للحاء نبتة قرفة الصين (*Cinnamomum cassia*) ضد ثلاث سلالات من نوع *Candida albicans* عن طريق تحديد اقل التراكيز المثبطة (CMI) واقل التراكيز المثبطة للأغشية الحيوية (SCMI) . النتائج المتحصل عليها أظهرت أن هته الزيت لها تأثير مثبت فعال نظرا لأقل التراكيز المتحصل عليها و أللتى تتراوح من 0,19 إلى 6,10 µg/ml و $12,5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ في حالة الأغشية الحيوية. من الناحية الاخرى , المياه المعطر أظهرت فعالية مثبطة منخفضة ضد نفس السلالات السابقة , حيث بلغت قيمة اقل التراكيز المثبطة 1,56 إلى غاية $12,5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ واقل التراكيز المثبطة للأغشية الحيوية التي تتجاوز قيمتها $400 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$.

الكلمات الأساسية: *Cinnamomum cassia*, الزيت الأساسي, الماء المعطر, *Candida albicans*, الأغشية الحيوية, مضاد للفطريات.

Résumé

Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) vis-à-vis de trois souches de référence de *Candida albicans* par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI). Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle présente un bon effet antifongique vis-à-vis des souches de *Candida albicans*, avec des CMI qui vont de 0,19 µg/mL à 6,10 µg/mL et des SCMI de $9,37 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$. En revanche, l'hydrolat a révélé une faible activité antifongique vis-à-vis de ces mêmes souches avec des CMI qui varient entre $1,56 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ et $12,5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ et des SCMI qui dépasser les $400 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$.

Mots clés : *Cinnamomum cassia*, huile essentielle, hydrolat, *Candida albicans*, biofilms, activité antifongique.

Table des matières

Première partie	: Synthèse bibliographique.....	1
Deuxième partie	: Matériel et méthodes.....	9
1.	Matériel.....	10
1.1.	Matériel végétal.....	10
1.2.	Matériel biologique	10
2.	Méthodes.....	11
2.1.	Extraction de l'huile essentielle.....	11
2.2.	Préparation des antifongiques.....	12
2.3.	Evaluation des activités antifongiques vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles.....	12
2.3.1.	Préparation de l'inoculum.....	12
2.3.2.	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	13
2.3.3.	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI)	13
a.	Développement des biofilms	13
b.	Tests antifongiques.....	14
Troisième partie	: Résultats et discussion.....	15
1.	Résultats.....	16
1.1.	Rendement en huile essentielle (Rdt _{HE}).....	16
1.1.	Evaluation des activités antifongiques vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles	16
1.1.1.	Détermination des CMI.....	16
1.1.1.	Détermination des SCMI.....	17
2.	Discussion	18
Quatrième partie	: Conclusion générale	21
Cinquième partie	: Références bibliographiques.....	23

Liste des abréviations

- RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium.
- ATCC : American Type Culture Collection.
- IP : Institut Pasteur.
- Na₂SO₄ : Sulfate de sodium anhydre.
- DMSO : Diméthylsulfoxyde.
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.
- SCMI : Sessile Concentration Minimale Inhibitrice.
- PBS : Phosphate buffer saline.
- CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute.
-

Première partie
Synthèse bibliographique

Candida albicans est une levure microscopique commensale de la flore humaine. Elle est retrouvée dans les muqueuses digestives, génitales et sur la peau de personnes saines. Cette levure qui mesure entre 3 et 15µm, se multiplie par bourgeonnement et forme des colonies blanches crémeuses. Elle est également capable d'alterner entre quatre formes distinctes : levure (blastospores), hyphe, pseudohyphe et chlamydospore (**figure N°1**) [(Berman, 2006) ; (Whiteway et Bachewich, 2007)].

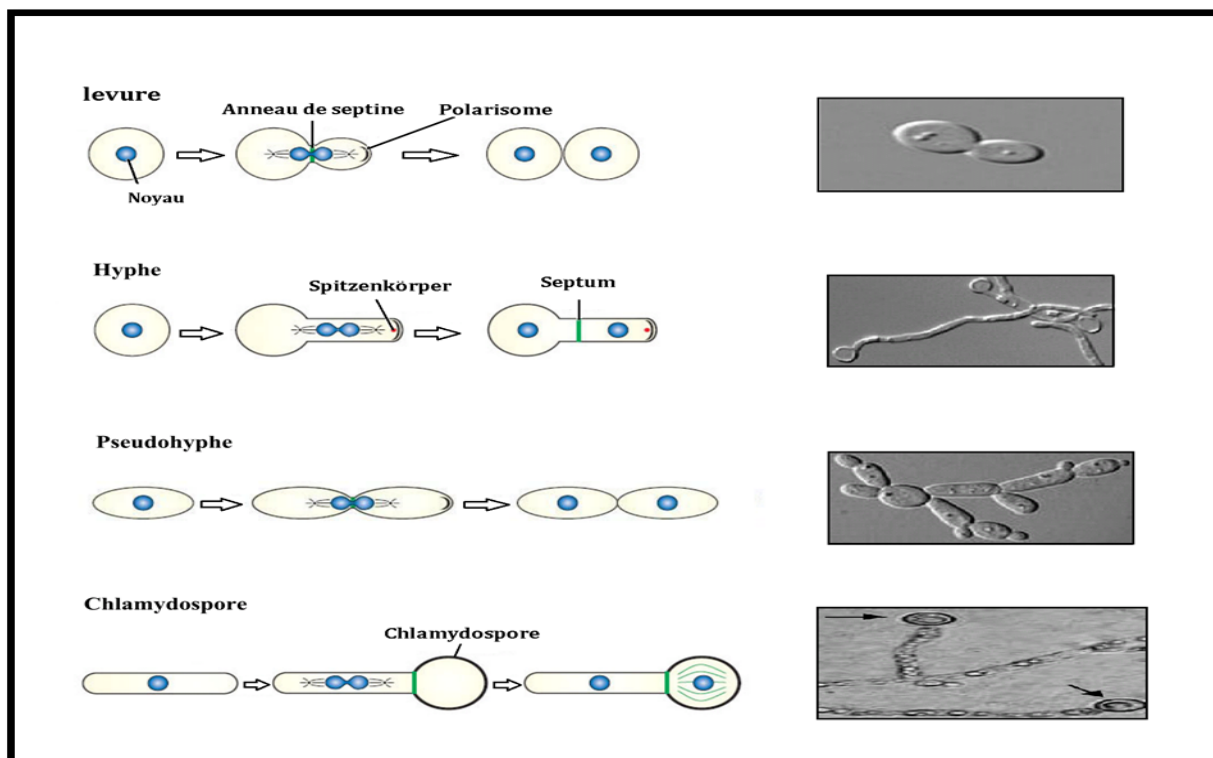


Figure N°1: Différentes formes morphologiques de *Candida albicans* [(Berman, 2006) ; (Whiteway et Bachewich, 2007)].

Sous certaines conditions environnementales, *Candida albicans* devient pathogène et provoque des infections superficielles généralement sans gravité telles que les candidoses cutanées et vaginales (Develoux et Bretagne, 2005).

En revanche, chez les patients présentant un déficit immunitaire (le cancer, le sida, ...) et chez les malades sous antibiothérapies, *Candida albicans* se transforme en un véritable pathogène et peut provoquer des infections systémiques plus graves comme les candidémies. Ces infections impliquent souvent le développement des biofilms (Anane et Khalfallah, 2006).

Le biofilm de *Candida albicans* est généralement formé d'un réseau dense de levures qui comprend les quatre formes, levure, hyphe, pseudohyphe et chlamydospore au sein du même biofilm, recouvert d'une matrice extracellulaire formant une structure tridimensionnelle (**figure N°2**). Cet arrangement spatial optimal facilite le flux de nutriments et l'élimination des métabolites toxiques hors de la communauté levurienne (**Grinand, 2012**).

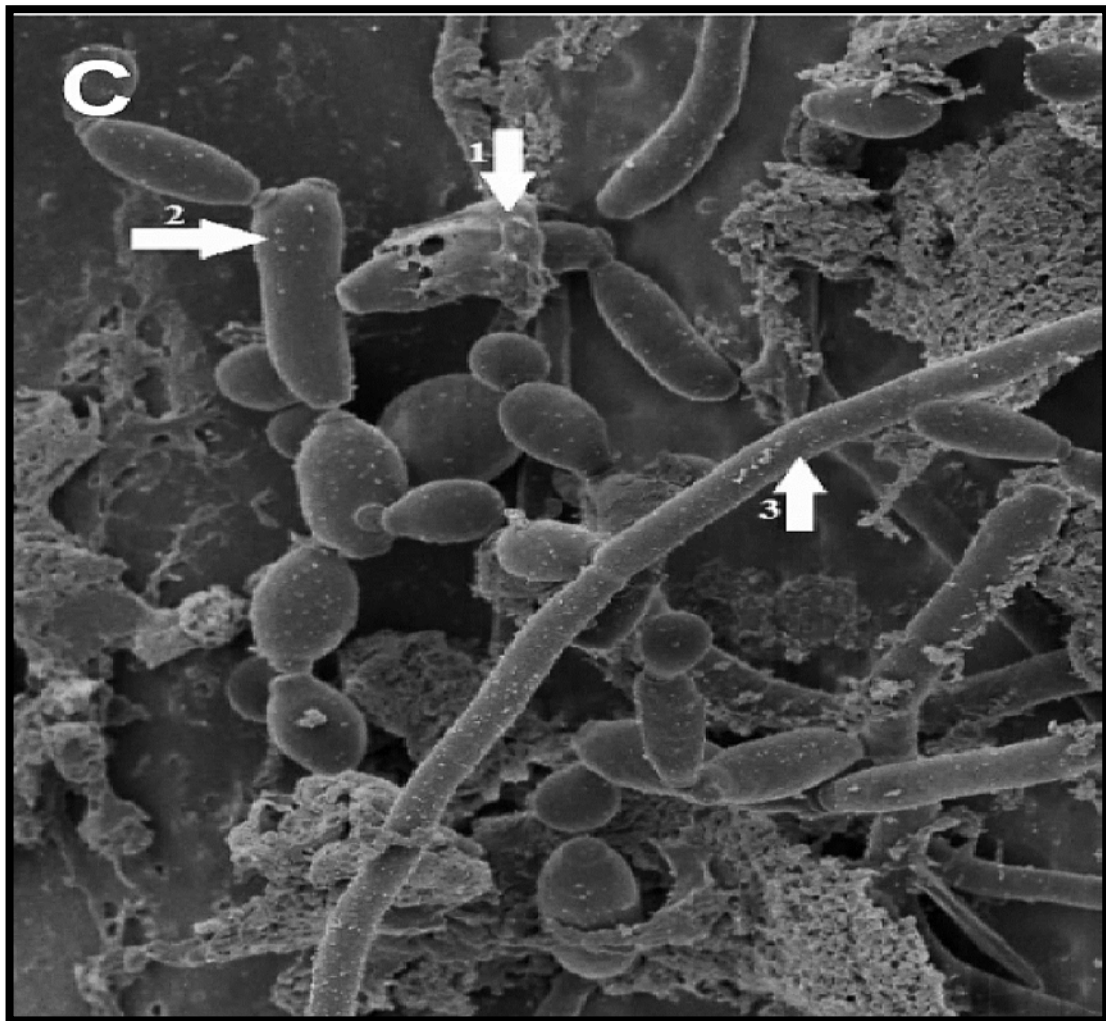


Figure N°2: Imagerie électronique d'un biofilm de *Candida albicans* développé sur la surface intérieure d'un cathéter veineux central. Grossissement x 4500
Flèche 1 : Matrice extracellulaire. Flèche 2 : Pseudohyphe. Flèche 3 : Hyphe
(**Seddiki et coll., 2013**).

Le développement d'un biofilm de *Candida albicans* commence par l'adhésion de cette levure aux cellules de l'hôte via des molécules appelées adhésines, se poursuit par sa multiplication qui sert à former des microcolonies, constituant donc la couche basale du biofilm. La croissance de ce dernier se poursuit par la production de pseudohyphe et d'hyphe, et d'une matrice extracellulaire composée essentiellement de polysaccharides et de protéines. L'épaisseur du biofilm *in vitro* atteint jusqu'à 450µm après la maturation **(Chandra et coll., 2001)**.

Ces biofilms sont 30 à 2 000 fois plus résistants aux traitements antifongiques **(Douglas, 2003)**. Deux principales hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce phénomène.

La première, selon laquelle, la matrice extracellulaire empêche l'accès des agents antifongiques aux levures en croissance **(Baillie et Douglas, 2000)**.

La seconde, repose sur le mécanisme de surexpression des protéines d'efflux ce qui provoque une diminution de la concentration intracellulaire en antifongiques **(Ramage et coll., 2002)**.

Les antifongiques sont des molécules capables de détruire ou de réduire la prolifération des différents champignons impliqués en mycologie médicale. Contrairement à la grande gamme d'antibiotiques-antibactériennes, le nombre d'antifongiques disponibles reste limité. En effet, il n'existe à ce jour que quatre classes d'antifongiques utilisés en thérapie :

- Les polyènes qui sont représentés essentiellement par l'amphotéricine B, agissent en se fixant sur l'ergostérol, ce qui conduit à la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule fongique.
- Les dérivés azolés tels que le fluconazole, agissent par inhibition de la synthèse de l'ergostérol.
- Les dérivés pyrimidiques agissent comme inhibiteur de la biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou encore de l'acide ribonucléique messager (ARNm).
- Les échinocandines inhibent la synthèse du 1-3-bêta-D-glucane et empêchent la formation de la paroi fongique **[(Granier, 2003) ; (Carle et Pharm, 2003)]**.

L'utilisation accrue de ces derniers favorise l'émergence de souches résistantes et peut également engendrer certains effets indésirables particulièrement significatifs

en clinique. Ce sont de réels facteurs limitant les choix thérapeutiques, dont les plus fréquents sont des effets endocriniens, gastro-intestinaux, hématologiques, hépatiques, rénaux, respiratoires, musculo-squelettiques et cardiovasculaires **(Hochart et coll., 2008)**.

Face à ces problèmes, une alternative ancienne mais qui demeure valable consiste à l'usage des différentes parties des plantes médicinales (les racines, les feuilles, les graines, les écorces, les fruits ou les fleurs). Les plantes exercent leurs effets curatifs grâce à leurs extraits naturels y compris les huiles essentielles **(Bruneton, 2009)**.

Par définition, les huiles essentielles sont des extraits des plantes aromatiques. Il s'agit des mélanges de composés volatiles et souvent lipophiles. Ces huiles sont synthétisées et stockées dans certains tissus végétaux spécialisés et sont obtenues par hydrodistillation **(Lardry et Haberkorn, 2007)**.

Plus de 300 constituants ont été isolés à partir des huiles essentielles **(Couic-Marinier et Lobstein, 2013)**, la plupart d'entre eux sont :

- Les composés terpéniques, formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30). Ces composés ont tous la même origine métabolique.
- Les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane et des esters d'acides carboxyliques en faible quantité.

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques notamment, antioxydantes, antivenimeuses, antibactériennes et antifongiques.

Ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques **[(De Billerbeck, 2007) ; (Amarti et coll., 2010) ; (Laghouiter et coll., 2015)]**.

Le spectre d'action antifongique des huiles essentielles est très étendu, car elles agissent sur une large gamme de champignons. En outre, ces activités sont variables selon la composition des huiles essentielles et des souches fongiques **(Zhiri, 2006)**.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* exerce des propriétés inhibitrices vis-à-vis de plusieurs souches fongiques du genre *Candida*, notamment, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* et *Candida dubliniensis* (El masouri, 2013).

En effet, une étude effectuée par Minooeianhaghighi et ses collaborateurs (2016) a montré les activités antifongiques des huiles essentielles de *Lavandula binaludensis* et du *Cuminum cyminum*. Ces essences sont des inhibiteurs naturels pour contrôler la croissance des principales espèces de *Candida* pathogènes responsables des candidoses vulvo-vaginales récidivantes.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de la cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*) a été étudiée par Senhaji et ses collaborateurs (2006). Cette essence a montrée un effet fongicide à une concentration de 0,05% après un contact de 15 minutes avec les cellules fongiques.

Cinnamomum Cassia appelée aussi *Cinnamomum aromaticum*, est originaire du Sud-est de la Chine où elle est fortement cultivée, elle est aussi présente au Vietnam et au Laos. Cette espèce qui appartient à la famille des lauracées (Lauraceae) et appelée en arabe *El Kerfa* (القرفة), est communément nommée cannelier de Chine, casse, cannelier casse, cassia et fausse cannelle (Ebrhard teuscher et coll., 2005).

C'est un arbre d'odeur agréable qui peuvent atteindre 20m de haut avec des feuilles ovales, opposées et grandes de 12 à 20 cm de long. Les fleurs sont de couleur blanche ou jaune (figure N°3) (Huguette, 2008).

L'écorce de cet arbre est récoltée durant la saison des pluies entre les mois de mai et octobre au moment même où les branches atteignent environ deux mètres de long et deux centimètres de diamètre. Après la récolte, seule la partie interne de l'écorce appelée « liber » est conservée et découpée en tronçons. Ces segments sont mis à sécher au soleil et c'est pendant le séchage que l'écorce s'enroule sur elle-même pour former les bâtonnets de cannelle (figure N 3). Ce mot vient d'ailleurs du latin canna, qui signifie "roseau" (Lallemand et coll., 2000).



Figure N°3: Les différentes parties du cannelier de Chine (*Cinnamomum cassia*)

A : Arbre, B : Les feuilles et les fleurs, C : Ecorce.

(Ravindran et coll., 2004).

La cannelle de Chine est une épice médicinale extrêmement puissante. Elle a été utilisée depuis 5000 ans par les deux anciennes médecines, la médecine ayurvédique d'Inde et la médecine traditionnelle chinoise, pour ses propriétés curatives de certains troubles digestifs, inflammations, maux de tête, pyrexie, nausée, anorexie et du rhume. Elle possède également des vertus aromatiques et stimulantes respiratoires, nerveuses et immunitaires **(Auteroche, 1993)**.

Cette épice est souvent utilisée pour son huile essentielle, constituée essentiellement en :

- Cinnamaldéhyde (80 à 95%).
- O-méthoxycinnamaldéhyde (jusqu'à 1%).
- Alcool et l'acide cinnamique **(Wang et coll., 2008)**.

Grâce à sa richesse en cinnamaldéhyde, cette huile possède des effets antioxydants, anti-inflammatoires et également antimicrobiens très élevés. Son action est efficace contre les bactéries, les virus, les champignons et sur les parasites [(Shan et coll., 2005) ; (Chaudhry et Perween, 2006) ; (Kocevski et coll., 2013)].

Dans ce contexte, un axe de recherche est développé au laboratoire de recherche Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen. Ce dernier a pour objectif, l'évaluation des effets inhibiteurs des molécules naturelles et d'autres issues de la synthèse chimiques vis-à-vis des différentes souches appartenant au genre *Candida*.

Notre travail s'inscrit dans cette optique et consiste à étudier l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) vis-à-vis des biofilms fongiques produits par trois souches de référence de *Candida albicans*.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

La partie expérimentale de ce travail est réalisée au niveau du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique », Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd- Tlemcen.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

L'étude est menée sur une espèce végétale, largement utilisée dans notre alimentation, la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*). L'écorce de cette dernière servira comme matière première pour l'extraction de l'huile essentielle.



Photo N°1 : Les bâtonnets de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*).

1.2. Matériel biologique

Les tests antifongiques sont effectués sur trois souches de référence appartenant à l'espèce *Candida albicans*. Il s'agit de *Candida albicans* ATCC10231, *Candida albicans* ATCC26790 et *Candida albicans* 444IP.

2. Méthodes

2.1. Extraction de l'huile essentielle

L'obtention de l'huile essentielle à partir de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) est réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un Clevenger (photo N°2), selon la technique recommandée par la pharmacopée européenne (European-Pharmacopoeia, 2005).

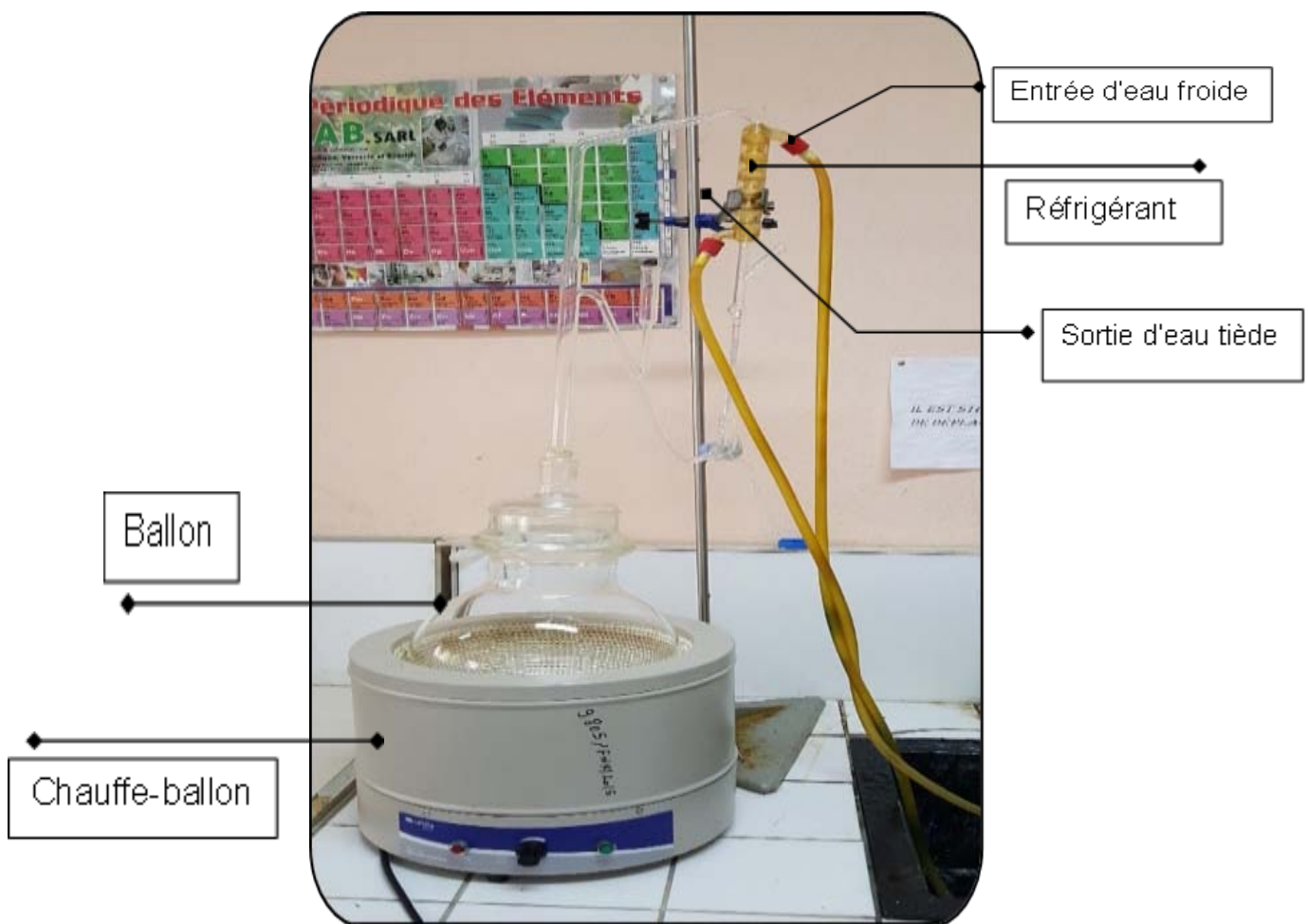


Photo N°2 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.

Le rendement en huile exprimé en pourcentage est calculé selon la formule suivante (Afnor, 2000) :

$$\text{Rdt}_{\text{HE}} : (\text{M}_{\text{HE}} / \text{M}_{\text{V}}) \times 100$$

Où:

Rdt_{HE}: Rendement en huile essentielle (%).

M_{HE}: Masse de l'huile essentielle (g).

M_V: Masse de matériel végétal sèche (g).

2.2. Préparation des solutions antifongiques

Les solutions mères de l'huile essentielle et de l'hydrolat sont préparées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le tween 80 pour avoir des concentrations finales de 100 mg/mL.

Une solution mère de fluconazole à une concentration mère de 2mg/mL est utilisée.

2.3. Evaluation des activités antifongiques vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles

Lors de cette étude, nous avons testé les activités antifongiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) vis-à-vis des cellules fongiques planctoniques et sessiles pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI).

Chaque test est réalisé trois fois dans les mêmes conditions expérimentales.

2.3.1. Préparation de l'inoculum

Les inocula des trois souches de *Candida albicans* sont préparés à partir des pré-cultures jeunes. A cette fin, 2 à 3 colonies bien isolées de chaque souche sont mises dans 1mL du bouillon Sabouraud. L'ensemble est incubé sous agitation (180 tours/min) à 30°C pendant 4h. Après incubation, chaque pré-culture est centrifugée à 3000g pendant 5 min à 4°C. Le culot ainsi récupéré est additionné à 100µL du Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7,4) est soumis à une centrifugation. Le surnageant ainsi obtenu est ensuite éliminé. Cette étape de lavage est répétée deux fois. À la troisième fois, 100µL du PBS sont ajoutés au culot et le mélange est soumis à un vortex puis dilué au 1/10^{ème} par de l'eau physiologique stérile. Les concentrations cellulaires sont fixées à 10³ cellules/mL pour déterminer

les CMI et à 10^6 cellules/mL pour évaluer les SCMI après avoir fait un dénombrement sur cellule de Thoma sous microscope.

2.3.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices pour chaque antifongique vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans* est réalisée par la méthode de microdilution sur microplaque suivant le protocole décrit par *the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M27 A3, 2008)*.

Les 96 puits d'une microplaque à fond rond sont remplis par 100 μ L d'inoculum à une concentration initiale égale à 10^3 cellules/mL, à l'exception des puits de la dernière ligne de la microplaque qui servira de contrôle négatif rempli de milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 tamponné à pH 6,9. Ensuite, 100 μ L de chaque antifongique (l'huile essentielle, l'hydrolat et le fluconazole) sont ajoutés aux puits de la première colonne et une série de dilution de demi en demi est effectuée. La microplaque est ensuite scellée et placée dans une étuve à 37°C pendant 24h.

La CMI est déterminée à partir du premier puits dépourvu de croissance levurienne visible. Ces résultats sont vérifiés par le test de viabilité des cellules fongiques, sur gélose Sabouraud, des puits correspondant à la CMI de chaque souche fongique testée.

2.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles (SCMI)

Pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles, nous avons utilisé le protocole modifié de **Pierce** et ses collaborateurs (2008).

a. Développement des biofilms

Cette étape est réalisée dans des microplaques de culture cellulaire à 96 puits à fond plat. 100 μ L d'un inoculum de 10^6 cellules/mL préparé dans le RPMI, sont mis dans chaque puits de la microplaque à l'exception de la dernière colonne qui est remplie du milieu RPMI seule (contrôle négatif). Les microplaques sont ensuite recouvertes à l'aide du papier aluminium stérile et incubées pendant 24 et 48 heures à une température de 37°C.

b. Tests antifongiques

Après la formation des biofilms, le milieu de culture est délicatement éliminé de la microplaque sans déstabiliser les biofilms. Les puits sont ensuite rincés trois fois par 100 μ L du PBS stérile pour éliminer les levures planctoniques et non adhérentes, les traces du PBS sont éliminées à l'aide d'un papier absorbant stérile. Ensuite, les puits de la microplaque sont remplis par 100 μ L de l'RPMI et 100 μ L de chaque antifongique (l'huile essentielle, l'hydrolat et le fluconazole) sont ajoutés dans le premier puits de la microplaque. Après homogénéisation du contenu du puits à l'aide d'une micropipette, 100 μ L sont prélevés et une série de dilution de demi en demi est réalisée, à l'exception de la première colonne servira de contrôle positif (croissance sans aucune dilution). La microplaque est ensuite ré-incubée à 37°C pendant 24 h.

Après 24h d'incubation, le contenu de la plaque est jeté, ensuite tous les puits sont lavés au PBS pour éliminer les cellules mortes et les traces d'antifongiques. Puis 60mg du fer stérile sous forme de poudre sont introduit dans tous les puits qui sont remplis préalablement par 100 μ L du RPM, à l'aide d'un aimant placé au-dessous de la microplaque, des mouvements de va et vient sont réalisés pendant une minute afin de détacher les cellules sessiles au fond des puits.

Ensuite, un volume de 80 μ L est prélevé pour tous les puits. Les échantillons sont transférés vers une autre microplaque stérile à fond rond. Après une incubation de 24h à 37°C, les SCMI sont déterminées à l'œil nu.

Ces résultats sont vérifiés par le test de viabilité des cellules fongiques, sur gélose Sabouraud, des puits correspondant à la SCMI de chaque souche fongique testée.

Troisième partie

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Rendement en huile essentielle (Rdt_{HE})

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*), est un liquide de couleur jaunâtre, d'une odeur forte et caractéristique avec un rendement de 1,18% (p/p) par rapport au matériel végétal sec.

1.2. Evaluation des activités antifongiques vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles

Les activités antifongiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) sont évaluées vis-à-vis de trois souches de référence de *Candida albicans* par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI).

1.2.1. Détermination des CMI:

La méthode de microdilution sur microplaque a pour but d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration de l'antifongique nécessaire pour inhiber toute croissance fongique visible à l'œil nu après 24h d'incubation à 37°C.

Les CMI de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine et du fluconazole sont regroupées dans le tableau N°1.

Tableau N°1 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antifongiques vis-à-vis des trois souches de référence de *Candida albicans*.

Antifongiques ($\mu\text{g/mL}$)	Souches		
	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	<i>Candida albicans</i> ATCC26790	<i>Candida albicans</i> 444IP
Fluconazole	4	4	4
Huile essentielle	3,05	0,19	6,10
Hydrolat ($\times 10^3$)	6,25	1,56	12,5

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de l'écorce de la cannelle de Chine inhibe la croissance des trois souches fongiques testées de manière variable.

Candida albicans ATCC26790 est la plus sensible avec une CMI de 0,19 µg/mL, suivit de *Candida albicans* ATCC10231 et *Candida albicans* 444IP avec des CMI de 3,05 µg/mL et 6,10 µg/mL, respectivement.

Nous constatons que ces valeurs sont comparables, voire meilleurs que celle obtenue avec le fluconazole qui montre une CMI de 4µg/mL pour les trois souches étudiées.

L'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine exerce un pouvoir antifongique vis-à-vis des trois souches étudiées avec des CMI qui varient de 1,56 à 12,50 x 10³ µg/mL. En effet, *Candida albicans* ATCC26790 est la plus sensible avec une CMI de 1,56 x 10³ µg/mL, suivie de *Candida albicans* ATCC10231 (CMI=6,25 x 10³ µg/mL) et *Candida albicans* 444IP (CMI=12,50 x 10³ µg/mL).

Nous remarquons que ces valeurs sont supérieures à celle obtenue avec le fluconazole (CMI=4µg/mL).

1.2.2. Détermination des SCMI:

La concentration minimale inhibitrice sessile correspond à la plus faible concentration de l'antifongique capable d'inhiber la croissance des cellules fongiques au sein d'un biofilm.

Les résultats relatifs aux SCMI de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine et du fluconazole vis-à-vis des biofilms fongiques de 24 et 48 heures produits par les trois souches de références de *Candida albicans* sont regroupés dans le tableau N°2.

Nous remarquons que tous les biofilms (24 et 48h) sont sensibles vis-à-vis de cette huile essentielle avec une SCMI de 9,37 x 10³ µg/mL.

Les SCMI du fluconazole vis-à-vis des biofilms (24 et 48h) produits par les trois souches de *Candida albicans* sont de l'ordre de 256µg/mL.

Par ailleurs, les résultats de évaluation de l'effet antifongique de l'hydrolat de l'huile essentielle de la cannelle de Chine vis-à-vis des biofilms de 24 et 48h produits par les trois souches de référence de *Candida albicans* montre des SCMI >400 x 10³ µg/mL quelques soit la souche étudiée.

Tableau N°2 : Concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI) des antifongiques vis-à-vis des biofilms de 24 et 48 heures produits par trois souches de référence de *Candida albicans*

Souches Antifongiques ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Candida albicans</i> ATCC10231		<i>Candida albicans</i> ATCC26790		<i>Candida albicans</i> 444IP	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Fluconazole	256	256	256	256	256	256
Huile essentielle($\times 10^3$)	9,37	9,37	9,37	9,37	9,37	9,37
Hydrolat ($\times 10^3$)	>400	>400	>400	>400	>400	>400

2. Discussion

Les huiles essentielles de plusieurs plantes sont connues pour leurs activités antifongiques (**Pozzati et coll., 2008**).

La cannelle de Chine est utilisée depuis l'antiquité par la médecine traditionnelle chinoise dans le traitement des maux de tête, des troubles digestifs, des inflammations et de pyrexie. Cet arbre aromatique occupe une bonne partie du globe terrestre puisqu'il est cultivé en Vietnam, Laos, la Chine, l'Inde,.... **[(Auteroche, 1993) ; (Ebrhard teuscher et coll., 2005)]**.

L'huile essentielle extraite de l'écorce de ce dernier présente des propriétés antioxydantes, antiseptiques, antibactériennes et antifongiques **[(Shan et coll., 2005) ; (Chaudhry et Perween, 2006) ; (Kocevski et coll., 2013)]**.

Pour cela nous avons jugé intéressant d'évaluer l'activité antifongique de cette huile vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de trois souches de référence de *Candida albicans*.

Lors de cette étude, l'huile essentielle de l'écorce de la cannelle de Chine obtenue par hydrodistillation montre un rendement de 1,18% (p/p). Ce résultat va dans le même sens que celui de **Kaskatepe** et ses collaborateurs **(2016)** qui ont montré un rendement de 1,5%.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles des trois souches de référence de *Candida albicans*, ont montré que cette essence exerce un effet inhibiteur remarquable suite aux CMI qui sont comprises entre 0,19 et 6,10 μ g/mL, et des SCMI de 9,37 x10³ μ g/mL.

Cette activité est probablement due à la composition chimique de l'huile essentielle de l'écorce de *Cinnamomum cassia* **(Rao et Gan, 2014)**.

Elle est composée essentiellement par le cinnamaldéhyde (93,2%), les monoterpènes (2,1%), l'hydroxycinnamaldéhyde (1%) et les coumarines (0,3%) **(Kaskatepe et coll., 2016)**.

Le cinnamaldéhyde peut provoquer une lésion au niveau de la membrane fongique par inhibition de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et également par une interaction avec ce dernier **(khan et coll., 2013)**.

De plus, le cinnamaldéhyde est capable d'inhiber l'activité enzymatique des protéinases, des phospholipases et peut même empêcher la formation des mycéliums, qui sont considérés comme des facteurs de virulence chez *Candida albicans* **(Pootong et coll., 2017)**.

Les monoterpènes de l'huile essentielle de l'écorce de la cannelle de Chine provoquent une inhibition du métabolisme énergétique mitochondriale des cellules fongiques, notamment les oxydations phosphorylantes. Ce phénomène peut entraîner des perturbations dans les processus physiologiques et biochimiques dans la cellule **(Daroui-Mokaddem, 2012)**.

Par ailleurs, le sous produit de l'hydrodistillation appelé aussi « hydrolat », a démontré son activité antifongique lors de cette étude vis-à-vis des cellules planctoniques des trois souches de référence de *Candida albicans* avec des CMI allant de 1,56 à 12,5 x10³ μ g/mL. Néanmoins, les cellules sessiles sont moins sensibles envers cet hydrolat, avec des SCMI qui sont supérieures à 400 x10³ μ g/mL.

L'étude de **Shahpar** et ses collaborateurs (**2016**) a montré que l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine est composé essentiellement du cinnamaldéhyde (93,37%) et du phtalate de dibutyle (4,08%).

Par ailleurs, nous avons remarqué que les SCMI obtenues pour les trois souches fongiques sont largement supérieures à celles des CMI. Nous constatons que les trois souches de référence de *Candida albicans* sont formatrices de biofilms.

Cette différence est liée à la résistance des cellules sessiles en mode biofilm. Cela est confirmé par l'étude de **Douglas (2003)**, qui a montré que les biofilms confèrent une résistance qui va de 30 à 2000 fois aux antifongiques commerciaux par rapport aux cellules planctoniques.

Conclusion générale

Notre étude a porté sur l'évaluation des activités antifongiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) obtenues par hydrodistillation par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI) vis-à-vis des trois souches de référence de *Candida albicans*.

Les résultats des CMI obtenus montrent que l'huile essentielle de la cannelle de Chine exerce une activité antifongique remarquable vis-à-vis des souches étudiées. En revanche, la formation de biofilm induit une diminution de cette activité.

De plus, les valeurs des CMI et SCMI obtenus pour l'hydrolat montrent que ce dernier est faiblement actif vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*.

Au terme de notre étude, ces résultats préliminaires nous encouragent à passer à une autre étape et qui consiste à étudier l'effet antifongique de cette huile essentielle sur d'autres espèces non *albicans* ou sur des moisissures. Comme l'on est encouragé à étudier son effet anti fongique *in vivo*.

Il serait aussi intéressant d'effectuer une étude de la cytotoxicité de cette huile vis-à-vis des cellules animales.

Références bibliographiques

- Afnor. (2000)** Huiles essentielles. Échantillonnage et méthodes d'analyse monographies relatives aux huiles essentielles .Tome 2. 6^{ème} édition.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., et coll (2010)** Composition chimique et activité antimicrobiennes des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss & Reut et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth, du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environment*; 14(1):141-148.
- Anane S. et Khalfallah F. (2006)** Diagnostic biologique des candidoses systémiques : difficultés et perspectives. *Pathologie Biologie* ; 55(5) : 262-272.
- Auteroche B. (1993)** Une plante familière de la pharmacopée chinoise: Le cannellier - *Cinnamomum cassia* .Presl. (*Gui*). *Méridiens*; 101: 87-98.
- Baillie G.S. and Douglas L.J. (2000)** Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial, Chemotherapy*; 46(3):397-403.
- Berman J. (2006)** Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*; 9: 595-601.
- Bruneton J. (2009)** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales.4^{ème} édition, 1243 p.
- Carle S. et Pharm B. (2003)** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmacothérapie*; 36:25-41.
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T. and Ghannoum M.A. (2001)** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*; 183: 5385-5394.
- CLSL. (2008)** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard-third edition, CLSI document M27-A3. Clinical and laboratory standards institute.
- Chaudhry N. M.A. and Perween T. (2006)** Anti-microbial activity of *Cinnamomum cassia* against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts.*Journal of Botany*; 38(1): 169-174.
- Couc-Marinier F. et Lobstein A. (2013)** Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*; 52: 22-25.

Daroui-Mokaddem H. (2012) Etude phytochimique et biologique des espèces: *Eucalyptus globulus*(Myrtaceae), *Smyrnum olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asterarceae).Thèse de Doctorat en biochimie appliquée. Faculté Des science, Université badji Mokhtar- Annaba.

De Billerbeck V.G. (2007) Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*; 5(5): 249-253.

Develoux M. et Bretagne S. (2005) Candidoses et levures diverses. *EMC-Maladies infectieuses*; 2(5): 119-139.

Douglas L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection .*Trends Microbiology*; 11 (1):6 -30.

Ebrhard teuscher R.A., Lobstein A., Rohner C. et Bernard M. (2005) Plantes aromatiques :épices, aromates, condiments et huiles essentielles .Edition Tec & Doc. Paris, 3-6-19-155 p.

EL Masouri K. (2013) Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales, thèse de Doctorat en Médecine. Université Cadi Ayad. Faculté De Médecine et de Pharmacie Marrakech, Maroc.

European-Pharmacopoeia (2005) Maisonneuve S.A. 5 ème édition, Sainte Ruffine

Granier F. (2003) Antifongiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotiques*; 5(1): 39-48.

Grinand N. (2012) Les biofilms à *Candida. spp* :épidémiologie et sensibilité aux antifongiques, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Nantes. Faculté de pharmacie, France.

Hochart S., Barrier F., Durand-joly I., Horrent S., Decaudin B. et Odou P. (2008) Les antifongiques systémiques. Partie 2: éléments thérapeutiques. *Le Pharmacien Hospitalier*; 43: 155-168.

Huguette M. (2008) La route des épices naturelles, mélanges d'épices aromates et condiment naturels. p 11.

Kaskatepe B., Kiymaci M.E., Simsek D., Erol H.B. and Erdem S.A. (2016) Comparison of the contents and antimicrobial activities of commercial and natural cinnamom oils. *Indian .Journal. Pharmaceutical. Sciences*; 78(4): 541-548.

Khan M.S., Ahmad I. and Cameotra S.S. (2013) Phenylaldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express*; 3:8:54.

Kocevski D., Du M., Kan J., Jing C., Lačanin I. and Hrvoje Pavlović H. (2013) Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia* and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. *Food microbiology and safety*; 78(5): 731–737.

Laghouiter O.K, Gherib A. et Laghouiter H. (2015) Étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de certaines menthes cultivées dans la région de Ghardaïa. *El wahat pour les recherches et les études*; 8 :84-93.

Lallemand H., Pirot N., Dornier M. et Reyens M. (2000) La cannelle : historique, production et principales caractéristique . *Fruits* ; 55(1) :421-432.

Lardry J.M. et Haberkorn V. (2007) Aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la Revue*; 7: 14– 17.

Minooeianhaghghi M.H., Sepehrian L. et Shokri H. (2016) Effets antifongiques des huiles essentielles de *Lavandula binaludensis* et *Cuminum cyminum* contre *Candida albicans* isolés de patientes atteintes de candidose vulvo-vaginale récidivante. *Journal de Mycologie Médicale*; In Press.

Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormely F.L., Mowat E., Ramage G., et al (2008) A simple and reproducible 96-well plate- based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature. Protocols*; 3:1494-1500.

Pootong A., Norrapong B. and Cowawintaweewat S. (2017) Antifungal activity of cinnamaldehyde against *Candida albicans*. *Tropical medicine and public health*; 48 (1):150-158. .

Pozzati P., Scheid L.A., Spader T.B., Atayde M.L., Santurio A.M., et al (2008) In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida. spp.* *Canadian Journal. Microbiology*; 54: 950-956.

Ramage G., Bachmann S., Patterson T.F., Wickes B.L. and Lopez-Ribot J.L. (2002) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial. Chemotherapy*; 49:973-980.

Rao P.V and Gan S.H. (2014) Cinnamom: A multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*; 2014:4-12.

Ravindran P.N., NirmalBabu K. and Shylaja M. (2004) Cinnamon and Cassia, The genus *Cinnamomum*», Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles, ed. CRC PRESS, New York.

Seddiki S.M., Boucherit-Otmani Z., Boucherit k., Badsy-Amir S., Taleb M. and Kunkel D. (2013) Assessment of types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Alegria. *International Journal of General Medicine*; 6:1-7.

Senhaji O., Faid M. et Kalalou I. (2006) Étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie expérimentale*; 4(1):24-30.

Shahpar B., Moein M. and Zarshenas M.M. (2016) Chemical comparison of eleven cinnamon aromatic water samples from Fars (Iran) local markets with a standard sample. *Trends in Pharmaceutical Science*; 2(2): 131-138.

Shan B., Cai Y.Z., Sun M. and Corke H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Agriculture and food chemistry*;53:7749-7759.

Wang L., Wang Z-M., Li T-C., Zhou X., Ding L. and Zhang H-Q. (2008) Rapid extraction and analysis of essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Chemical Research in Chinese Universities*; 24(3): 275–280.

Whiteway M. and Bachewich C. (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, 61: 529-553.

Zhiri A. (2006) Aromathérapie. *NUTRA NEWS : Science, Nutrition, Prévention et Santé*, 16.

ملخص

ترتكز دراستنا علي تقييم نشاط مضاد للفطريات للزيت الأساسي و المياه العطرية للحاء نبتة قرفة الصين (*Cinnamomum cassia*) ضد ثلاث سلالات من نوع *Candida albicans* عن طريق تحديد اقل التراكيز المثبطة (CMI) واقل التراكيز المثبطة للأغشية الحيوية (SCMI). النتائج المتحصل عليها أظهرت أن هته الزيت لها تأثير مثبت فعال نظرا لأقل التراكيز المتحصل عليها و ألتي تتراوح من 0,19 إلى 6,10 µg/ml و 12,5 x 10³ µg/mL في حالة الأغشية الحيوية. من الناحية الاخرى , المياه المعطر أظهرت فعالية مثبطة منخفضة ضد نفس السلالات السابقة , حيث بلغت قيمة اقل التراكيز المثبطة 1,56 إلى غاية 12,5 x 10³ µg/mL واقل التراكيز المثبطة للأغشية الحيوية التي تتجاوز قيمتها 400 x 10³ µg/mL.

الكلمات الأساسية: *Cinnamomum cassia*, الزيت الأساسي, الماء المعطر, *Candida albicans*, الأغشية الحيوية, مضاد للفطريات.

Résumé

Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'écorce de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) vis-à-vis de trois souches de référence de *Candida albicans* par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI). Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle présente un effet antifongique remarquable vis-à-vis des souches de *Candida albicans*, avec des CMI qui vont de 0,19 µg/mL à 6,10 µg/mL et des SCMI de 9,37 x 10³ µg/mL. En revanche, l'hydrolat a révélé une faible activité antifongique vis-à-vis de ces mêmes souches avec des CMI qui varient entre 1,56 x 10³ µg/mL et 12,5 x 10³ µg/mL et des SCMI qui dépasser 400 x 10³ µg/mL.

Mots clés : *Cinnamomum cassia*, huile essentielle, hydrolat, *Candida albicans*, biofilms, activité antifongique.

Summary

Our study focused on the evaluation of the antifungal activity of essential oil and the hydrosol from the bark of Chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*) against three reference strains of *Candida albicans* by determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Sessile Minimum Inhibitory Concentration (SMIC). The obtained results showed that the essential oil exhibited a good antifungal effect against *Candida albicans* strains with the MIC that range from 0.19 µg/mL to 6.10 µg/mL and the SMIC of 9.37 x 10³ µg/mL. On the other hand, the hydrosol revealed a weak antifungal activity against these same strains with MIC varying between 1.56 x 10³ µg/mL and 12.5 x 10³ µg/mL and SCMI higher than 400 x 10³ µg/mL.

Keywords: *Cinnamomum cassia*, essential oil, hydrosol, *Candida albicans*, biofilms, antifungal activity.