



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



**Département de biologie**

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à  
l'environnement  
« LAMAABE »

**Mémoire du master  
Présenté par**

*Melle BOUCIF Asmae*

*Melle BOUDIA Cherifa Kawther*

*En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie*

**Filière :** Sciences biologiques

**Option :** Microbiologie et contrôle de qualité

**Intitulé du thème**

**L'activité anti-biofilm de *Lavandula angustifolia* sur le biofilm en milieu hospitalier**

Soutenue le 23 juin 2022, devant le jury composé de

<b>Présidente</b>	HASSAINE Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examinatrice</b>	MKEDDER Ilham	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
<b>Encadreur</b>	BELLIFA Samia	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2021-2022**

## **Remerciements**

*Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes*

*Nous souhaitons ici les en remercier.*

*Du fond du cœur nous tenons à remercier **DIEU** le tout-puissant pour sa grande bénédiction et son immense miséricorde qui nous accompagné tout au long de notre parcours scolaire et universitaire.*

*Nous n'oublierons jamais d'adresser un grand et chaleureux remerciement à nos **familles** pour leurs soutiens moraux, matériels continus et inébranlables au long de notre formation.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement notre encadrante Madame **BELLIFA Samia**, pour sa disponibilité, les conseils qu'il nous a prodigués, la patience, la confiance qu'il nous a témoignée ont été déterminants dans la réalisation de notre mémoire.*

*A Mme **HASSAINE Hafida**, Maitre de Conférence à l'Université Abou Bekr BelKaid .on a l'honneur que nous de vous avoir accepté de présider ce jury de thèse. Veuillez accepter notre plus vifs remerciements et soyez assuré de tous nos respect et de nos profonde gratitude.*

*A Mme **MKEDDER Ilham**, Maitre de conférences à l'Université Abou Bekr BelKaid c'est un grand plaisir pour nous de vous avoir accepté d'examiner ce modeste travail, merci pour votre présence.*

*Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs de l'université d'Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

*Enfin, nous tenons à remercier toute personne qui a participé de près ou de loin à l'exécution de ce modeste travail.*

## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ceux que personne ne peut compenser les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation et mon bien-être :*

***Mes très chers parents,***

*A ma mère à qui je ne saurais exprimer ma profonde gratitude, à son regard si pétillant et sa complicité si profonde.*

*A mon père qui n'a jamais cessé de me soutenir matériellement et moralement pour que je puisse avoir une bonne formation et surtout être la meilleure je voudrais exprimer mes affections et mes grâces.*

*Merci à vous deux encore mille fois.*

***Toute ma famille,***

*A la mémoire de mon grand-père **Yamani**, qu'Allah ait son âme.*

*A ma très chère sœur **Sanae** et mon frère **Yacine** qui ont toujours été présents dans les moments les plus difficiles.*

*A ma chère tante Fatima et sa fille **Israe Nesrine** et mes oncles **Mustapha** et **Sidahmed**.*

*Merci pour l'amour, l'attention et l'aide qu'ils m'ont apportés.*

*A mon fiancé **Yacine**, merci pour vos encouragements.*

*A mes chères amies : **Sabéha**, **Yusra**, **Hadjer**, **Sanae**, **Rawida**, **Kamila**, **Yosra** et **Farah**.*

*Merci pour vos soutiens*

*Sans oublier mon binôme **Cherifa Kawther** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*Je tiens à présenter mes remerciements à :*

***A toute la promotion microbiologie appliqué et contrôle de qualité***

*Mes remerciements vont également à toute personne qui de près ou de loin, a participé à ma formation.*

***BOUCIF Asmae***

## *Dédicace*

*A ALLAH Le tout puissant,  
Le Miséricordieux ; ainsi qu'à son prophète Mohamed, paix et salut sur lui. Par  
la grâce et la bonté de Dieu qui a toujours guidé nos pas et qui nous a donné la  
chance et la force d'étudier et d'en arriver là. Je dédie cette thèse*

### *À ma chère Mère*

*A ma mère Fatima Zohra MOUSSAOUI, à celle qui est toujours présente pour  
me soutenir et m'encourager Je vous présente ce travail pour vous rendre  
hommage et vous remercier pour vos grands efforts accomplis à mon égard  
sans votre présence dans ma vie je n'aurais réalisé mes objectifs et mes  
ambitions.*

*Puisse Allah vous protéger du mal et vous procurer une longue vie pleine de  
santés et de joie.*

### *A mon très cher père,*

*A mon père Hchemi BOUDIA*

*Je dédie cet événement marquant de ma vie à mon père. J'espère qu'il apprécie  
ce geste comme preuve de gratitude de la part de ça fille.*

*Tu es toujours pour moi le modèle du père respectueux et méticuleux. C'est  
grâce à toi que j'écris mon propre chemin et si je veux réussir le reste de ma vie  
justement pour que tu sois fier de moi.*

### *A Mon chère Grand-père « Hbibbi »*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

### *A mes soeurs adorées*

*Asmaa, Mansouria*

### *A mes chers frères*

*Fethallah et Mustpha*

### *A ma belle-sœur Soumia*

*Et mes beau-frères Mohammed et Raouf*

*Je vous remercie pour tout votre appui et votre encouragement ce travail n'aurait pas pu être sans votre aide, en témoignage de mon affection fraternelle merci d'être toujours là pour moi.*

*Sans oublier mes nièces et mes neveux **Nouha , Jinan et Layen ; Rached , Wssim Nidal et Imran** , les prunelles de mes yeux et ma source de bonheur, ils ont toujours su me distraire et me redonne le sourire dans mes pires journées.  
Je vous aime plus que tout.*

*A tous mes amies **Kamila Zahia Ahlem Yosra Sanaa Rawida**, Merci à tous pour vos encouragements et votre soutien*

*Sans oublié mon binôme : qui a partagé les efforts et s'est investi autant que moi pour donner le meilleur de nous-même,  
je tiens surtout à la remercie pour sa patience, sa compréhension et sa tolérance lors de nos moments de fatigues, ton soutien moral m'a été d'une grande importance, je suis fière de nous et de tout ce qu'on a accompli cela n'a pas été facile mais on est arrivée.*

*Merci **Asmae** je te souhaite beaucoup de succès.*

*Finalement, j'adresse mes chaleureux remerciements à tous les membres de ma famille, mes amies, et à tous ceux et celles qui me connaissent et qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.*

*A toute la promotion « **Microbiologie et contrôle de qualité 2021-2022** ».*

***Cherifa Kawther***

## Résumé

Les bactéries présentes dans les biofilms ont une tolérance aux antibiotiques beaucoup plus élevée jusqu'à 1 000 fois supérieure à leurs homologues planctoniques et cela en raison de la diminution de la diffusion des agents antimicrobiens dans la matrice extracellulaire, augmentation d'activité des pompes à efflux, détection de système quorum et la présence des cellules persistantes. Biofilms. Les huiles essentielles (HE) issues de plantes médicinales représentent une alternative valable dans le traitement des biofilms bactériennes et fongiques.

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude de synthèse d'un travail sur l'application de , l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia*, libre ou encapsulée dans des liposomes, pour éliminer les biofilms primaires et les cellules persistantes de *C. auris*, confirmant le grand potentiel des composés alternatifs contre les pathogènes fongiques émergents.

*L. angustifolia* présente des propriétés antifongiques et antibiofilm dans les deux formulations libre et encapsulée contre le biofilm primaire *C. auris*, et sur les cellules persistantes dérivées du biofilm primaire.

**Mots clés :** biofilm, huile libre, huile encapsulé, candida auris

---

## Abstract

Bacteria present in biofilms have a much higher antibiotic tolerance of up to 1,000 times their planktonic counterparts due to reduced diffusion of antimicrobial agents in the extracellular matrix, increased activity of efflux pumps, detection of quorum system and presence of persistent cells. Biofilms. Essential oils (OE) from medicinal plants are a valuable alternative in the treatment of bacterial and fungal biofilms.

The objective of this work is to carry out a synthesis study of a work on the application of , the essential oil of *Lavandula angustifolia*, free or encapsulated in liposomes, to eliminate primary biofilms and persistent cells of *C. auris*, confirming the great potential of alternative compounds against emerging fungal pathogens.

*L. angustifolia* has antifungal and antibiofilm properties in both free and encapsulated formulations against the primary biofilm *C. auris*, and on persistent cells derived from the primary biofilm.

**keywords:** biofilm, free oil, encapsulated oil, candida auris

## الملخص

تتمتع البكتيريا الموجودة في الأغشية الحيوية بتحمل مضاد حيوي أعلى بكثير يصل إلى 1000 ضعف نظيراتها من العوالق بسبب انخفاض انتشار العوامل المضادة للميكروبات في المصفوفة خارج الخلية، وزيادة نشاط مضخات التدفق، واكتشاف نظام النصاب ووجود الخلايا الثابتة. الأغشية الحيوية. الزيوت الأساسية من النباتات الطبية هي بديل قيم في علاج الأغشية الحيوية البكتيرية والفطرية.

الهدف من هذا العمل هو إجراء دراسة توليفية لعمل حول تطبيق زيت *Lavandula angustifolia* ، الحر أو المغلف في liposomes، للقضاء على الأغشية الحيوية الأولية والخلايا الثابتة من *C. auris* ، مما يؤكد الإمكانيات الكبيرة للمركبات البديلة ضد مسببات الأمراض الفطرية الناشئة.

يتميز *L. angustifolia* بخصائص مضادة للفطريات ومضادة للفيلم في كل من التركيبات الحرة والمغلقة مقابل الأغشية الحيوية الأولية *C. auris* ، وعلى الخلايا الثابتة المشتقة من الأغشية الحيوية الأولية.

**الكلمات الرئيسية:** أغشية حيوية، زيت حر، زيت مغلف، *Candida auris*

## Table des matières

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 01 : Les biofilms dans le secteur médical</b> .....	3
1. Historique.....	3
2. Définition du biofilm.....	4
3. Les étapes de la formation du biofilm.....	5
3.1 Adhésion réversible.....	5
3.2 Adhésion irréversible.....	6
3.3 Maturation du biofilm.....	6
3.4 Dispersion du biofilm.....	7
4. Les facteurs favorisant la formation du biofilm.....	7
4.1 Caractéristique de surface.....	7
4.2 Caractéristique du milieu.....	8
4.3 Caractéristique des microorganismes.....	8
5. Le quorum sensing.....	9
5.1 Définition.....	9
5.2 Mécanisme du Quorum Sensing.....	9
6. Le domaine d'intervention des biofilms dans le secteur médical.....	10
7. L'importance de biofilm dans le secteur médicale (les infections nosocomiales).....	10
8. La résistance des biofilms aux antibiotiques.....	11
6.3 Moyen de lutte contre la formation du biofilm.....	12
6.3.1 Stratégies à titre préventif.....	13
6.3.2 Stratégies curatives.....	13
<b>Chapitre 02 : <i>Lavandula angustifolia</i></b> .....	15
1. Taxonomie.....	15
2. Description botanique.....	16
3. Usage thérapeutique.....	16



4. Activité antibiofilm de l'huile essentielle de <i>Lavandula angustifolia</i> .....	17
4.1 Composition chimique.....	17
4.2 Propriétés physico-chimique.....	17
4.3 L'effet du <i>L. angustifolia</i> sur la formation du biofilms.....	17

## **Deuxième partie : matériel et méthodes**

1. Souche testée.....	19
2. Analyse GC-MS de l'huile de <i>L. angustifolia</i> .....	19
3. Préparation de l'huile de <i>L. angustifolia</i> encapsulée par liposomes.....	19
4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de caspofungine.....	20
5. Effet de l'huile de <i>L. angustifolia</i> et de l'huile encapsulée de liposomes sur les cellules planctoniques de <i>C. auris</i> .....	20
6. Formation et quantification du biofilm.....	21
7. Détection des cellules persistantes.....	21
8. Développement d'un biofilm dérivé de cellules persistantes de <i>C. auris</i> .....	21
9. Éradication du biofilm avec de l'huile de <i>L. angustifolia</i> encapsulée de liposomes libres.....	22
10. Expression génétique dans des biofilms dérivés de <i>C. auris</i> persistants traités avec de l'huile libre de <i>L. angustifolia</i> et encapsulée dans des liposomes.....	22
11. Microscopie confocale à balayage laser.....	23
12. Analyse statistique.....	23

## **Troisième partie : résultats et discussion**

1. Détection de cellules persistantes dans les biofilms de <i>Candida auris</i> .....	24
2. Composition de l'huile de <i>L. angustifolia</i> .....	27
3. Caractérisation de l'huile encapsulée de liposomes de <i>L. angustifolia</i> .....	28
4. Activité antifongique de l'huile libre et encapsulée de <i>L. angustifolia</i> sur les cellules planctoniques et les biofilms de <i>C. auris</i> .....	29
<b>Conclusion</b> .....	33

## **Références bibliographiques**

## **Annexe**

## Liste des abréviations

<b>AHL</b>	Acyl-homosérine lactones
<b>BMR</b>	Bactérie multi-résistante
<b>C-diGMP</b>	Di-guanosine-mono-phosphate cyclique
<b>Chol</b>	Cholesterol
<b>CLSM</b>	Confocal Laser Scanning Microscopy / microscopie confocale à balayage laser
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CSF</b>	Caspofungine
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DOc</b>	Densité optique critique
<b>DH</b>	Hydrodynamic di-ameter / di- amètre hydrodynamique
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering / diffusion dynamique de la lumière
<b>EPS</b>	Substances polymériques extracellulaires
<b>EV</b>	Electron volt
<b>GC-MS</b>	Gaz chromatography – masse spectrometry
<b>HE</b>	Huile essentiel
<b>MDR</b>	Multidrug-resistant
<b>PAI</b>	Peptide auto-inducteur
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline / tampon phosphate salin
<b>PC</b>	Phosphatidyl-choline
<b>PI</b>	Iodure de propidium
<b>PDI</b>	Polydispersity index / Indice de polydispersité
<b>QR</b>	Quorum sensing
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>SUV</b>	Small unilamellar vesicles / petites vésicules unilamellaires.
<b>Tr/min</b>	Tour par minute
<b>TSB</b>	Bouillon tripton soja
<b>UFC</b>	Unité formant colonies

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Représentation micrographique du développement du biofilm de <i>Candida auris</i> ....	4
<b>Figure 2 :</b> Représentation schématique montrant le développement d'un biofilm .....	5
<b>Figure 3 :</b> Résistance des biofilms aux antibiotiques.....	12
<b>Figure 4 :</b> Planche de <i>lavandula angustifolia</i> .....	15
<b>Figure 5 :</b> Les feuilles et les fruits de <i>Lavandula angustifolia</i> .....	16
<b>Figure 6 :</b> La biomasse totale des biofilms de <i>C. auris</i> après 24 et 48 h d'incubation.....	24
<b>Figure 7 :</b> Détection de persistants dans le biofilm de <i>Candida auris</i> : survie des cellules de <i>C. auris</i> dans le biofilm après traitement par la caspofungine (CSF) à différentes concentrations	25
<b>Figure 8 :</b> Visualisation au CSLM de cellules persistantes dans le biofilm de <i>C. auris</i> traité avec 200 µg/mL de caspofungine et colorés avec SYTO9/PI.....	26
<b>Figure 9 :</b> Développement d'un nouveau biofilm à partir de persistants.....	27
<b>Figure 10 :</b> Effet de l'huile libre de <i>L. angustifolia</i> et de l'huile encapsulée en liposomes de <i>L.angustifolia</i> sur la croissance planctonique de <i>C. auris</i> .....	29
<b>Figure 11 :</b> Éradication de l'huile de <i>L. angustifolia</i> libre et encapsulée dans les liposomes sur les biofilms de <i>C. auris</i> .....	30
<b>Figure 12 :</b> QPCR en temps réel à 48 h de traitement. Les histogrammes montrent les différences dans les niveaux d'expression de trois gènes de virulence, d'un gène d'adhésion, d'un gène impliqué dans la formation de l'hyphale.....	31

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Effets destructeurs du biofilm des huiles essentielles sur les isolats cliniques de <i>Candida auris</i> .....	19
<b>Tableau 02</b> : séquence et références des l'amorces utilisés pour RT-PCR Quantitative.....	24
<b>Tableau 03</b> : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Lavandula angustifolia</i> .....	29
<b>Tableau 04</b> : Diamètre moyen, PDI et potentiel zêta de l'huile de <i>L.angustifolia</i> encapsulée par liposomes.....	29
<b>Tableau 05</b> : Données des niveaux d'expression dans le biofilm de <i>C.auris</i> .....	32

# Introduction

Dans un milieu naturel, 90% des espèces bactériennes vivent en communautés complexes, autrement dit le mode de vie bactérien qui domine est le mode biofilm (**Medeiros, 2016**). Le biofilm est généralement défini comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de la planète réside sous forme d'un biofilm (**Tremblay et al., 2014**).

Les biofilms sont le résultat du développement des microorganismes sur une surface vivante ou inerte, c'est le mode de vie avantageux pour les microorganismes. Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans le domaine de la santé publique, ils peuvent être les causes principales des infections nosocomiales.

Le biofilm a été directement associé aux infections liées aux dispositifs médicaux puisque ce mode de vie assure la survie des bactéries pathogènes dans l'environnement hospitalier en lui procurant une protection contre l'action des agents antimicrobiens ainsi que les défenses immunitaires du patient (**Aboualigalehdari et al., 2021**). Plusieurs mécanismes sont responsables de la résistance aux biofilms, notamment la production de matrice extracellulaire du biofilm, la densité élevée des cellules, la réduction du taux de croissance, la régulation positive des pompes d'efflux des médicaments, les réponses au stress et l'apparition de cellules persistantes [(**Wuyts et al., 2018**),

Dans le contexte de recherche de nouvelles stratégies pour faire face à la menace des biofilms, les huiles essentielles (HE) représentent une alternative valable dans le traitement des biofilms bactériens et fongiques [(**Karpinski et al., 2021**), (**Butassi et al., 2021**)].

La lavande est l'une des plantes les plus cultivées au monde, appartenant à la famille des *Lamiaceae*, et les espèces les plus communes sont : *L. angustifolia* L. *stoechas* (lavande Française), *L. latifolia* et leurs hybrides (**Winska et al., 2019**). Les HE de lavande ont montré une activité antivirale contre le virus de l'herpès simple de type 1 (**Minami et al., 2013**), une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (SARM, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) et contre les souches résistantes à la vancomycine d'*Enterococcus* sp. (**Roller et al., 2009**).

Les liposomes sont des vésicules lipidiques sphériques constituées d'un ou plusieurs lipides qui servent de supports pour les composés hydrophiles, lipophiles et amphiphiles. Ils ont été

largement utilisés pour encapsuler plusieurs médicaments, car ils protègent les médicaments contre la dégradation métabolique indésirable, augmentent leur accumulation au site cible et réduisent leur toxicité.

L'encapsulation des HE dans les liposomes représente une stratégie établie pour surmonter certaines limites dans l'utilisation des HE, en ce qui concerne leur stabilité à l'oxygène, à la lumière et à la température, diminue l'évaporation ou le taux de transfert vers l'environnement extérieur.

Suite aux situations difficiles de cette année 2022 et de la pandémie du Covid 19, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en raison de la fermeture des laboratoires de recherche. En conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des articles portant sur notre thème de départ intitulé : L'activité anti-biofilm de *Lavandula angustifolia* sur le biofilm en milieu hospitalier

La présente analyse avait pour but d'examiner les propriétés anti-biofilm de l'huile essentielle de la lavande sous forme libre et encapsulée dans les liposomes sur une souche fongique formatrice du biofilm.

# Synthèse

# Bibliographique



## Chapitre 01 : Les biofilms dans le secteur médical

### 1. Historique

La théorie du mode de vie des bactéries non pas libres mais adhérentes sur une surface fut avancée par Henrici en 1932 (**Henrici, 1936**). Il observa sur des lames de verre plongées dans un aquarium, le développement de bactéries sur la surface des lames. Le lavage sous un robinet était insuffisant pour décrocher les bactéries. Il constata aussi, que les bactéries étaient abondantes et diverses. Ses observations des micro-organismes dans l'eau lui permirent d'établir une évidence acceptée seulement depuis quelques décennies : les bactéries sont majoritairement adhérentes sur une surface pour croître et non libres dans leur environnement (**Henrici, 1933**).

Le concept de « **biofilm** » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé. En 1943, Claude Zobell, considéré comme le père de la microbiologie marine, a examiné les populations marines par microscopie directe et démontra que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension. ZoBell et Anderson en 1936 ont noté que les bactéries sont généralement plus actives dans les petits que dans les grands récipients de forme similaire. Étant donné que les petits récipients présentent une surface relativement plus solide par unité de volume d'eau stockée que les grands récipients, ils ont conclu que les surfaces solides sont bénéfiques pour les bactéries dans les solutions nutritives diluées [(**Zobell, 1943**) ; (**Bezoui 2016**) ; (**Lagrafeuille, 2016**)].

Ce résultat ne sera expliqué qu'en 1978 lorsque le microbiologiste John W. Costerton démontra pour la première fois l'existence des biofilms, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes [(**Costerton *et al.*, 1978**) ; (**Lappin-Scott *et al.*, 2014**)].

Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixée sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines, présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surfaces des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms (**Roux et Ghigo, 2006**).

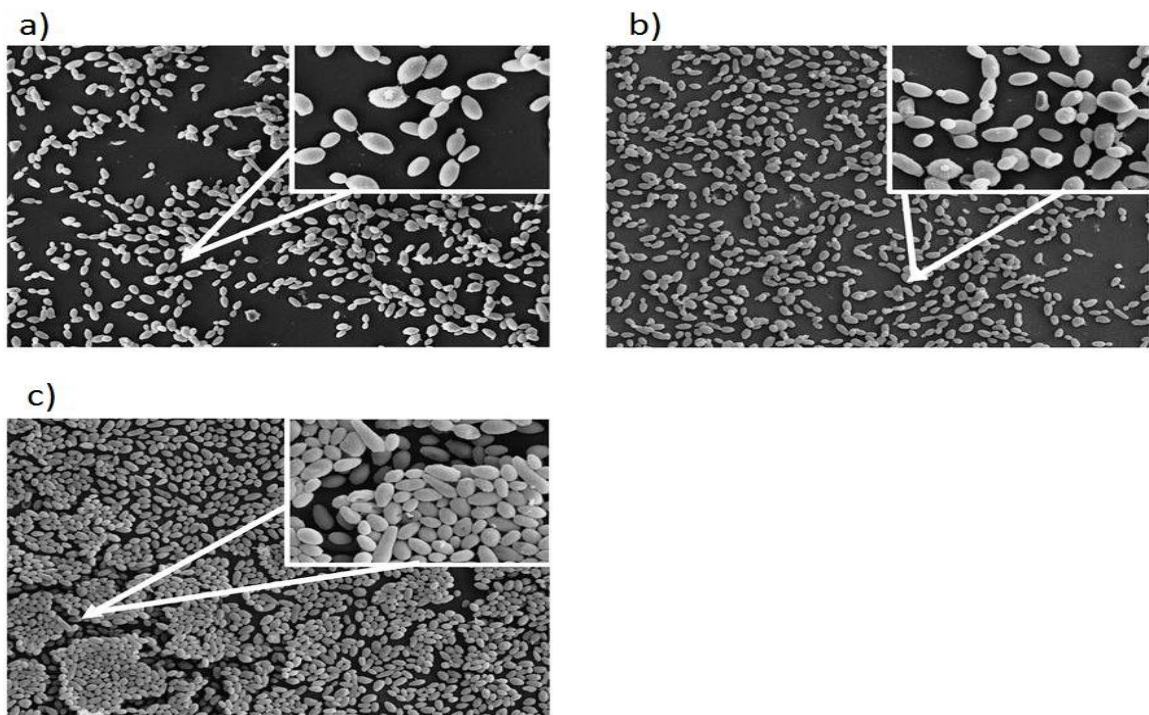
Le biofilm est considéré comme un enjeu primordial par sa structure organisée construite par presque toutes les bactéries qui est composée d'acides nucléiques, de lipides, de protéines et de polysaccharides.

Dans le biofilm, les bactéries devient plus persistant dans l'organisme hôte, ce qui constitue un problème médical important (**Ben Abdallah *et al.*, 2020**).

### 2. Définition du biofilm

Un biofilm est une communauté de micro-organismes dans lesquels les cellules adhèrent les unes aux autres et souvent aussi à une surface : les cellules sont intégrées et protégées au sein d'une matrice extracellulaire composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par les mêmes micro-organismes impliqués (**figure 1**) (**Speranza *et al.*, 2020**).

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des microorganismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile. Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement, ils peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques (**Chibi, 2015**).

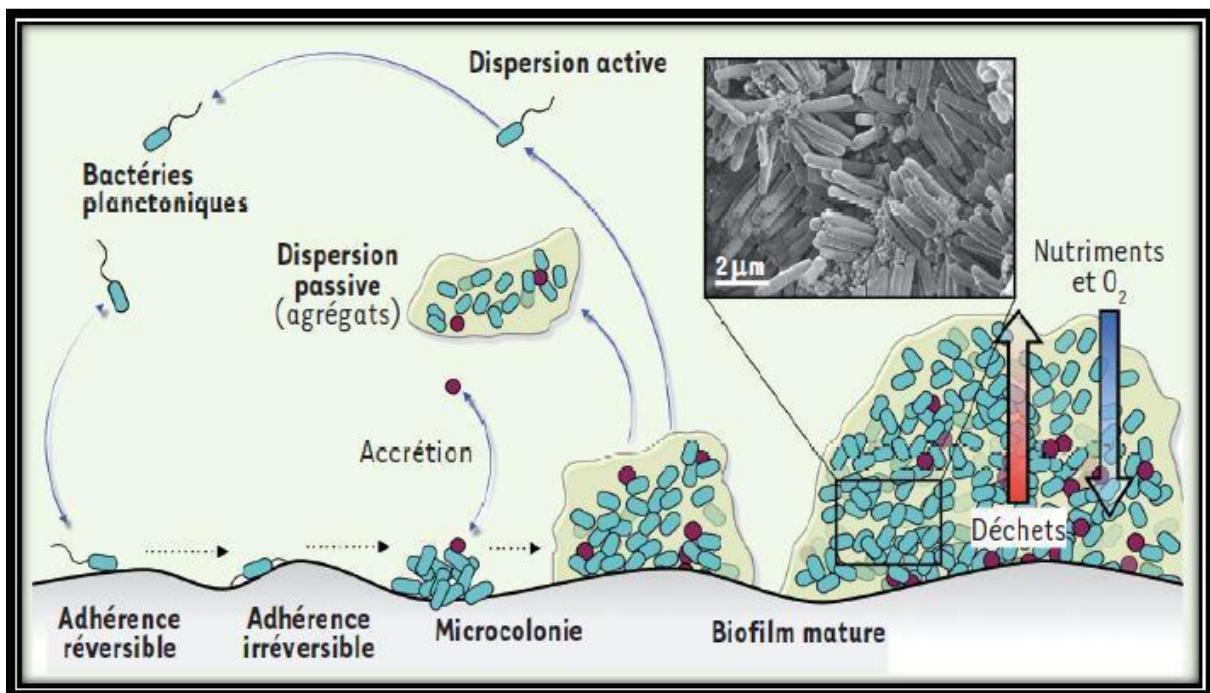


**Figure 1** : Représentation micrographique du développement du biofilm de *Candida auris* cultivé pendant 4h (a), 12h (b) et 24h (c) ; grossissement inférieur (X1000) ; grossissement supérieur (X5000) (**Ryan *et al.*, 2018**)

## 3. Les étapes de la formation du biofilm

La formation d'un biofilm est initiée en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène ou de nutriments ou la présence d'un traitement. Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surface ; incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou sur tout support retrouvé dans le sol ou les milieux aquatiques.

Il existe généralement quatre étapes de formation des biofilms, et comprennent l'adhésion ou adhérence, la multiplication et croissance du biofilm, sa maturation et enfin la dispersion ou étape finale du cycle de vie du biofilm ; ces étapes sont résumées dans la **Figure 2** :



**Figure 2** : Représentation schématique montrant le développement d'un biofilm

(Lebeaux *et al.*, 2014)

### 3.1 Adhésion réversible

L'adhésion c'est étape clé (**Pantaleon, 2015**). Les bactéries planctoniques sont confrontées à un choix dans l'environnement : nager ou adhérer (**Belas, 2013**). L'adhésion initiale est une étape primordiale pour la mise en place d'un biofilm.

La surface sur laquelle les bactéries vont adhérer peut être biotique (tissus, peaux, muqueuses, yeux, poumons, etc.) ou abiotique (implants médicaux, coques de bateau, rochers, etc.) ou, dans un premier temps, l'adhésion est dite réversible (**Tasse, 2017**).

L'adhésion réversible a lieu lors des premiers contacts entre la bactérie et surface, sa durée est de l'ordre de quelques secondes (**Pessereau, 2015**). Les bactéries planctoniques, déclenchant leur passage d'un état unicellulaire nomadique à un état multicellulaire sédentaire grâce à plusieurs changements phénotypiques. En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Les pilis ou les flagelles, peuvent également contribuer à la fixation des cellules microbiennes à la surface. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le PH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide et par la nature de la surface elle-même, sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire [(**Nudleman et Kaiser, 2004**) ; (**Beloin *et al.*, 2008**) ; (**Lopes, 2019**)].

### 3.2 Adhésion irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolysaccharides par les bactéries et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surface, et surtout grâce à des structures d'adhérences variables selon les espèces bactériennes, par exemple pour les bactéries Gram négatives, il s'agit des pilis des fimbriae et des curli, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface, et pour les bactéries Gram-positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces molécules d'adhésions permettent d'établir des contacts cellule- surface et des contacts cellule-cellule [(**Vallet *et al.*, 2001**) ; (**Van Houdt et Michiels, 2005**) ; (**Beloin *et al.*, 2008**) ; (**Lemon *et al.*, 2008**)].

### 3.3 Maturation du biofilm

La phase de maturation du biofilm se caractérise par une augmentation de la taille de la structure via la multiplication cellulaire et la synthèse d'exopolysaccharides (**Picard, 2011**).

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et des pores entre les micro-colonies, permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes dans les régions enfouies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (**Filloux et Vallet, 2003**).

Le développement des micro-colonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelle surface (**Roux et Ghigo, 2006**). Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à formation d'un film hétérogène tridimensionnel. Dans cette structure tridimensionnelle les colonies se trouvent normalement séparées les unes des autres par des canaux où circule le flux du milieu qui permet la diffusion des nutriments, d'oxygène et parfois d'agents antimicrobiens [(**Costerton et al., 1995**) ; (**Donlan, 2002**)].

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une évolution du profil d'expression des gènes.

Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé le quorum sensing. Ce système est fondé sur la production des molécules diffusibles par les bactéries. Par exemple les acyl-homosérine lactones (AHL) chez les bactéries à gram négatif qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné [(**Filloux et Vallet, 2003**) ; (**Behlau, 2008**)].

### 3.4 Dispersion du biofilm

La dispersion ou détachement constitue la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm et peut être active ou passive (**Kaplan, 2010**). Ce phénomène pourra être initié par différents facteurs tels qu'une force externe comme les forces de cisaillement qui provoquent la destruction complète ou partielle du biofilm, c'est la dispersion passive, ou en réponse à un stimulus interne ou externe tel que la diminution de la qualité des nutriments ou la libération du signal de dispersion ce qui provoque la libération des cellules planctoniques, c'est la dispersion active (**Fleming et Rumbaugh, 2017**).

## 4. Les facteurs favorisant la formation du biofilm

### 4.1 Caractéristique de surface

Quel que soit la surface en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (**Hajoubi, 2019**).

L'attachement a lieu préférentiellement sur des surfaces rugueuses (présence d'aspérités), hydrophobes et préalablement recouvertes d'un film protéique (**Donlan et Costerton, 2002**).

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités. Néanmoins, certaines souches sauvages des bactéries colonisent aussi des surfaces lisses [(Martinez et Casadevall, 2007) ; (Hajoubi, 2019)].

### 4.2 Caractéristique du milieu

- La température de croissance peut affecter sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007).
- Le pH conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité.
- La concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.
- Les sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez et Casadevall, 2007).
- Les concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008). L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (calcium, magnésium) entraîné une augmentation de l'attachement bactérien.
- Hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

### 4.3 Caractéristique des microorganismes

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exo-polysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface.

L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides...

Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les

fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

### 5. Le quorum sensing

#### 5.1 Définition

C'est un mécanisme de régulation des gènes à deux composés, basé sur la densité cellulaire et l'environnement extracellulaire. En résumé, il s'agit d'un système de communication entre les bactéries. Son principe repose sur la sécrétion d'un peptide auto-inducteur (**PAI**) dans le milieu externe qui, en s'accumulant pour atteindre une concentration seuil, ce qui va permettre l'expression de certains gènes de manière simultanée chez toute la population de bactéries (**Zimmermann-Meisse, 2016**).

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm. Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm et il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (**Irie et Parsek, 2008**).

#### 5.2 Mécanisme du Quorum Sensing

Il s'agit de mécanismes de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (**Costerton *et al.*, 1999**). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques.

La nature et la fonction des molécules signalant les échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (**Costerton, 1999**).

### 6. Le domaine d'intervention des biofilms dans le secteur médical

La principale préoccupation des biofilms dans les hôpitaux est directement liée à leur implication dans diverses maladies infectieuses. Le problème de l'infection par le biofilm a été largement documenté depuis les travaux pionniers de William Costerton dans les années 1980 [(Dunny *et al.*, 2014) (Harriott et Noverr, 2011)].

Plusieurs catégories sont fréquemment citées. Dans la première catégorie, nous avons trouvé des infections dans des parties du corps de patients ayant subi des procédures invasives (Kathju *et al.*, 2009).

Contamination par l'air, contact avec des parties du corps du personnel médical ou par du matériel médical qui n'a pas été correctement stérilisé ou stérilisé. Ensuite, deux types d'infections causées par les biofilms sont étroitement associés aux implants, à savoir les infections des cathéters veineux centraux et les infections des cathéters urinaires (Trautner et Darouiche, 2004). La résistance du biofilm au traitement antibiotique complique le traitement des patients atteints de telles maladies (Costerton *et al.*, 2005).

Il est fréquent de devoir procéder au retrait du dispositif infecté. De manière plus générale, tout matériel implanté est susceptible de servir de base pour le développement d'un biofilm si les conditions d'hygiène lors de l'opération ne sont pas optimales.

#### 6.1 L'importance de biofilm dans le secteur médicale (les infections nosocomiales)

Les biofilms sont responsables de diverses maladies infectieuses humaines, Plus de 90% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, pacemakers, cathéters de dialyse péritonéale, sondes de tympanostomie, sondes urinaires, prothèses vocales...) ,82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés (Archibald et Gaynes, 1997).

La liste suivante, non exhaustive, regroupe les principales infections liées à la présence de biofilm (Lewis, 2008) :

- ❖ Infections ou maladies :
  - Caries dentaires,
  - Gingivites,
  - Péritonite,



- Mucoviscidose,
- Otite moyenne (notamment chez l'enfant),
- Ostéomyélites,
- Prostatites.
- ❖ Infections nosocomiales :
  - Sutures,
  - Lentilles de contact,
  - Port d'un implant médical :
    - Sonde urinaire,
    - Cathéter veineux central,
    - Sonde endotrachéale,
    - Sonde de gastrotomie,
    - Valve cardiaque artificielle,
    - Prothèse orthopédique,
    - Broches (ostéomyélite)

La formation de biofilm dépend de plusieurs facteurs :

- le nombre de cellules présentes
- vitesse du flux du liquide dans lequel se trouve le dispositif
- propriétés physico-chimiques de la surface (**Donlan, 2001**).

En comparaison, les cathéters veineux centraux sont les implants médicaux les plus dangereuses apparitions d'infections nosocomiales (**Klevins, 2005**). Cela pose de sérieux problèmes de la santé publique puisque les traitements systémiques de routine des patients atteints d'infections de ce type se révèlent le plus souvent inefficaces, souvent difficiles à traiter du fait de leurs propriétés d'antibiorésistance (**Donlan, 2008**).

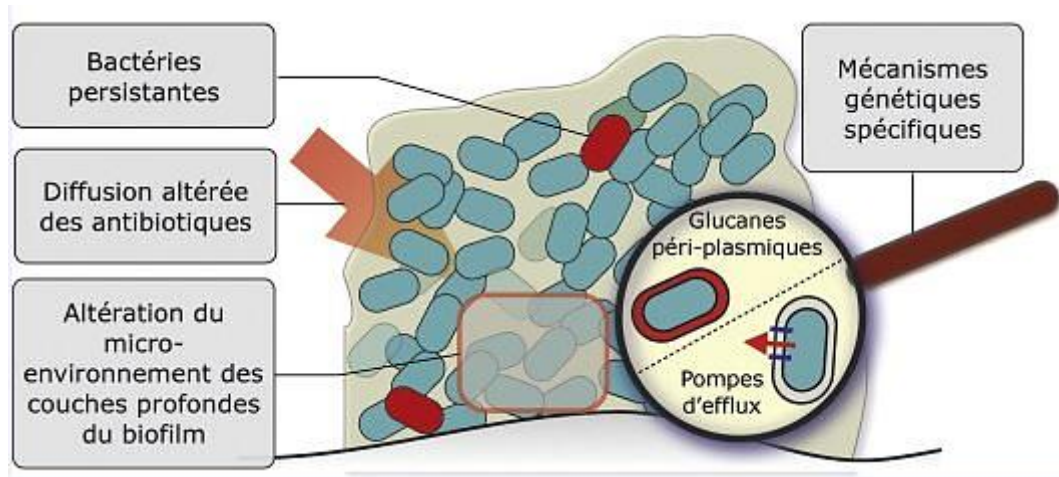
### 6.2 La résistance des biofilms aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance conventionnels, basés sur l'altération enzymatique, la mutation ou la pompe à efflux membranaire, ne semblent pas fonctionner pour la résistance observée dans les biofilms bactériens (**Mah et O'Toole, 2001**). En revanche, la dispersion bactérienne des biofilms permet généralement de constater l'effet de antibiotiques appropriés [(**Anwar et al., 1989**); (**Williams et al., 1997**)].

Trois hypothèses principales sont avancées pour expliquer le mécanisme de résistance des biofilms aux antibiotiques (**Stewart et Costerton, 2001**). La première repose sur le concept de

barrière physique qui expliquerait la pénétration lente et incomplète de certains antibiotiques. La deuxième hypothèse porte sur l'environnement spécifique des biofilms, dont les régions les plus profondes sont riches en résidus acides et pauvres en oxygène et en nutriments, ce qui peut interférer avec l'action des antibiotiques. Enfin, la dernière hypothèse repose sur les changements phénotypiques observés dans certains biofilms et leurs microorganismes constitutifs pouvant présenter des formes plus résistantes (**Figure 3**).

Ces trois hypothèses reposent sur la nature communautaire et multi-cellulaire du biofilm. La plupart des spectres antibiotiques ont été étudiés sur des formes planctoniques, Ainsi, de nouvelles concentrations minimales inhibitrices, ainsi que de nouvelles associations médicamenteuses doivent être envisagées. La recherche actuelle tente d'examiner les molécules capables de se décomposer ou pour empêcher la formation de matrice polysaccharidique, voire d'agir sur les signaux de différenciation de "quorum sensing".



**Figure 3** : Résistance des biofilms aux antibiotiques (Lebeaux et al., 2014)

### 6.3 Moyen de lutte contre la formation du biofilm

La formation des biofilms est considérée comme une étape importante dans le cycle de vie de la plupart des espèces bactériennes, et peut être liée à des épidémies, à la résistance aux antimicrobiens ou à la contamination de produits médicaux et industriels (Caro-Astorga *et al.*, 2020). Les procédures d'assainissement conventionnelles ne sont pas totalement efficaces contre les biofilms et peuvent induire la sélection de phénotypes résistants (Ling *et al.*, 2020). Pour combattre les biofilms on peut utiliser des stratégies à titre préventif ou curatif.

### 6.3.1 Stratégies préventifs

De nombreuses approches peuvent être utilisées pour empêcher la formation de biofilms, on peut citer à titre non exhaustif :

- Inhibition de l'adhésion irréversible par interférence avec la production d'adhésines.
- Blocage de l'interaction des adhésines avec leurs récepteurs.
- Utilisation d'agents chélateurs qui inhibent le transport de métaux essentiels vers l'intérieur des cellules.
- Blocage des voies biochimiques qui sont cruciales pour la formation de biofilms, et inhibition de la biosynthèse des nucléotides de signalisation tels que le di-guanosine-mono-phosphate cyclique (c-diGMP), qui peut maintenir les bactéries à l'état planctonique (**Lebeaux et al., 2014**).
- L'interférence avec la communication bactérienne par l'utilisation d'inhibiteurs du signal du quorum sensing (QS).
- L'utilisation de bactéries non pathogènes qui peuvent concurrencer les agents pathogènes en produisant des toxines (par exemple, des bactériocines) ou d'autres substances (**Wu et al., 2015**).
- ✚ Le développement des nanomatériaux et des technologies correspondantes offre une nouvelle possibilité de développer des agents antimicrobiens pour contrôler les biofilms microbiens. (**Rizzello et al., 2013**).
- ✚ Les nanomatériaux tels que l'argent en nanomètres, le dioxyde de titane et l'oxyde de cuivre présentent de bonnes activités antibactériennes. [(**Pelgrift et Freidman, 2013 ; Besinis et al., 2017**)].

### 6.3.2 Stratégies curatives

Si la formation d'un biofilm ne peut être empêchée, il existe des méthodes pour le désassembler comme l'induction de la dispersion par :

- ✚ La pectine méthylestérase une enzyme capable de réduire la formation de biofilm dans les bioréacteurs (**Torres et al., 2011**).
- ✚ La production de D-acides aminés pendant la phase stationnaire tardive induisant la dispersion du biofilm de multiples bactéries (**Kolodkin-Gal et al., 2010**).

- ✚ L'application de chélateurs de métaux divalents, d'inhibiteurs du signal QS, comme on peut utiliser aussi les bactériophages ou bien on combine les antibiotiques avec du sucre ou de l'argent pour éradiquer les cellules persistantes (**Kim *et al.*, 2016**).
- ✚ Pour assurer la digestion de la matrice organique du biofilm des détergents à base d'enzymes (lipases, protéases...) peuvent être utilisés, comme ils sont moins nocifs pour l'environnement (**Hasan *et al.*, 2010**).
- ✚ L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique. De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément. Cependant il existe des différences quantitatives. En fait, les effets antibactériens des huiles essentielles se sont avérés supérieurs aux effets antibactériens des composants principaux testés individuellement. L'association des principaux composés actifs agirait de façon synergique en potentialisant l'action antimicrobienne de l'huile essentielle (**Lambert *et al.*, 2013**). Les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures [(**Cosentino *et al.*, 1999**), (**Dorman et Deans, 2000**)].

## Chapitre 02 : *Lavandula angustifolia* (la lavande, الخزامة)

La lavande est une plante très rustique que l'on trouve dans les régions tempérées chaudes ; comme la Méditerranée occidentale. Il pousse dans un sol rocailleux ou rocheux, garrigue. De plus, toutes les parties de la plante présentent une excellente adaptation aux environnements secs et arides. Les arbres en particulier ont de nombreuses racines, s'enfonçant profondément dans le sol, à la recherche d'un maximum de fraîcheur durant l'été (Maud belmont ,2013).

### 1. Taxonomie

*Lavandula angustifolia*, elle est également appelée lavande vraie ou lavande officinale. A Rome, les femmes l'utilisaient pour adoucir les vêtements : c'est pour cette raison que le mot lavande vient du verbe latin lavare (laver) (Menaceur,2015), à l'origine lavanda en italien.

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Lavandula*

Espèce : *Lavandula officinalis* = *Lavandula angustifolia*



Figure 4 : Planche de *lavandula angustifolia*

### 2. Description botanique

*Lavandula angustifolia* ou encore lavande vraie, est une plante herbacée vivace de la famille des Lamiacées, étant l'une des plantes aromatiques et médicinales les plus appréciées au monde (Babaee Khalajee *et al.* , 2017). Elle pousse à l'état sauvage, sur les terres rocailleux et ensoleillés et s'adapte bien aux hivers plus froids des régions tempérées si le sol est bien drainé. La floraison s'épanouit de Juillet à Août, en dégageant un parfum agréable, frais, léger et fleuri (Vialard *et al.*, 2008).



**Figure 5:** (1) Les feuilles (andreasbalzer, 2009), (2) Les fruits de *Lavandula angustifolia*.

### 3. Usage thérapeutique

Les fleurs de lavande et les huiles essentielles sont principalement utilisées dans l'industrie Cosmétiques et soins personnels (Sadraei *et al.*, 2019). Cette plante Aujourd'hui, est couramment utilisée dans les parfums, les savons, les poudres de talc et les bougies. Parfois utilisé en petites quantités pour aromatiser le thé et les aliments (Chu, Kemper, 2001). Elles est également utilisé dans les médecines traditionnelles et différentes parties du monde pour le traitement gastro-intestinal, nerveux et rhumatismaux (Hajhashemi *et al.*, 2003).

En médecine arabe, la lavande Traitement des problèmes gastriques et rénaux. Dans les recherches pharmacologique et biologique les extraits, les fractions et les huiles essentiels de *L. angustifolia* auraient des effets relaxants, hypnotiques, anti-convulsivants, anti-oxydants, anesthésiques locaux (Sadraei *et al.*, 2019). De plus, elle est utilisée comme expectorant, anti-spasmodique et anti-septique désinfectant des plaies, contre les problèmes dermiques, possède

des propriétés antimicrobiennes et anti-carcinogènes, sédatif, anti-dépresseur, anti-oxydant, anti-inflammatoire et insecticide (**Boughendjioua, 2017**).

#### **4. Activité anti-biofilm de l'huile essentiel de *Lavandula angustifolia***

##### **4.1 Composition chimique**

La composition chimique et la quantité d'huile essentielle de *L.angustifolia* varient en fonction des conditions de culture, de la saison, du type de plante et même de la technique d'extraction.

Les principaux constituants de *L.angustifolia* sont Linalyl acétate (**32,98 %**), Linalool (**28,92 %**),  $\beta$ -caryophyllène (**4.62 %**), Acétate de lavandulyle (**4.52 %**), Z- $\beta$ -ocimène (**4.44%**),terpinène-4-ol (**4,32 %**), E- $\beta$ -ocimène (**3.09 %**),  $\beta$ -farnésène (**2.73 %**). Le total est environ **85,62 %**.

##### **4.2 Propriétés physico-chimique**

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante, mais elles sont également volatiles, ce qui les rend spéciales. Elles sont différentes de ce qu'on appelle les huiles grasses. Elles sont liposolubles, solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (**Afssaps, 2008**).

Il est donc essentiel de pouvoir mettre le tensioactif en suspension dans l'eau car elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé.

Elles sont pour la plupart colorées : ex : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclérée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation (**Couic-Marinier Lobstein, 2013**). Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (**Afssaps, 2008**).

##### **4.3 L'effet du *L. angustifolia* sur la formation du biofilms**

Les biofilms microbiens sont notoirement difficiles à éradiquer avec des agents antimicrobiens standards tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012**). D'autre part, grâce à des études récentes, l'HE s'est avérée très efficace contre les biofilms microbiens et peut agir de plusieurs manières. Selon (**Niu et Gilbert, 2004**), de faibles concentrations d'huile essentielle inhibent la formation de biofilm bactérien par de multiples mécanismes. En particulier, l'activation des gènes stimulant la réponse réduit à son tour la production de polysaccharides extracellulaires, le principal composant de l'EPS. De plus,

les HE peuvent interagir avec les protéines de surface bactériennes, inhibant ainsi leur fixation, inhibant ainsi la formation de biofilm. De plus, contrairement à la plupart des antimicrobiens, l'HE a la particularité d'agir directement sur les biofilms déjà formés. (Selon Niu et Gilbert ,2004), l'HE a la capacité d'éradiquer les biofilms microbiens en solubilisant leur matrice extracellulaire.

D'autres auteurs ont souligné que les HE sont capables de diffuser et de déstabiliser la matrice polysaccharidique des biofilms en raison de leurs fortes propriétés antimicrobiennes intrinsèques (Ouhayoun, 2003).

L'évaluation des effets destructeurs du biofilm des huiles essentielles a montré que les effets destructeurs du biofilm des huiles essentielles étaient dose-dépendants. Des concentrations plus élevées d'huiles essentielles ont montré les effets destructeurs du biofilm. Parmi les huiles essentielles examinées, les huiles essentielles de *Cuminum. cyminum* et *L. angustifolia* ont montré le plus grand effet sur les biofilms, suivies des huiles essentielles de *Ziziphora. tenuior* (tableau 1). Bien que l'activité antifongique de *L. angustifolia* soit inférieure à celle des huiles essentielles de *C. cyminum* et *Z. tenuior*, l'huile essentielle de *L. angustifolia* a été testée pour une destruction du biofilm supérieure à celle de l'huile essentielle de *C. cyminum*, suivie de l'huile essentielle de *Z. tenuior*. L'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *L. angustifolia* sur les biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* a été confirmé (Samaneh et al., 2019).

**Tableau 1 :** Effets destructeurs du biofilm des huiles essentielles sur les isolats cliniques de *Candida auris* (%) (n=12) (Samaneh et al., 2019)

Concentration d'huile essentiel µl/MI	16	8	4	2	1
<i>Cumin cyminum</i>	48.8%	22.5%	12.7%	6.2%	2.5%
<i>Ziziphora tenuior</i>	42.5%	18.5%	10.5%	5.6%	1.7%
<i>Lavandula angustifolia</i>	49.3%	22.7%	14.89%	8.8%	4.8%



Matériel  
Et  
Méthodes

Dans cette partie, nous allons traiter un article scientifique qui a pour l'application de, l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia*, libre ou encapsulée dans des liposomes, pour éliminer les biofilms primaires et les cellules persistantes de *C. auris*.

**Article :** Activity of Free and Liposome-Encapsulated Essential Oil from *Lavandula angustifolia* against Persister-Derived Biofilm of *Candida auris*. Ce travail a été réalisé par **Elisabetta et al., 2022.**

### 1. Souche testée

La souche DSM 21092 de *Candida auris* (collection allemande DSMZ) a été maintenue dans du glycérol à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cette souche a été cultivée dans des flacons avec agitation contenant du bouillon de trypticase soja (TSB) (OXOID, Basingstoke, Royaume-Uni) avec 1 % *p/v* de glucose, incubés à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 tr/min. La culture a été faite à partir d'une pré-culture d'une nuit préparée dans le même milieu.

### 2. Analyse GC-MS de l'huile de *L. angustifolia*

La composition de l'huile de *L. angustifolia* (Natura Zen Srl, Italie) a été déterminée par analyse GC-MS effectuée avec un Agilent 6850 GC (Milan, Italie), équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (phase stationnaire de 5 % de phényle méthyl poly siloxane), couplé à un détecteur Agilent 5973 Inert MS fonctionnant en mode full scan ( $m/z$  18–550) à une fréquence de 3,9 Hz et avec la source d'ions EI et les températures du filtre de masse quadripolaire maintenues, respectivement, à  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1 mL/min. La température de l'injecteur était de  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le délai du solvant était de 3 min.

Les composés ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse EI à 70 eV avec les spectres de substances connues présentes dans la bibliothèque spectrale de masse NIST 14.

De plus, l'identification a été étayée par l'indice de rétention de Kovats (RI) calculé pour chaque analyte).

### 3. Préparation de l'huile de *L. angustifolia* encapsulée par liposomes

L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) et cholestérol (Chol) ont été achetés auprès d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

De petites vésicules uni-lamellaires (SUV) constituées de PC/Chol (70/30 mol/mol) ont été préparées. Les liposomes ont été préparés à une concentration lipidique totale de 0,1 mM, des agrégats mélangés d'huile de PC, de Cholestérol et de *L.angustifolia* ont été dissous dans le

chloroforme et par la suite le solvant a été évaporé sous un flux d'azote gazeux. Des quantités appropriées de *L.angustifolia*, en particulier 20 µL ont été ajoutées à 200 µL de liposomes, de sorte que l'huile dans la formulation de liposomes avait une concentration de 10% v/v. Ensuite, les films lipidiques ont été hydratés avec de l'eau pendant 1 h. La suspension lipidique a été congelée 6 fois, des liposomes ont été obtenus en sonifiant la solution pendant 40 min.

Les médicaments déchargés ont été retirés par la colonne SephadexG50 pour purifier la formulation finale et évaluer l'efficacité de l'encapsulation. Des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été effectuées à l'aide de Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni), pour vérifier le potentiel zeta et la taille (**tableau 2**) L'analyse a été réalisée avec le laser He-Ne 4 mW fonctionnant à 633 nm à un angle de diffusion fixé à 173° et à 25°C. Les résultats ont été déterminés trois fois pour chaque échantillon et chaque mesure a été effectuée au moins en trois exemplaires.

#### **4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de caspofungine**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de caspofungine (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) contre *C. auris* ont été déterminées avec une méthode de micro-dilution, telle que décrite par CLSI avec quelques modifications. Les concentrations de caspofungine de 0,1 à 5 µg/mL ont été ajoutées aux puits d'une microplaque de 96 puits contenant la souche *C.auris* dans le TSB avec 1 % p/v de glucose. La plaque a été incubée à 37 °C pendant 24 h. La valeur CMI a été déterminée comme la concentration la plus faible inhibant la croissance fongique à 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (SynergyH4; BioTek Instruments, Agilent Technologies, Winooski VT 05404 États-Unis).

#### **5. Effet de l'huile de *L. aungustifolia* et de l'huile encapsulée de liposomes sur les cellules planctoniques de *C. auris***

L'effet de l'huile de *L. angustifolia* et de l'huile encapsulée en liposomes sur les cellules planctoniques de *C. auris* a été évalué par une incubation avec agitation des cultures fongiques dans des flacons et des concentrations de l'huile libre de *L. aungustifolia* ou d'huile encapsulée par liposome, allant de 0,005 à 0,5 % v/v.

Des solutions mères de l'huile ont été préparées dans le diluant Tween 80 à 0,1 % v/v ; les solutions mères de l'huile encapsulée par liposomes ont été préparées dans de l'eau distillée. Les cultures ont été inoculées avec un volume approprié d'une pré-culture d'une nuit préparée dans les mêmes conditions. Les flacons ont été incubés à 37 °C pendant 24 h à 200 tour/min.

La croissance cellulaire a été surveillée par le spectrophotomètre à 590 nm et la réduction de la croissance exprimée en pourcentage par rapport un contrôle négatif.

### **6. Formation et quantification du biofilm**

Les cellules de *C. auris* utilisées pour la formation du biofilm ont été obtenues en collectant des cellules en phase exponentielle à partir d'une culture avec agitation dans le TSB additionné du glucose à 1% et une suspension de RPMI 1640 (sans glutamine) (Lonza, Suisse) à une charge initiale de  $10^6$  UFC/mL. Des aliquotes de 100  $\mu$ L de suspensions cellulaires ont été inoculées dans une microplaque en polystyrène à 96 puits et incubées à 37°C pendant 24 ou 48 h. Les puits ont été ensuite lavés trois fois avec 200  $\mu$ L de PBS pour éliminer les cellules non adhérentes.

La quantification de la biomasse du biofilm a été réalisée par coloration avec le cristal violet. Pour quantifier la formation du biofilm, la valeur seuil de densité optique (DOc) a été calculée comme suit : la souche testée a été interprétée comme étant négative ( $DO \leq DOc$ ), faible ( $DOc \leq DO \leq 2DOc$ ), modérée ( $2DOc < DO \leq 4DOc$ ) ou forte ( $4DOc < DO$ ).

### **7. Détection des cellules persistantes**

La quantification des cellules persistantes dans le biofilm de *C. auris* a été constaté avec de la caspofungine tamponnée à pH 7 avec de l'acide morpholino-propane-sulfonique de 0,165 M (MOPS, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) à des concentrations allant de 5 à 200 $\mu$ g/mL pendant 24 h à 37 °C en milieu RPMI. La solution mère de caspofungine à une concentration de 500 mg /mL a été préparé en DMSO 1,3 % v/v, il a été démontré que le DMSO n'était pas toxique contre *C. auris*.

Les biofilms ont été abondamment lavés avec du PBS, puis perturbés par grattage et tourbillonnés vigoureusement pendant 30 s avant la dilution en série et l'ensemencement sur un milieu de gélose YPD (1% d'extrait de levure, 2% de bactopéptone, 2% de glucose). Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 48 h. Le nombre de cellules survivantes (persistants) a été exprimé en UFC par puits.

### **8. Développement d'un biofilm dérivé de cellules persistantes de *C. auris***

Le petit nombre de cellules non sensibles au traitement par la caspofungine (persistantes) dans le biofilm primaire de 48 h était l'inoculum d'un nouveau biofilm (biofilm dérivé de cellules persistantes), qui s'est développé *in situ* dans la microplaque de 96 puits.

Par conséquent, pour obtenir le biofilm dérivé des cellules persistantes, après le traitement à la caspofungine du biofilm primaire, les puits ont été abondamment lavés avec du PBS, et l'incubation a été autorisée pendant 12 jrs au cours de laquelle 200 µL de milieu YPD ont été ajoutés à chaque puits toutes les 24 heures. La masse du biofilm a été estimée toutes les 48 heures par un dénombrement d'UFC.

### **9. Éradication du biofilm avec de l'huile de *L. angustifolia* encapsulée de liposomes libres**

L'activité d'éradication de l'huile de *L. angustifolia* libre et encapsulée avec les liposomes, a été évaluée en exposant les biofilms primaires et les cellules persistantes de *C. auris* pendant 24 h à différentes concentrations de chacun des deux composés allant de 0,05 à 1 % v/v, dans le milieu RPMI et quantifiée la biomasse résiduelle par coloration avec le cristal violet. Le pourcentage d'éradication a été calculé en pourcentage de réduction du biofilm :

$\% \text{ réduction} = (\text{DO}_{570} \text{ contrôle} - \text{DO}_{570} \text{ échantillon}) / \text{DO}_{570} \text{ contrôle} \times 100$ , où la  $\text{DO}_{570}$  du contrôle et la  $\text{DO}_{570}$  correspondait respectivement au biofilm non traité et au biofilm traité.

### **10. Expression génétique dans des biofilms dérivés de *C. auris* persistants traités avec de l'huile libre de *L. angustifolia* et encapsulée dans des liposomes**

L'effet de l'huile libre de *L. angustifolia* et encapsulée dans des liposomes sur l'expression de l'*ERG 11*, de la *SLA 5*, du *HOG 1* et du *CDR1* (**Tableau 02**) dans les biofilms dérivés de persistants de *C. auris* a été analysé à l'aide de la qRT-PCR. En bref, les biofilms dérivés de persistants ont été traités avec de l'huile à 0,05 % v/v ou de l'huile encapsulée par liposomes pendant 24 h à 37 °C. Ensuite, les biofilms ont été grattés de la surface du polystyrène et collectés par centrifugation (3000× g, 5 min). Les granules ont été utilisés pour extraire l'ARN total à l'aide du kit Direct-zolTMRNAMiniprep Plus (ZYMORESEARCH). La pureté et la concentration de l'ARN extrait ont été vérifiées à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA USA). Un total de 1000 ng d'ARN extrait a été rétrotranscrit avec un kit de synthèse d'ADNc iScript™ (Bio-Rad, Milan, Italie) et il a été utilisé comme modèle dans une réaction contenant de l'amorce (0,3 mM) et 1× sensiFAST™ SYBR Green master mix (MeridianaBioline, Aurogene, Rome, Italie). Les amplifications PCR ont été effectuées dans un instrument de PCR en temps réel AriaMx (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, États-Unis), conformément aux instructions du fabricant. La fluorescence a été mesurée à l'aide du logiciel Agilent Aria 1.7 (Agilent Technologies, Inc). L'expression du gène

a été analysée et normalisée par rapport au gène *ACT1* à l'aide du logiciel REST (Relative Expression Software Tool, Weiheinstephan, Allemagne, version 1.9.12) basé sur la méthode Pfaffl. Les rapports d'expression relative supérieurs à  $\pm 1,5$  ont été jugés significatifs. Un test de Brown-Forsythe a été appliqué, suivi du test post-hoc de Tukey.

**Tableau 02 :** séquence et références des l'amorces utilisés pour RT-PCR Quantitative

Gene names	Acronym	Primer name	Sequence (5'→3')
<i>Agglutinin like-sequence 5</i>	ALS5	C.auris_ALS5_F	CCTTCTGGATCGGACACAGT
		C.auris_ALS5_R	AGTTGTGGTGGAGGAACCAG
<i>Genes encoding efflux pumps</i>	CDR1	C.auris_CDR1_F	GAAATCTTGCACTTCCAGCCC
		C.auris_CDR1_R	CATCAAGCAAGTAGCCACCG
<i>Ergosterol biosynthesis enzyme</i>	ERG11	C.auris_ERG11_F	GTGCCCATCGTCTACAACCT
		C.auris_ERG11_R	TCTCCCACTCGATTCTGCT
<i>High-osmolarity glycerol1</i>	HOG1	C.auris_HOG1_F	GACTTGTGGTCTGTGGGTG
		C.auris_HOG1_R	ACATCAGCAGGAGGTGAGC
<i>Actin</i>	actin	C.auris_actin_F	GAAGGAGATCACTGCTTTAGCC
		C.auris_actin_R	GAGCCACCAATCCACACAG

### 11. Microscopie confocale à balayage laser

La présence de persistants dans le biofilm de *C. auris* a également été évaluée par microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Le biofilm a été formé pendant 48 h sur des lames de chambre à 8 puits NuncTMLab-Tek et traité avec 200 µg/mL® caspofungine. Ensuite, il a été soigneusement lavé avec du PBS et coloré avec 5 µM de SYTO9 (ThermoFisher Scientific MA, USA) qui pénètre à la fois dans des cellules viables et non viables, suivi d'iodure de propidium de 20 µM, une coloration nucléaire non vitale couramment utilisée pour identifier les cellules mortes, pendant 15 min à température ambiante, dans l'obscurité. L'observation a été réalisée avec le microscope Zeiss LSM700 à un grossissement de 20 ×.

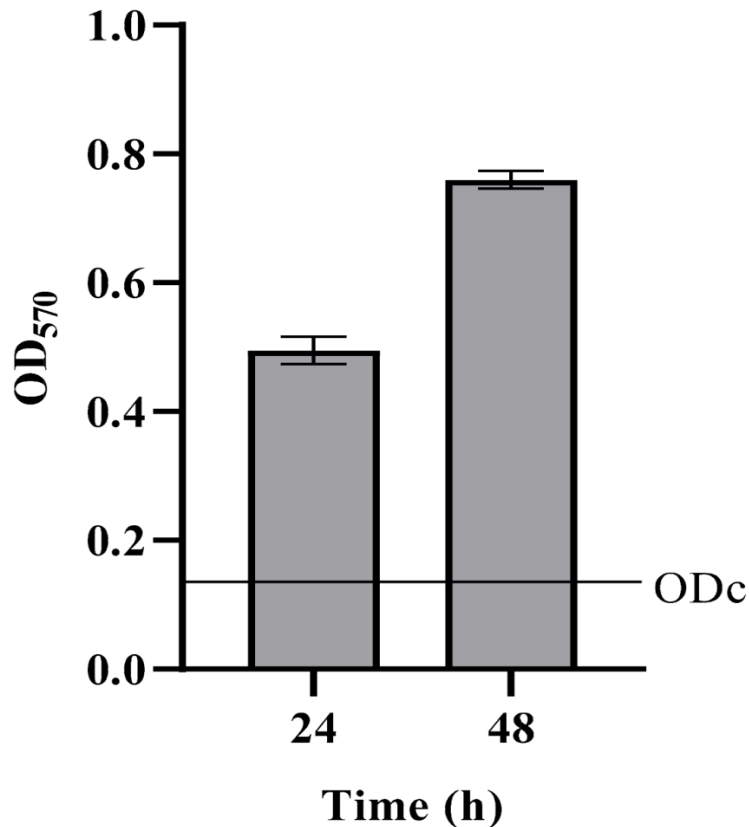
### 12. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPadPrism). Les données ont été rapportées comme la moyenne d'écart-type obtenu à partir de trois expériences indépendantes. Les données sur le développement d'un nouveau biofilm à partir des cellules persistantes et sur l'effet de l'huile libre et encapsulée de *L. angustifolia* sur les cellules planctoniques ont été analysées par une ANOVA suivie du test de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

Résultats  
Et  
Discussion

**1. Détection de cellules persistantes dans les biofilms de *Candida auris***

*Candida auris* (DSM 21092) a formé des biofilms solides *in vitro* sur les puits des microplaques de polystyrène (**Figure 6**). La biomasse totale de la population sessile a augmenté entre 24 et 48 h, montrant qu'un biofilm plus mature s'est formé à la fin de la période d'incubation.

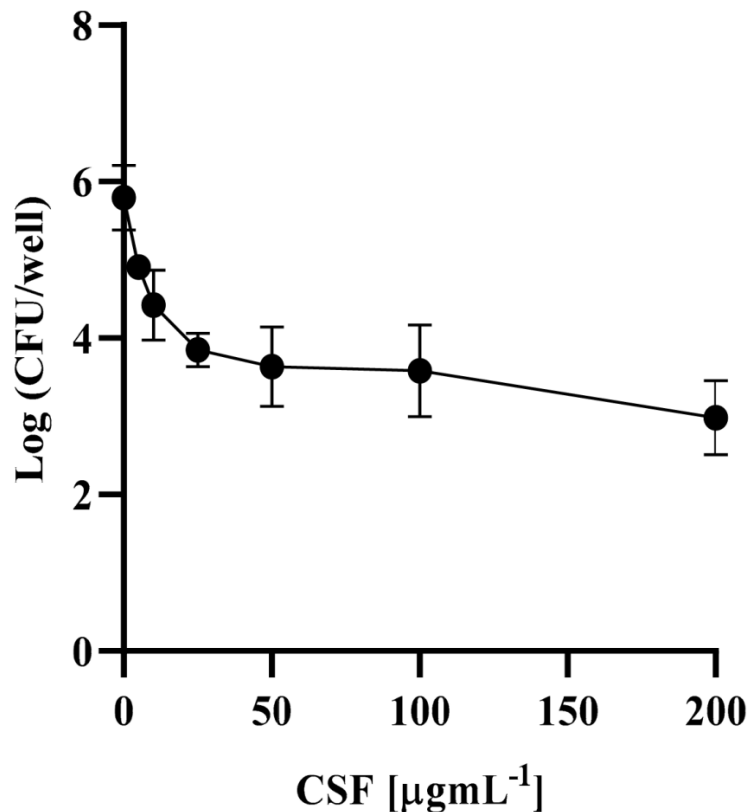


**Figure 6 :** La biomasse totale des biofilms de *C. auris* après 24 et 48 h d'incubation.

DOc = valeur seuil de densité optique. Les données sont la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SD.

Une fois formé sur la surface du polystyrène, le biofilm de 48 h de *C. auris* a été traité avec des concentrations croissantes de caspofungine jusqu'à  $200 \times$  CMI, la valeur CMI de la souche de *C. auris* examinée était de  $1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ . En raison du traitement par la caspofungine, une destruction dose-dépendante de la population de biofilm a été observée (**Figure 7**).



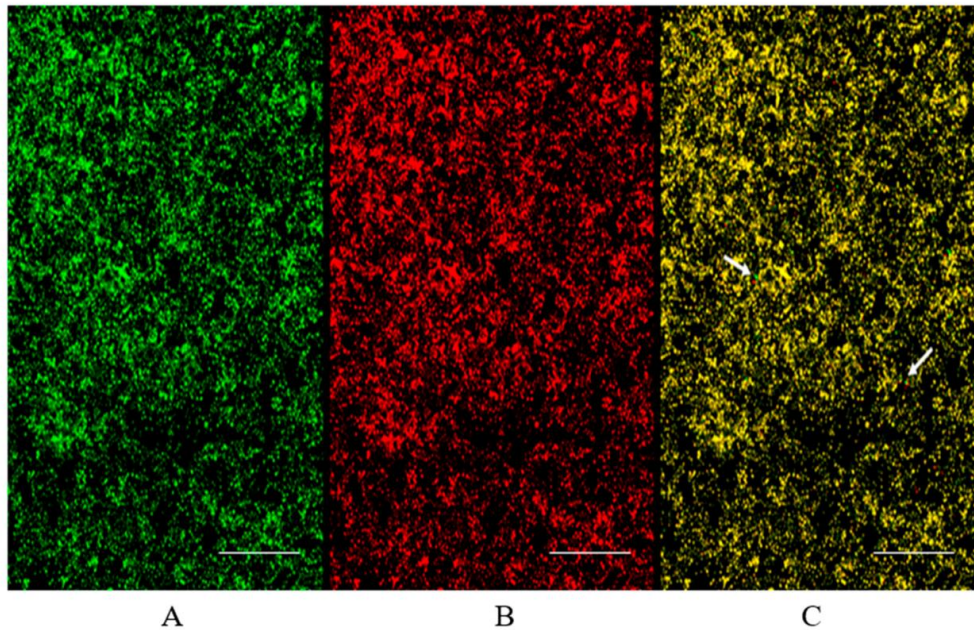


**Figure 7 :** Détection de persistants dans le biofilm de *Candida auris* : survie des cellules de *C. auris* dans le biofilm après traitement par la caspofungine (CSF) à différentes concentrations. Les données sont la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  SD.

La courbe de destruction bi-phasique a révélé qu'une sous-population de cellules dans le biofilm n'était pas sensible, même à la concentration antifongique la plus élevée utilisée.

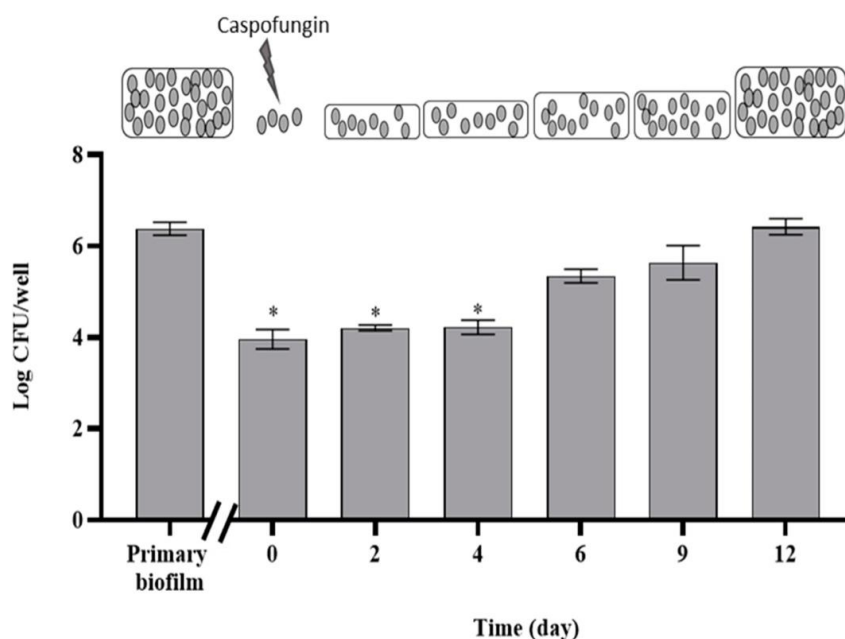
Selon des courbes similaires rapportées pour les biofilms de plusieurs *Candida* spp traités par un agent antifongique, également dans le cas de *C. auris*, les modifications phénotypiques des cellules persistantes, représentent une très petite fraction (0,05%) de l'ensemble de la population sessile.

Des cellules persistantes vivantes dans le biofilm ont été observées par microscopie confocale à balayage laser (CLSM), après coloration avec Syto9 et l'iodure de propidium (PI) (**Figure 8**). En effet, étant donné que SYTO9 et PI diffèrent par leur capacité à pénétrer dans les cellules saines, l'utilisation du mélange SYTO9/PI s'est avérée utile pour identifier les cellules persistantes dans la population de biofilm de *C. auris* traitée avec 200 mg /mL de caspofungine, où les très rares cellules persistantes apparaissent vert vif (**Figure 8**).



**Figure 8 :** Visualisation au CSLM de cellules persistantes dans le biofilm de *C. auris* traité avec 200 µg/mL de caspofungine et colorés avec SYTO9/PI: (A) observation à SYTO9 ( $\lambda_{\text{max}}$ : toutes les cellules du biofilm apparaissent en vert) ; (B) observation à PI ( $\lambda_{\text{max}}$ : les cellules du biofilm ne sont pas vivantes et apparaissent rouges) ; (C) fusionner: très peu de cellules apparaissent vert vif (persistants). Les flèches indiquent les quelques persistants. Les barres correspondent à 50 µm.

Lorsque le milieu frais a été distribué dans les puits d'une microplaque où le biofilm de *C. auris* (biofilm primaire) a été mis en contact avec une concentration de 200 µg/mL de la caspofungine, un nouveau biofilm progressivement développé à partir des cellules vivantes résiduelles (persistantes). En effet, le nombre de cellules vivantes dans le biofilm dérivé de cellules persistantes a augmenté au fil du temps, atteignant la même valeur que celle du biofilm primaire après 12 jrs (**Figure 9**).



**Figure 9** : Développement d'un nouveau biofilm à partir de persistants. Les cellules viables augmentent au cours du développement du biofilm dérivé des cellules du biofilm primaire survivant au traitement par la caspofungine (persistants) à un temps = 0.

\* représentent une différence significative par rapport au biofilm primaire,  $p < 0,05$  (test de Holm-Sidak).

Ici, ils ont utilisé un modèle *in vitro* et montré que lorsqu'un biofilm mature de *C. auris* était traité à la caspofungine, une petite fraction de cellules tolérantes à de fortes concentrations de l'antifongique a été détectée. Les persisteurs de *C. auris*, qui ont survécu au défi de la caspofungine, ont été capables de recoloniser le support lorsqu'ils ont été incubés en présence du milieu frais. Cette prolifération limite la recolonisation d'une surface avec l'utilisation d'un traitement antifongique fort (Maion *et al.*, 2022)

### 2. Composition de l'huile de *L. angustifolia*

Selon l'analyse GC-MS, les principaux constituants de l'huile de *L. angustifolia* (tableau 03), ont été identifiés en fonction de l'augmentation de l'indice de rétention (RI) : 1,8-cinéole (1,20 %),  $\beta$ -pinène (1,29 %), 4-terpinéol (1,40 %),  $\beta$ -farnénène (1,77 %), caryophyllène (2,01 %), acétate de lavandulyle (2,17 %), linalol (39,31 %) et acétate de linalyle (48,45 %). Les principaux constituants étaient l'acétate de linalyle et le linalol.

**Tableau 03 :** Composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula angustifolia*.  
RI : représente l'indice de rétention de Kovats.

Compound	RI	Peak Area (%)
β-Myrcene	892	0.14
1,8-Cineole	932	1.20
β-Pinene	946	1.29
trans-Ocimene	954	0.27
Linalool	1034	39.31
Camphor	1059	0.11
Isoborneol	1078	0.95
4-Terpineol	1091	1.40
Cis-β-Terpineol	1100	0.14
α-Terpineol	1107	0.08
Linalyl acetate	1180	48.45
Lavandulyl acetate	1207	2.17
Geraniol acetate	1292	0.45
Caryophyllene	1335	2.01
β-Farnesene	1366	1.77
β-Cubebene	1390	0.07
Caryophyllene oxide	1494	0.21

Dans l'huile de *L. angustifolia* examinée, les principaux composants sont l'acétate de linalyle et le linalol, conformément à la composition de cette huile rapportée par d'autres auteurs (**D'auria et al., 2005**). Les mêmes auteurs ont attribué à ces deux composants, et surtout au monoterpène linalol, l'activité antifongique contre *C. albicans*, bien que les effets antimicrobiens de l'huile puissent être le résultat de l'action synergique de ses composants majeurs et mineurs (**Rapper et al., 2013**).

### 3. Caractérisation de l'huile encapsulée de liposomes de *L. angustifolia*

Des liposomes chargés d'huile de *L. angustifolia* ont été caractérisés. Le diamètre hydrodynamique (DH) et l'indice de poly-dispersité (PDI) ont été mesurés à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les solutions de liposomes présentent un indice de polydispersité (PDI) < 0,3 indiquant une bonne distribution granulométrique (**tableau 04**).

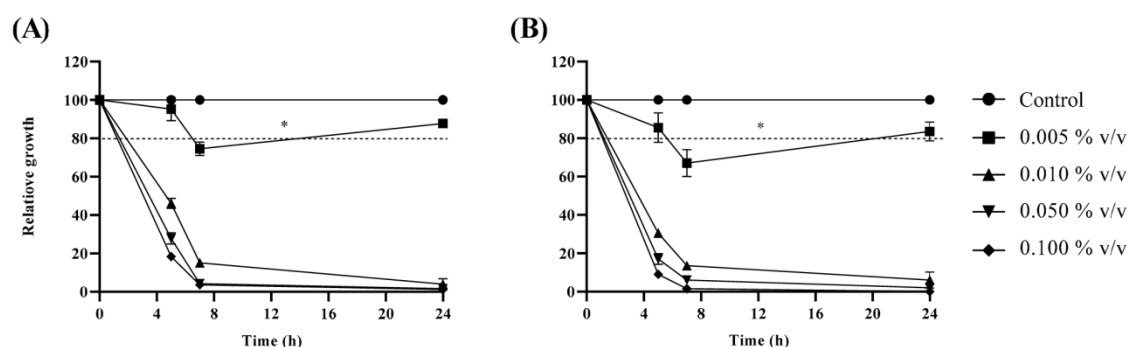
**Tableau 04 :** Diamètre moyen, PDI et potentiel zêta de l'huile de *L. angustifolia* encapsulée par liposomes.

Sample	Mean Diameter (nm)	Mean PDI	Mean Zeta Potential (mV)
Liposome-encapsulated Oil	177.2 ± 11.49	0.295 ± 0.053	-3.73 ± 0.099

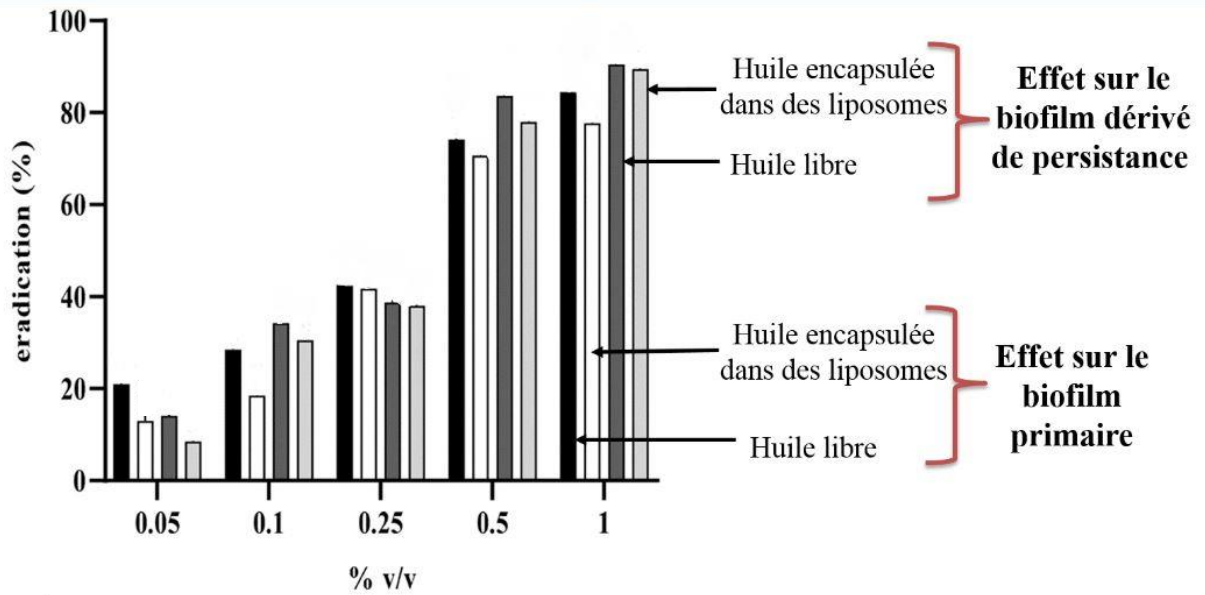
Ces données indiquent clairement que l'huile de *L. angustifolia* est complètement encapsulée dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude. En particulier, le rapport entre le volume d'huile et le volume lipidique est de 0,1, ce qui indique que l'huile encapsulée n'est pas capable de détruire l'emballage des liposomes.

#### 4. Activité antifongique de l'huile libre et encapsulée de *L. angustifolia* sur les cellules planctoniques et les biofilms de *C. auris*

Lorsque les cultures de *C. auris* ont été incubées en présence de concentrations croissantes d'huile libre de *L. angustifolia* ou d'huile encapsulée par liposomes, la réduction de la croissance a été surveillée pendant 24 heures d'incubation. Dans le (**Figure 10 A,B**) l'effet des composés examinés sur la croissance fongique planctonique a été rapporté ; une réduction significative de la croissance a été déjà observée lorsque les cellules ont été incubées en présence de 0,01% v/v d'huile libre ou encapsulée, mais un léger effet était visible à une concentration deux fois plus faible. Le biofilm primaire de *C. auris* de 48 h, a été éradiqué lorsqu'il a été traité avec de l'huile libre ou encapsulée de *L. angustifolia*, en fonction de différentes concentrations (**Figure 11**). L'éradication des biofilms a été obtenue à des concentrations supérieures à celles qui déterminent la réduction de la croissance planctonique, contrairement à la sensibilité des biofilms aux composés antimicrobiens. De plus, aucune différence significative dans l'éradication du biofilm n'a été observée entre les deux formulations d'huile, avec une valeur de plus de 80 % d'éradication obtenue à une concentration de 0,5 % v/v (**Figure 11**). Aucune éradication n'a été détectée en utilisant le liposome vide, montrant que l'effet d'éradication était dû à l'huile encapsulée et non aux composants du liposome.



**Figure 10 :** Effet de l'huile libre de *L. angustifolia* (A) et de l'huile encapsulée en liposomes (B) de *L.angustifolia* sur la croissance planctonique de *C. auris*. Les valeurs sous la ligne pointillée sont statistiquement significatives, \*  $P < 0,05$  (test de Holm-Sidak).



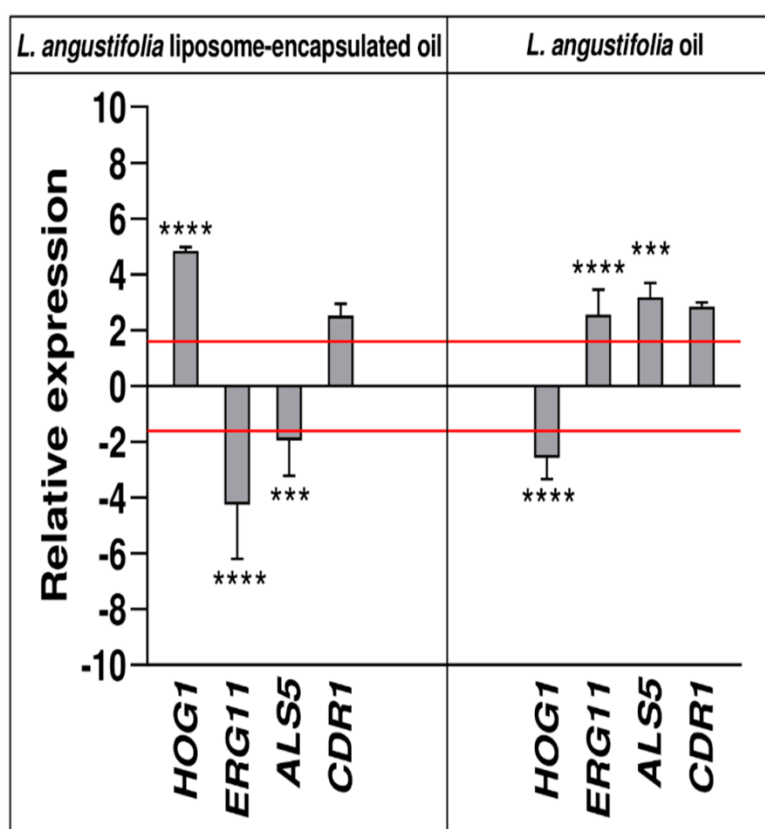
**Figure 11 :** Éradication de l’huile de *L. angustifolia* libre et encapsulée dans les liposomes sur les biofilms de *C. auris*.

Ces résultats montrent clairement que de faibles concentrations de l’huile essentielle *L.angustifolia* libres et encapsulés dans des liposomes sont suffisantes pour inhiber la croissance de *C.auris*. En outre, et de façon plus intéressante, les mêmes composés ont été efficaces pour éradiquer les biofilms formés par *C. auris in vitro*, soit pour un biofilm développé à partir de cellules planctoniques (biofilm primaire) ou à partir de cellules persistantes. Les concentrations efficaces sont les mêmes, ce qui montre indirectement que les cellules persistantes sont des variantes phénotypiques transitoires et non des cellules résistantes, donnant naissance à un nouveau biofilm qui répond au traitement antifongique de la même manière que le biofilm primaire.

Pour élucider les mécanismes potentiels par lesquels l’huile essentielle de *L. angustifolia* seule ou encapsulée dans un liposome (concentration de 0,05 %) a éradiqué les biofilms des cellules persistantes de *C. auris*, l’analyse de l’expression des gènes d’*ALS5*, *ERG11*, *CDR1* et *HOG1a* a été réalisée à l’aide de la qRT-PCR (**Figure 12**, **Tableau 05**)

**Tableau 05** : Données des niveaux d'expression dans le biofilm de *C.auris*

	<i>L. angustifolia</i> liposome-encapsulated oil	<i>L. angustifolia</i> oil
<i>HOG1</i>	4,84	-2,58
<i>ERG11</i>	-4,26	2,56
<i>ALS5</i>	-1,95	3,18
<i>CDR1</i>	2,52	2,85



**Figure 12** : QPCR en temps réel à 48 h de traitement. Les histogrammes montrent les différences dans les niveaux d'expression de trois gènes de virulence, d'un gène d'adhésion, d'un gène impliqué dans la formation de l'hyphale. Les différences en plus supérieures à  $\pm 1,5$  (voir les lignes directrices horizontales en pointillés rouges aux valeurs de +1,5 et -1,5) ont été considérés comme significatives (voir le **tableau S2** pour les valeurs).

Les données ont démontré que le gène *ERG11* était régulé dans les biofilms traités avec du liposome confirmant que l'un des mécanismes de l'activité antifongique pouvait être dû à la membrane ergostérol du biofilm secondaire. L'huile essentielle de *L. angustifolia* a régulé ce gène avec une augmentation de 2,6 fois (**Figure 12, et Tableau 05**).

En outre, l'expression de la *SLA5* a également été inhibée après deux traitements avec le liposome. Par contre ce gène a été significativement régulé dans un biofilm traité uniquement avec de l'huile essentielle avec une augmentation de 3,2 fois des niveaux d'expression (**Figure 12**).

Enfin, le *CDRI* a été régulé par les deux traitements (augmentation de 2,5 fois et 2,8 fois des niveaux d'expression, respectivement)

L'impact sur les gènes codant pour les pompes d'efflux (*CDRI*), la biosynthèse de l'ergostérol (*ERG11*), le gène spécifique de l'hyphes (*ALS5*) et le gène lié au stress (*HOG1*) dans les cellules du biofilm dérivé de cellules persistantes a confirmé l'efficacité du traitement.

En effet, dans cette étude, le gène lié à la biosynthèse de l'ergostérol *ERG11*, a été régulé pendant l'éradication du biofilm avec l'huile encapsulée dans des liposomes. De plus ils ont observé une augmentation significative de l'expression du gène *ERG11* lorsque l'huile de *L. angustifolia* sélectionnée a été appliquée sur les cellules persistantes du biofilm.

Bien qu'il a été démontré précédemment que le linalol, l'un des principaux composants de l'huile de *Lavandula*, inhibait la croissance des hyphes et la formation de biofilms de *C. albicans* en diminuant, l'expression de l'*ALS3* (Hsu *et al.*, 2013), dans la présente étude, ils ont observé que seule l'expression du gène de l'*ALS5* spécifique des hyphes dans les cellules formatrice du biofilms traitées par *L. angustifolia* encapsulés dans des liposomes étaient régulés. Il semble que dans les cellules persistantes traitées uniquement avec de l'huile essentielle, d'autres gènes de croissance hyphale et de formation du biofilm ont été impliqués pour diminuer sa virulence. Le *HOG1* était régulé, lorsque l'huile encapsulée était utilisée, et puisque *HOG1* est impliqué dans la réponse au stress oxydatif, ce résultat soutient fortement l'implication de la voie *HOG1* dans la réponse de *C. auris* à l'huile encapsulée de *L. angustifolia*. Ces résultats sont intéressants, car une partie des effets secondaires causés par les composés antifongiques est due à leur capacité à déclencher un stress oxydatif.



# Conclusion

Suite à la synthèse de cet article, nous disons que la recherche de nouvelles substances à activité antibactériennes et particulièrement antibiofilm d'origine naturel devient nécessaire et primordiale.

Les résultats de cet article montrent que des cellules persistantes et tolérantes à la caspofungine sont présentes dans le biofilm de *C. auris*. Ces cellules peuvent progressivement recoloniser le support, donnant naissance à un nouveau biofilm.

L'encapsulation des HE dans les liposomes représente une stratégie établie pour surmonter certaines limites dans l'utilisation des HE, en ce qui concerne leur stabilité à l'oxygène, à la lumière et à la température, diminue l'évaporation ou le taux de transfert vers l'environnement extérieur.

L'encapsulation des liposomes améliore également la solubilité des HE et améliore la dilution pour obtenir une distribution uniforme dans le produit final et, par conséquent, une biodisponibilité. Cependant quelques inconvénients sont notés, comme le coût de production élevé, les risques de fuite de composés encapsulés et la présence de phospholipides en tant que constituant liposome qui pourraient subir eux-mêmes une réaction d'oxydation et d'hydrolyse [(Wen *et al.*, 2010), (Verma *et al.*, 2013),( Drulis-Kawa *et al.*, 2010)].

*L. angustifolia* présente des propriétés antifongiques et antibiofilm dans les deux formulations à savoir l'huile libre et encapsulée testées contre le biofilm de *C. auris*.

# Références Bibliographique

### A

**Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). (2008):**"Recommandations Relatives Aux Critères De Qualité Des Huiles Essentielles. Contribution Pour L'évaluation De La Sécurité Des Produits Cosmétiques Contenant Des Huiles Essentielles".

**Anwar H., Van Biesen T., Dasgupta M., Lam K., Costerton J. W. (1989).** Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(10): 1824-6.

**Archibald L.K, Gaynes R.P. (1997).** Hospital acquired infections in the United States: The importance of interhospital comparisons. *Nosocomial Inf.* 11: 245-255

### B

**Babae Khalajee M., Jaimand K., Mozaffari S., Mirshokraie S.A. (2017).** Comparative Study on Essential Oils of *Lavandula officinalis L.* from Three Different Sites with Different Methods of Distillation. *Journal of Medicinal plants and By-product*, 6(1), 53-58

**Boughendjioua H. (2017).** Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* cultivées dans la région de Skikda-Algérie. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lavandula officinalis* grown in the region of Skikda-Algeria. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.

**Behlau I. (2008).** Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. *Arch Ophthalmol* 126(11), 1572.

**Belas R. (2013).**When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Molecular microbiology*, 90(1).

**Beloin C., Roux A., Ghigo J.-M. (2008).**Escherichia coli Biofilms. *In Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

## Références bibliographiques

---

**Ben Abdallah, F., Lagha, R., & Gaber, A (2020).** Propriétés d'inhibition et d'éradication du biofilm des huiles essentielles de plantes médicinales contre les isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline Clinical. *Produits pharmaceutiques*, 13 (11), 369.

**Besinis A, Hadi SD, Le HR, Tredwin C, Handy RD. (2017).** Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology* ;11(3):327–38.

**Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine (Thèse de doctorat).

**Butassi, E. ; Svetaz, L. ; Carpinella, M.C. ; Efferth, T. ; Zacchino, S.** Fungal Biofilms as a Valuable Target for the Discovery of Natural Products That Cope with the Resistance of Medically Important Fungi-Latest Findings. *Antibiotics* 2021, 10, 1053.

### C

**Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J. R., Álvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J. A. G., Kuipers, O. P., & Romero, D. (2020).** Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 3.

**Chibi A. (2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Mémoire de master : microbiologie, en : universite ABOUBEKR BELKAID Tlemcen.

**Chu C.J., Kemper K.J. (2001).** Lavender (*Lavandula spp.*). Longwood Herbal Task Force, 32

**Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.-J. (1978).** How Bacteria Stick. *Sci Am* 238, 86–95.

**Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. (1995).** Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

**Costerton J. W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217-221

**Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999).** "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science* 284, 1318-1322.

## Références bibliographiques

---

**Costerton JW., Montanaro L., Arciola CR (2005).** Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*;28(11):1062–8.

**Cosentino S., Tuberoso C. I. G. et al. (1999).** "In-Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian Thymus Essential Oils." *Lett Appl Microbiol.*29(2).

**Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013).**" Les Huiles Essentielles Gagnent Du Terrain À L'officine." *Actualités pharmaceutiques* 52 (525). 18-21.

### D

**Donlan R.M. (2001).** Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 277-281.

**Donlan R.M. (2008).** Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top.Microbiol. Immunol.* 322: 133.

**Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*8, 881–890.

**Donlan R.M, Costerton J.W. (2002).** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CMR 15*, 167–193.

**Dumas C. (2007).** Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible (thèse de doctorat).

**Dunny GM., Hancock LE., Shankar N.** Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease 2014.

**Dorman H. J. D. et Deans S. G.(2000).**"Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils.". *J Appl Microbiol* 88(2), 308-16.

### F

**Filloux A,Vallet, I. (2003).**Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Med Sci (Paris)*19, 77–83.

**Fleming D, Rumbaugh K P. (2017).** Approaches to Dispersing Medical Biofilms Microorganisms. 5, 15; doi:10.3390/microorganisms5020015

### H

**Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B. (2003).** Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of ethnopharmacology*, 89(1), 67-71.

**Hajoubi W. (2019).** Les infections associées aux biofilms.

**Harriott MM., Noverr MC.** Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol* 2011;19(11):557–63. Doi: 10.1016/j.tim.2011.07.004.

**Hasan F., Salah, A. A., Javed, S., et Hameed, A. (2010).** Enzymes used in detergents : Lipases. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(31), pp. 4836-4844.

**Henrici A.T. (1933).** Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J. Bacteriol.* 25, 277–287.

**Henrici A.T. (1936).** Studies of Freshwater Bacteria: III. Quantitative Aspects of the Direct Microscopic Method. *J. Bacteriol.* 32, 265–280.

### I

**Irie Y, Parsek M.R. (2008).** Quorum Sensing and Microbial Biofilms. *In Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 67–84.

### K

**Kathju S., Nistico L., Hall-Stoodley L., Post JC., Ehrlich GD., Stoodley P.** Chronic surgical site infection due to suture-associated polymicrobial biofilm. *Surg Infect (Larchmt)* 2009;10 (5):457–61. Doi: 10.1089/sur.2008.062.

**Karpin' ski, T.M. ; Oz'arowski, M. ; Seremak-Mrozikiewicz, A. ; Wolski, H. ; Adamczak, A.** Préparations végétales et composés avec activités contre les biofilms formés par *Candida* spp. *J. Fungi* 2021, 7, 360.

**Kaplan, J.B. (2010).** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potentialtherapeutic uses. *J Dent Res*; 89:205–18.

**Kavanaugh NL., Ribbeck K. 2012.** Des huiles essentielles antimicrobiennes sélectionnées éradiquent *Pseudomonas* spp. Et les biofilms de *Staphylococcus aureus* Appl Environ Microbiol. 78, pp 4057-4061

**Klevins R.M, Tokars J.I, Andrus M. (2005).** Nephrol. News Issues 19: 37- 38, 43

**Kim, H., Cha, E., Kim, Y. et al. (2016).** Raffinose, a plant galactoside, inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via binding to LecA and decreasing cellular cyclic diguanylate levels. *Sci Rep* 6, 25318.

**Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., and Losick, R. (2010).** D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328, 627–629. doi: 10.1126/science.1188628.

### L

**Lambert R. J. W., Skandamis P. N., et al. (2013).** "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.". *J App Microbiol* 91(3): 453-462

**Lappin-Scott H., Burton S., Stoodley P. (2014).** Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Microbiol* 12, 781–787.

**Lebeaux D., Ghigo J.-M., Beloin C. (2014).** Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 510–543.

**Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C., Kolter R. (2008).** Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–16.

**Ling, N., Forsythe, S., Wu, Q., et al. (2020).** Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry, *Engineering*, Volume 6, Issue 4, Pages 393-405.

**Lopes J. (2019).** Développement de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms de *Providencia stuartii*, un pathogène humain multi-résistant (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes).



## Références bibliographiques

---

**Lewis K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 107- 131.

### M

**Mah T. F, O'Toole G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology.* 9(1): 34-9.

**Martinez L.R, Casadevall A. (2007).** Cryptococcus neoformans Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. *AEM* 73, 4592–4601.

**Maud Belmont (2013).** " *Lavandula angustifolia*M., *Lavandula latifolia* M., *Lavandula x intermedia* E. : études botaniques, chimiques et thérapeutiques." Sciences pharmaceutiques.

**Menaceur Fouad et Hazzit Mohammed. (2015).** Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles et extraits éthanoliques du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) et de la lavande (*Lavandula stoechas*). Article universitaire.

**Minami, M. ; Kita, M. ; Nakaya, T. ; Yamamoto, T. ; Kuriyama, H. ; Imanishi, J.** L'effet inhibiteur des huiles essentielles sur la réplication du virus de l'herpès simplex type-1 in vitro. *Microbiol. Immunol.* 2003, 47, 681-684.

### N

**Nudleman E, Kaiser D. (2004).** Pulling Together with Type IV Pili. *J Mol Microbiol Biotechnol*7, 52–62.

**Niu, C., & Gilbert, E. (2004).** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 6951-6956+

### P

**Pantaleon V. (2015).** Le biofilm de *C. difficile*: rôle des protéines de surface (thèse de doctorat).

**Pelgrift RY, Friedman AJ.(2013).** Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 65(13–14):1803–15.

**Pessereau C. (2015).** Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale (thèse de doctorat, Nantes, Ecole des Mines).

**Picard C. (2011).** Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane (thèse de doctorat).

### R

**Roller, S. ; Ernest, N. ; Buckle, J.** The Antimicrobial Activity of High-Necrodane and Other Lavender Oils on MethicillinSensitive and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *J. Altern. Complementary Med.* **2009**, *15*, 275-279.

**Roux, A et Ghigo, J.M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Communication, Bull. Acad. Vêt*, 261-268.

**Rizzello L, Cingolani R, Pompa PP. (2013).** Nanotechnology tools for antibacterial materials. *Nanomedicine* 8(5):807–21.

**Ryan kean, christopher delaney , leighann sherry , andrew m borman (2018).** Transcriptome assembly and profiling of candida auris reveals novel insights into biofilm mediated resistance 326329330

### S

**Sadraei H., Asghari G., Rahmati M. (2019).** Study of antispasmodic action of *Lavandula angustifolia* Mill hydroalcoholic extract on rat ileum. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 8(1).

**Speranza, B., Corbo, M R., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2020).** Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology* 87 (2020) 103393

**Spormann A.M. (2008).** Physiology of Microbes in Biofilms. *In Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 17–36.

**Stewart P. S, J. W. Costerton. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358(9276): 135-8

### T

**Tasse J. (2017).** Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections ostéo-articulaires à staphylocoques (thèse de doctorat, Lyon).

**Trautner BW., Darouiche RO.** Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control* 2004;32(3):177–83. Doi: 10.1016/j.ajic.2003.08.005.

**Torres, C. E., Lenon, G., Craperi, D., Wilting, R., and Blanco, A. (2011).** Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 95–103. doi: 10.1007/s00253-011-3305-4

### V

**Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski A., Filloux A. (2001).** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6911–6916.

**Van Houdt, R et Michiels, C.W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 156, 626-633.

### W

**Williams I., Venables W. A., Lloyd D., Paul F., Critchley I. (1997).** The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 143 ( Pt 7): 2407-13.

### Z

**Zobell, C.E (1943).** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 46:39-56.

# Annexe



Article

# Activity of Free and Liposome-Encapsulated Essential Oil from *Lavandula angustifolia* against Persister-Derived Biofilm of *Candida auris*

Elisabetta de Alteriis <sup>1</sup>, Angela Maione <sup>1</sup>, Annarita Falanga <sup>2</sup>, Rosa Bellavita <sup>3</sup>, Stefania Galdiero <sup>3</sup>, Luisa Albarano <sup>1</sup>, Maria Michela Salvatore <sup>4,5</sup>, Emilia Galdiero <sup>1,\*</sup> and Marco Guida <sup>1</sup>

**Table S1.** Name, acronym, sequence and references of used primer for RT-qPCR.

Gene names	Acronym	Primer name	Sequence (5'→3')
Agglutinin like-sequence 5	ALS5	C.auris_ALS5_F	CCTTCTGGATCGGACACAGT
		C.auris_ALS5_R	AGTTGTGGTGGAGGAACCAG
Genes encoding efflux pumps	CDR1	C.auris_CDR1_F	GAAATCTTGCACTTCCAGCCC
		C.auris_CDR1_R	CATCAAGCAAGTAGCCACCG
Ergosterol biosynthesis enzyme	ERG11	C.auris_ERG11_F	GTGCCCATCGTCTACAACCT
		C.auris_ERG11_R	TCTCCCACTCGATTCTGCT
High-osmolarity glycerol1	HOG1	C.auris_HOG1_F	GACTTGTGGTCTGTGGGTG
		C.auris_HOG1_R	ACATCAGCAGGAGGTGAGC
Actin	actin	C.auris_actin_F	GAAGGAGATCACTGCTTTAGCC
		C.auris_actin_R	GAGCCACCAATCCACACAG

**Table S2.** Data of expression levels in *C. auris* biofilm.

	<i>L. angustifolia</i> liposome-encapsulated oil	<i>L. angustifolia</i> oil
HOG1	4,84	-2,58
ERG11	-4,26	2,56
ALS5	-1,95	3,18
CDR1	2,52	2,85



## Article

# Activity of Free and Liposome-Encapsulated Essential Oil from *Lavandula angustifolia* against Persister-Derived Biofilm of *Candida auris*

Elisabetta de Alteriis <sup>1</sup>, Angela Maione <sup>1</sup>, Annarita Falanga <sup>2</sup>, Rosa Bellavita <sup>3</sup>, Stefania Galdiero <sup>3</sup>, Luisa Albarano <sup>1</sup>, Maria Michela Salvatore <sup>4,5</sup>, Emilia Galdiero <sup>1,\*</sup> and Marco Guida <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Naples 'Federico II', Via Cinthia, 80126 Naples, Italy; dealteri@unina.it (E.d.A.); angela.maione@unina.it (A.M.); luisa.albarano@unina.it (L.A.); marco.guida@unina.it (M.G.)

<sup>2</sup> Department of Agricultural Science, University of Naples 'Federico II', Via dell' Università 100, 80055 Portici, Italy; annarita.falanga@unina.it

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, School of Medicine, University of Naples 'Federico II', Via Domenico Montesano 49, 80131 Naples, Italy; rosa.bellavita@unina.it (R.B.); sgaldier@unina.it (S.G.)

<sup>4</sup> Department of Chemical Sciences, University of Naples 'Federico II', Via Cinthia, 80126 Naples, Italy; mariamichela.salvatore@unina.it

<sup>5</sup> Institute for Sustainable Plant Protection, National Research Council, 80055 Portici, Italy

\* Correspondence: emilia.galdiero@unina.it; Tel.: +39-08167-9182



**Citation:** de Alteriis, E.; Maione, A.; Falanga, A.; Bellavita, R.; Galdiero, S.; Albarano, L.; Salvatore, M.M.; Galdiero, E.; Guida, M. Activity of Free and Liposome-Encapsulated Essential Oil from *Lavandula angustifolia* against Persister-Derived Biofilm of *Candida auris*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 26. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010026>

Academic Editor: William N. Setzer

Received: 18 November 2021

Accepted: 23 December 2021

Published: 27 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The high virulence of *Candida auris*, a pathogen fungus considered as a global threat for public health, is due to its peculiar traits such as its intrinsic resistance to conventional antifungals. Its biofilm lifestyle certainly promotes the prolonged survival of *C. auris* after disinfection or antifungal treatments. In this work, for the first time, we detected persister cells in a biofilm of *C. auris* in a microwell plate model, following caspofungin treatment. Furthermore, we showed how persisters can progressively develop a new biofilm in situ, mimicking the re-colonization of a surface which may be responsible for recalcitrant infections. Plant-derived compounds, such as essential oils, may represent a valid alternative to combat fungal infections. Here, *Lavandula angustifolia* essential oil, as free or encapsulated in liposomes, was used to eradicate primary and persister-derived biofilms of *C. auris*, confirming the great potential of alternative compounds against emergent fungal pathogens. As in other *Candida* species, the action of essential oils against *C. auris* involves ROS production and affects the expression of some biofilm-related genes.

**Keywords:** *Candida auris*; essential oil; *Lavandula angustifolia*; liposomes; reactive oxygen species; virulence; gene expression

## 1. Introduction

Since its discovery in 2009 [1], the pathogenic yeast *Candida auris* has elicited several worldwide outbreaks; thus, it is now considered as a global threat to public health, with an estimated mortality range from 28% to 66%. *C. auris* is associated with hospital-acquired infections and clinical isolates generally possess a multidrug-resistant (MDR) profile, with about 30% of isolates showing reduced susceptibility to amphotericin B, and 5% being resistant to echinocandins [2].

Notwithstanding, the phenotypic features of *C. auris* are similar to other *Candida* species; its peculiar thermo- and osmotolerance, together with its intrinsic resistance to conventional antifungals and tolerance to common disinfectants, certainly constitute advantages for spreading and virulence [3,4].

The occurrence of *C. auris* on different medical devices and surfaces has been reported [5,6] to be probably associated with the formation of cell aggregates and biofilms.

The peculiar trait of cellular aggregation of some strains [7] and the expression of biofilm-like characteristics can facilitate the prolonged survival of *C. auris* after disinfection or antifungal treatments. *C. auris* sessile cells display increased resistance to antifungals [5,7,8]. Overall, *Candida* spp. cells embedded in biofilms display reduced drug susceptibility with respect to the planktonic counterparts [9].

Several mechanisms are responsible for biofilm resistance, including, production of extracellular biofilm matrix, high cell density, reduction in growth rate, upregulation of drug efflux pumps, stress responses, and the occurrence of persister cells [10–12].

Persisters are phenotypic variants which are not susceptible to antimicrobials; they remain alive following treatment, and once the antimicrobial concentration decreases, are able to divide and re-populate the biofilm. Recalcitrant candidemias have been associated with the occurrence of persisters [11]. Persisters have been detected in biofilms of different *Candida* species [10,13] and represent a small fraction of the sessile population in the biofilm. Up to now, persisters have not been described in *C. auris* biofilms.

In this work, we detected persisters in a *C. auris* biofilm in an in vitro model, following treatment with increasing concentrations of caspofungin. We chose caspofungin since it is the most active drug against *C. auris* infections [14]. Then, we followed the development of a new biofilm of *C. auris* derived from persisters in the microwell plate model and investigated the possibility to eradicate it by using the essential oil from *Lavandula angustifolia*.

In the context of new strategies to face the threat of resistant microorganisms, essential oils (EOs) represent a valid alternative in the treatment of fungal infections and as modulators of fungal biofilms [15,16]. Even if plant-derived compounds have become an important potential for counteracting therapeutic failures in the treatment of fungal infections, literature data on their action against emerging yeast pathogens are still limited [17]. The potential of both bark and leaf *Cinnamomum zeylanicum* EOs to exert antifungal activity against *C. auris* has been reported, showing their ability to damage the membrane structures of fungal cells [18], but the treatment of persistent infections remains a challenge, and the activity of EOs against *C. auris* biofilm has not yet been studied.

Lavender is one of the most commonly cultivated plants in the world, belonging to the *Lamiaceae* family, and the most common species are: *L. angustifolia* Mill (narrow-leaved lavender, usually medical), *L. stoechas* (French lavender), *L. latifolia*, and their hybrids [19]. Lavender EOs showed antiviral activity against *Herpes simplex* virus type 1 [20], antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (MRSA, Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*) resistant to methicillin or against *Enterococcus* sp. vancomycin-resistant strains [21]. *L. angustifolia* Mill EO was more effective towards Gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family than Gram-positive *S. aureus* bacteria [22].

Liposomes are spherical lipid vesicles made of one or more lipids that serve as carriers for hydrophilic, lipophilic and amphiphilic compounds. They have been widely used to encapsulate several drugs, since they protect drugs from undesired metabolic breakdown, increase their accumulation at the target site and reduce their toxicity. Encapsulation of EOs in liposome represents an established strategy to overcome some limitations in the use of EOs, regarding their stability towards oxygen, light and temperature, decreases the evaporation or the transfer rate to the outside environment. Liposome encapsulation also enhances EOs solubility and enhances dilution to achieve a uniform distribution in the final product and consequently bioavailability [23]. There are some disadvantages as the high production cost, the chances of leakage of encapsulated compounds, and the presence of phospholipids as liposome constituent that could undergo themselves to oxidation and hydrolysis reaction [24–26].

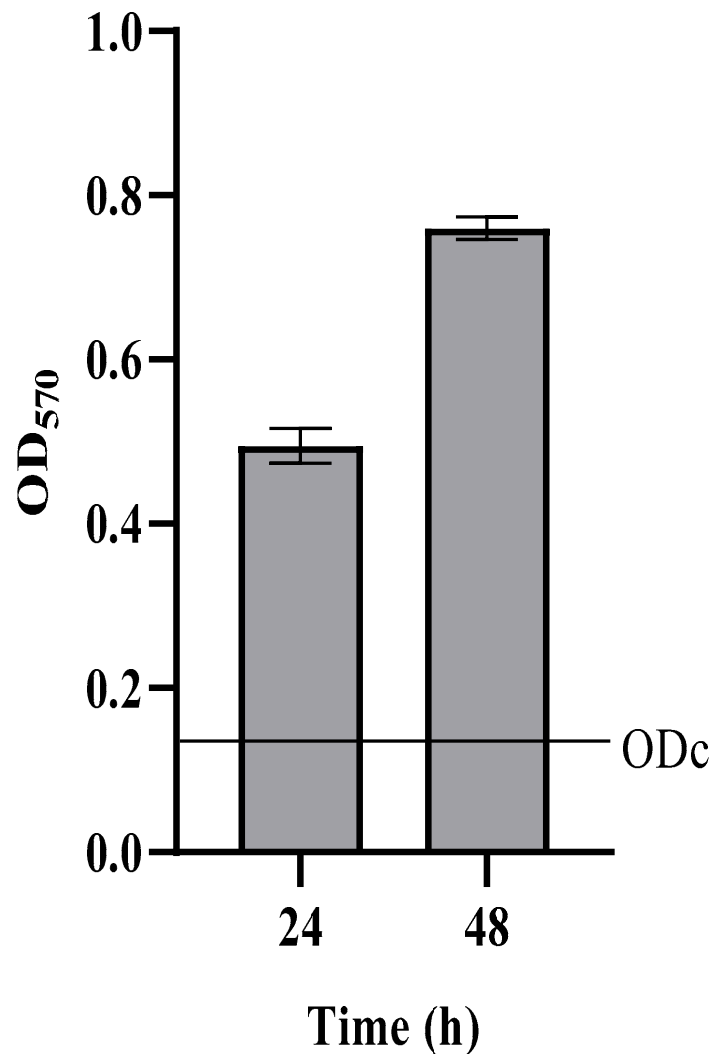
In this study, we encapsulated the EO from *L. angustifolia* in liposomes and characterized them through dynamic light scattering in order to determine the size and the zeta potential and tested their eradication activity towards *C. auris* persister-derived biofilm. Furthermore, some insights into the working mechanisms of action of both free and encapsulated oil on *C. auris* cells in the persister-derived biofilm were provided, by analysing the

redox status and the transcriptional expression of some biofilm-related genes (*ALS5*, *CDR1*, *ERG11*, *HOG1*).

## 2. Results

### 2.1. Detection of Persisters Cells in *C. auris* Biofilms

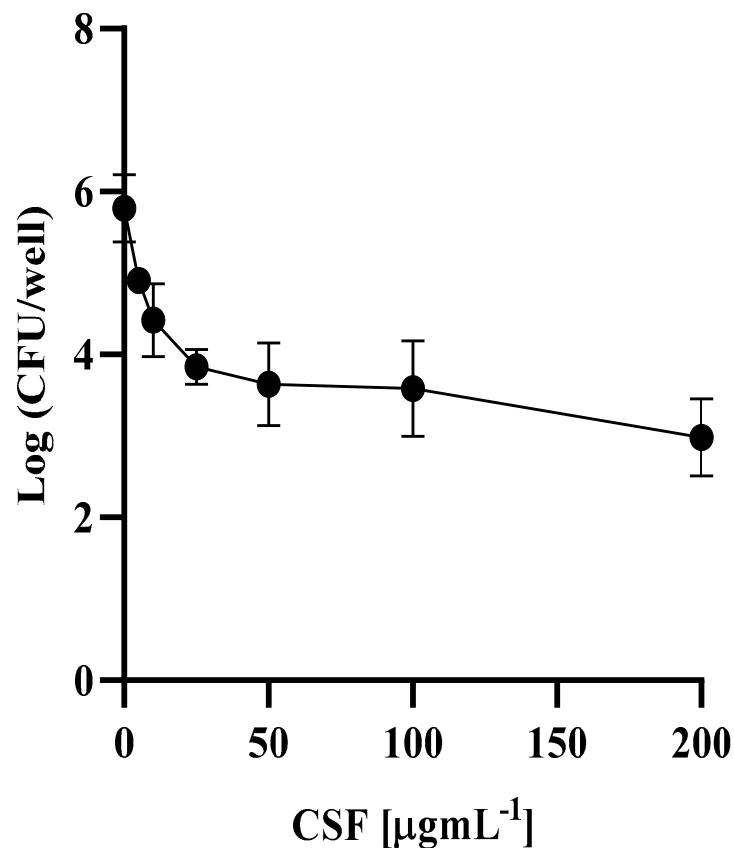
*Candida auris* DSM 21092 was able to form strong biofilms in the in vitro model of the microwell polystyrene plate (Figure 1). Total biomass of the sessile population increased between 24 and 48 h, showing that a more mature biofilm was formed at the end of the incubation period.



**Figure 1.** Total biomass of *C. auris* biofilms after 24 and 48 h of incubation. ODc = optical density cut off value (for details see Section 4). Data are the mean of three independent experiments  $\pm$  SD.

Once established on the polystyrene surface, the 48 h *C. auris* biofilm was treated with increasing caspofungin concentrations up to  $200 \times$  MIC, with an MIC value of the examined *C. auris* strain being  $1 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Due to caspofungin treatment, a dose-dependent killing of the biofilm population was observed (Figure 2).





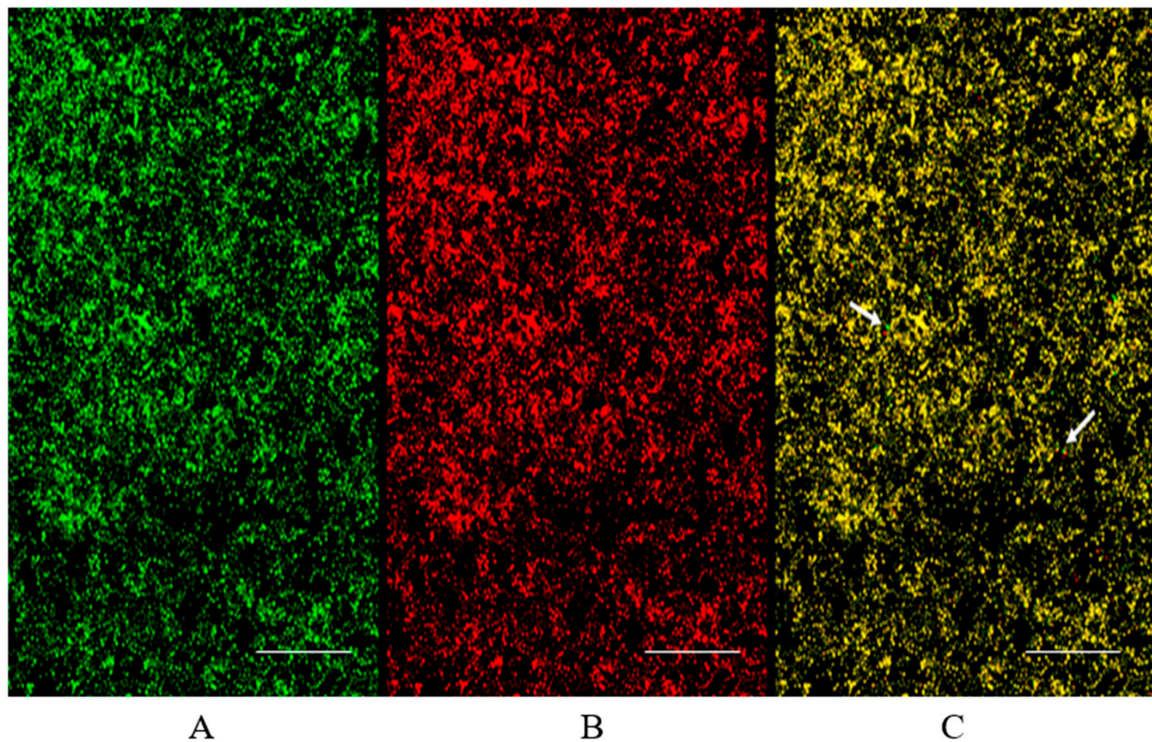
**Figure 2.** Detection of persisters in *Candida auris* biofilm: survival of *C. auris* cells in biofilm following treatment with caspofungin (CSF) at different concentrations. Data are the mean of three independent experiments  $\pm$  SD.

The biphasic-killing curve revealed that a subpopulation of cells in the biofilm was not susceptible, even to the highest antifungal concentration used.

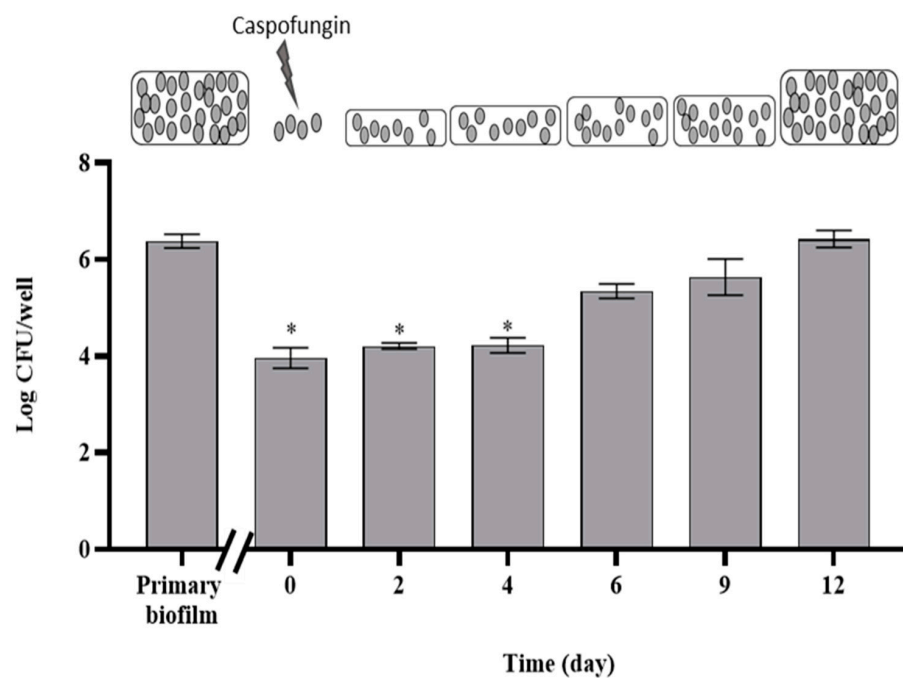
According to similar curves reported for biofilms of several *Candida* spp. subjected to an antifungal challenge, also in the case of *C. auris*, the phenotypic tolerant variants constitute the so-called persisters, representing a very small fraction (0.05%) of the entire sessile population.

Live persister cells in the biofilm could be observed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), after staining with Syto9 and propidium iodide (PI) (Figure 3). Indeed, since SYTO9 and PI differ in their ability to penetrate healthy cells, the use of the mixture SYTO9/PI was revealed to be useful in identifying persisters cells in *C. auris* biofilm population treated with  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  caspofungin, where the very few live persisters appear bright green (Figure 3).

When fresh medium was dispensed into the wells of a microplate where a *C. auris* biofilm (primary biofilm) had been challenged with  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  caspofungin, a new biofilm progressively developed starting from the residual living cells (persisters). Indeed, the number of living cells in the persister-derived biofilm increased over time, achieving the same value as that of the primary biofilm after 12 d (Figure 4).



**Figure 3.** Visualization at CSLM of persister cells in *C. auris* biofilm treated with  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  of caspofungin and stained with SYTO9/PI: (A) observation at SYTO ( $9 \lambda_{\text{max}}$ : all cells in the biofilm appear green; (B) observation at PI  $\lambda_{\text{max}}$ : cells in the biofilm are not alive and appear red; (C) merge: very few cells appear bright green (persisters). Arrows indicate the few persisters. Bars correspond to  $50 \mu\text{m}$ .



**Figure 4.** Development of a new biofilm from persisters. Viable cells increase during development of the biofilm derived from cells of the primary biofilm survived at caspofungin treatment (persisters) at time = 0. On the top, a schematic representation of the development of the persister-derived biofilm. \* represent significant difference vs. primary biofilm,  $p < 0.05$  (Holm–Sidak’s test).

## 2.2. Composition of *L. angustifolia* Oil

According to GC-MS analysis, the following major constituents, as shown in Table 1, (peak area percent > 0.5), were identified in the *L. angustifolia* oil ordered upon increasing retention index (RI): 1,8-cineole (1.20%),  $\beta$ -pinene (1.29%), 4-terpineol (1.40%),  $\beta$ -farnesene (1.77%), caryophyllene (2.01%), lavandulyl acetate (2.17%), linalool (39.31%) and linalyl acetate (48.45%). The main constituents were linalyl acetate and linalool.

**Table 1.** Chemical composition of *Lavandula angustifolia* essential oils. RI represents Kovats retention index.

Compound	RI	Peak Area (%)
$\beta$ -Myrcene	892	0.14
1,8-Cineole	932	1.20
$\beta$ -Pinene	946	1.29
trans-Ocimene	954	0.27
Linalool	1034	39.31
Camphor	1059	0.11
Isoborneol	1078	0.95
4-Terpineol	1091	1.40
Cis- $\beta$ -Tepineol	1100	0.14
$\alpha$ -Terpineol	1107	0.08
Linalyl acetate	1180	48.45
Lavandulyl acetate	1207	2.17
Geraniol acetate	1292	0.45
Caryophyllene	1335	2.01
$\beta$ -Farnesene	1366	1.77
$\beta$ -Cubebene	1390	0.07
Caryophyllene oxide	1494	0.21

## 2.3. Characterization of Liposome-Encapsulated Oil of *L. angustifolia*

Liposomes loaded with oil of *L. angustifolia* were characterized. The hydrodynamic diameter (DH) and polydispersity index (PDI) were measured using dynamic light scattering (DLS). Three independent experiments were performed for each sample and each measurement was performed at least in triplicate. Liposome solutions present a polydispersity index (PDI) < 0.3 indicating a good size distribution (Table 2).

**Table 2.** Mean diameter, PDI and Zeta potential of liposome-encapsulated *L. angustifolia* oil.

Sample	Mean Diameter (nm)	Mean PDI	Mean Zeta Potential (mV)
Liposome-encapsulated Oil	177.2 $\pm$ 11.49	0.295 $\pm$ 0.053	-3.73 $\pm$ 0.099

Moreover, our data clearly indicate that the *L. angustifolia* oil is completely encapsulated in the experimental conditions used in this study. In particular, the ratio between the oil volume and the lipid volume is 0.1, indicating that the encapsulated oil is not able to destroy the liposome packing.

## 2.4. Antifungal Activity of *L. angustifolia* Free and Encapsulated Oil on Planktonic Cells and Biofilms of *C. auris*

When *C. auris* cultures were incubated in the presence of increasing concentrations of either *L. angustifolia* free or liposome-encapsulated oil, growth reduction was monitored during 24 h incubation. In Figure 5A,B, the effect of the examined compounds on planktonic fungal growth is reported; a significative growth reduction was already observed when cells were incubated in the presence 0.01% *v/v* free or encapsulated oil, but a slight effect was already visible at a concentration two-fold lower. Both 48 h primary and persister-derived biofilm of *C. auris* were eradicated when treated with *L. angustifolia* free or encapsulated oil, in a concentration dependent manner (Figure 6). Eradication of

biofilms was obtained at concentrations higher than those determining planktonic growth reduction, in accordance with the general lower susceptibility of biofilms to antimicrobial compounds. Furthermore, no significant difference in biofilm eradication was observed between the two oil formulations, with a value of more than 80% eradication achieved at a concentration of 0.5% *v/v* (Figure 6). No eradication at all was detected by using the empty liposome (data not shown), showing that the eradication effect was due to the encapsulated oil, and not to the liposome components.

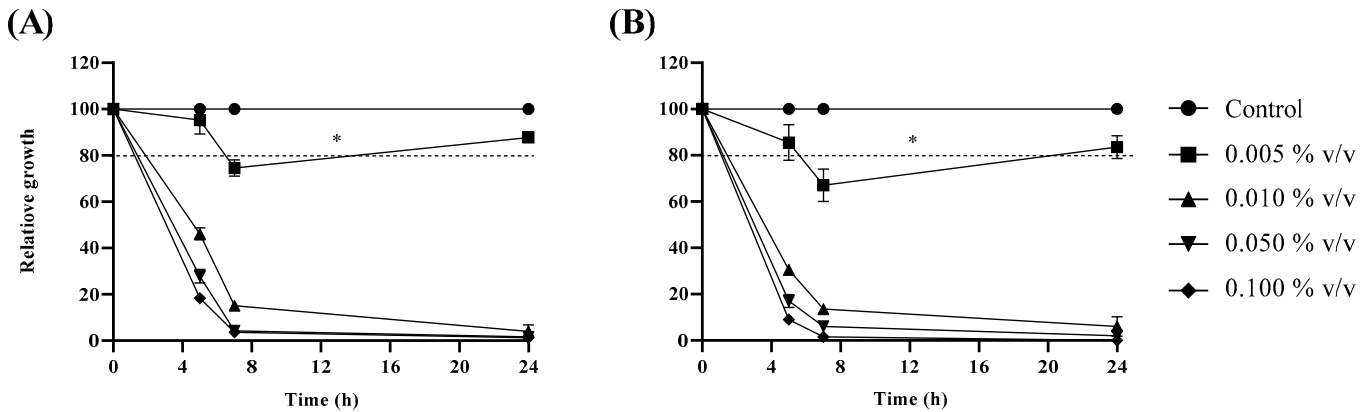


Figure 5. Effect of *L. angustifolia* free (A) and liposome-encapsulated oil (B) on planktonic *C. auris* growth. Values below the dotted line are statistically significant, \*  $p < 0.05$  (Holm–Sidak’s test).

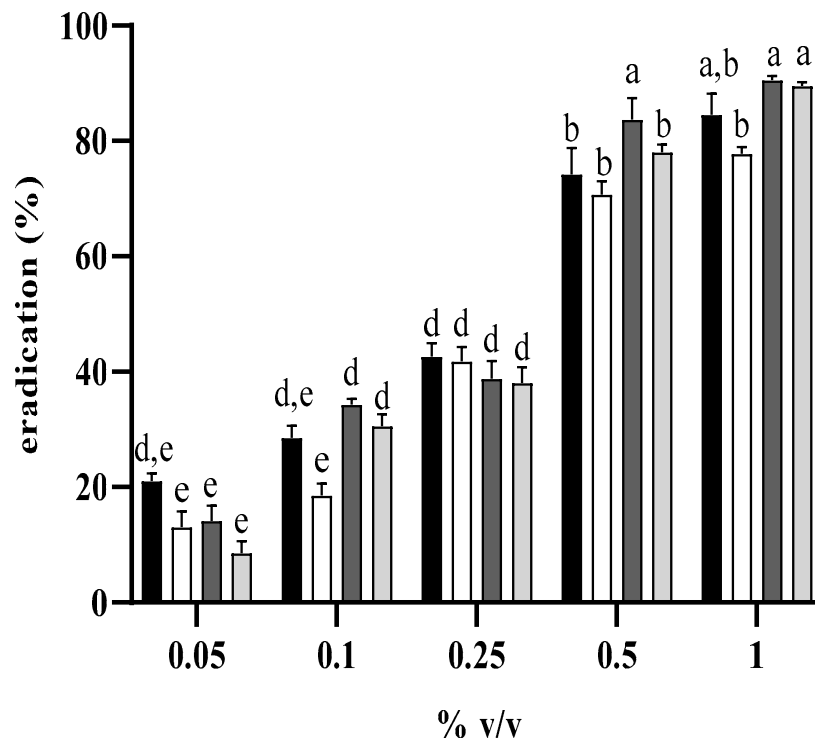
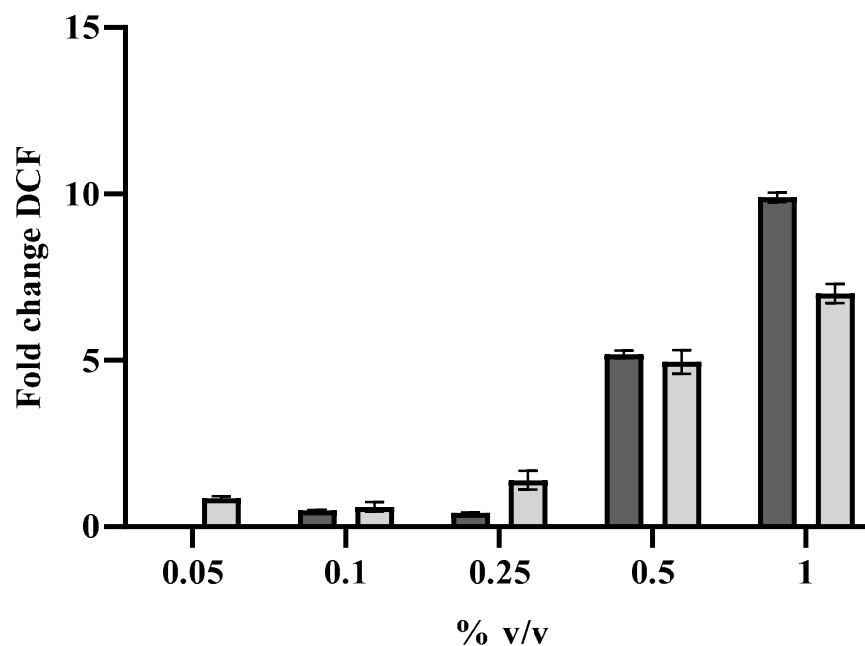


Figure 6. Eradication of free and liposome-encapsulated *L. angustifolia* oil on *C. auris* biofilms. Effect on primary biofilm: free oil (black bars); liposome-encapsulated oil (white bars). Effect on persister-derived biofilm: free oil (dark grey); liposome-encapsulated oil (light grey). Bars with different letters (a,b,d,e) are significantly different, bars with the same letters (a,b,d,e) are not significantly different (Tukey’s test,  $p < 0.05$ ).

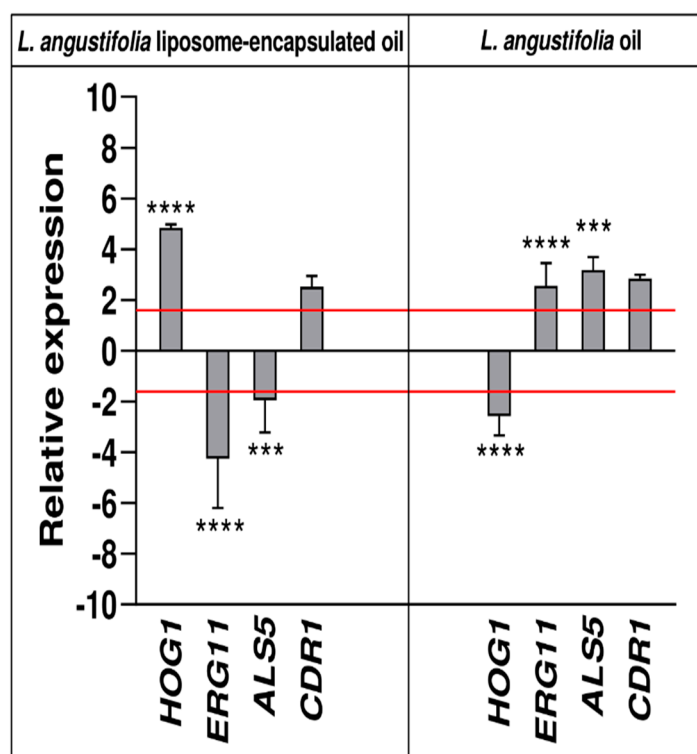
It is known that the exposure of EOs on *Candida* cells provokes an increase in intracellular Reactive Oxygen Species (ROS), which in turn may determine a cellular damage and eventually cell death, which in the case of sessile cells leads to their detachment. ROS increase was detected also in *C. auris* cells in the persister-derived biofilm, when treated with free or encapsulated oil for eradication, and the ROS increase was concentration-dependent (Figure 7).



**Figure 7.** Increase in intracellular ROS in *C. auris* persister-derived biofilm following treatment with different concentrations of *L. angustifolia* free (dark grey) and liposome-encapsulated oil (light grey). Dichlorofluorescein (DCF) fluorescence values are normalized to biofilm biomass and expressed as DCF fold change with respect to untreated sample. Data are the mean of three independent experiments  $\pm$  SD.

To elucidate the potential mechanisms by which *L. angustifolia* essential oil alone or encapsulated in a liposome (concentration of 0.05%) eradicated *C. auris* persister cells biofilms, genes expression analysis of *ALS5*, *ERG11*, *CDR1* and *HOG1* was performed using qRT-PCR (Figure 8, Table S2).

Data demonstrated that *ERG11* ( $p < 0.0001$ ) was significantly downregulated in biofilms treated with liposome confirming that one of the mechanisms of antifungal activity could be by binding to the membrane ergosterol also in a secondary biofilm, while upregulated in persister biofilm treated with oil alone. *L. angustifolia* essential oil upregulated this gene with a 2.6-fold increase (Figure 8, Supplementary Materials: Table S2). In addition, the expression of *ALS5* was also inhibited after treatment with liposome of 2-fold, on the contrary significantly upregulated in biofilm treated with only essential oil with a 3.2-fold increase in expression levels (see also Table S2). *HOG1* gene was up-regulated (4.8-fold) and down-regulated (2.6-fold) by *L. angustifolia* liposome-encapsulated oil and *L. angustifolia* oil, respectively ( $p < 0.0001$ ; Figure 8). Finally, *CDR1* was up-regulated by both treatments (2.5-fold and 2.8-fold increase in expression levels, respectively), as seen also in Table S2.



**Figure 8.** Real-time qPCR at 48 h of treatment. Histograms show the differences in the expression levels of three virulence genes, one adhesion gene, one gene involved in hyphal formation. Fold differences greater than  $\pm 1.5$  (see red dotted horizontal guidelines at values of +1.5 and  $-1.5$ ) were considered significant (see Table S2 for the values). A Brown–Forsythe test Sisak’s test (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3. Discussion

Nowadays, failure in the treatment of *Candida* spp. infection has highlighted the relevant role exerted by the so-called persister cells in biofilms.

In this work, we suggest that persister cells are present also in biofilms of the emerging pathogen *C. auris*. Indeed, *C. auris* with multiple drug-resistances against prominent antifungals has occurred independently in different countries, so that a clinical alert identifying *C. auris* as an emerging “superbug” has been released [27,28]. The incoming of *C. auris* also in Italy is recent, and its spread has probably been facilitated during the SARS-CoV-2 pandemic, due to the increase in antimicrobial resistance for the unconditioned use of broad-spectrum antimicrobials [29].

Here, using an in vitro model, we showed that when a mature biofilm of *C. auris* was treated with caspofungin, a small fraction of cells tolerant to high concentrations of the antifungal was detected. *C. auris* persisters, which survived the caspofungin challenge, were able to re-colonize the support when incubated in the presence of fresh medium. This proliferation mimics the re-colonization of a surface which may follow a strong antifungal treatment, as in the case of the lock therapy [30], which utilizes prolonged instillation of a solution containing high concentrations of antimicrobial agent within an infected intravascular catheter, in an attempt to sterilize it and control bloodstream infections. Therefore, due to the survival of the tolerant persister subpopulation, in the long-term, re-population of the catheter interior may occur, thus leading to chronic infections.

Essential oils fractionally distilled from plants have drawn increased attention because of their multiple pharmacological properties such as antibacterial, antifungal, and antiviral activities. To date very few scientific papers have investigated the effect of EOs [18] and their components such as monoterpene phenols against planktonic *C. auris* [31], and none

reported the effect of EOs on *C. auris* biofilms. In particular, *L. angustifolia* oil on *C. auris* has not been investigated so far.

In the *L. angustifolia* oil examined, the main components are linalyl acetate and linalool, according to the composition of this oil as reported by other authors [32]. The same authors attributed to these two components, and especially to the monoterpene linalool, the antifungal activity against *C. albicans*, though the antimicrobial effects of the oil may be the result of the synergistic action of its major and minor components [33].

Our results clearly show that low concentrations of free and liposome-encapsulated *L. angustifolia* oil are sufficient to inhibit the growth of *C. auris*. Further, and more interestingly, the same compounds were effective to eradicate biofilms formed by *C. auris* in vitro, either the biofilm developed starting from planktonic cells (primary biofilm) and that developed from persister cells. The effective concentrations remained unchanged, indirectly showing that persisters were transient phenotypic variants instead of resistant cells, giving rise to a new biofilm which responds to the antifungal treatment similarly to the primary biofilm.

*L. angustifolia* encapsulation into liposomes can be used to overcome some critical issues. The use of liposomes also provides the necessary protection against essential oil oxidation, and thus enhances the oil solubility.

Researchers have investigated the complex action modes of EOs from various perspectives. The main mechanism is based on their lipophilic character, which facilitates the access of the hydrophobic compounds to the cytoplasmic membrane, causing membrane damage, loss of intracellular substances, and finally microbial death [34]. The effect of oil or its active components on *Candida* spp. is certainly mediated by ROS generation [35]. Additionally, for *C. auris* persister cells in the biofilm, following exposure to free or encapsulated oil, we detected an increase in intracellular ROS depending on used concentrations, showing that the antifungal effect of the two compounds is mediated by ROS accumulation. It is likely that also for *C. auris*, ROS production is associated with cell damage and to the activation of the apoptotic pathway.

The impact on genes encoding for efflux pumps (*CDR1*), ergosterol biosynthesis (*ERG11*), hyphae-specific gene (*ALS5*) and stress related (*HOG1*) in the cells of the persister derived biofilm confirmed the treatment efficacy.

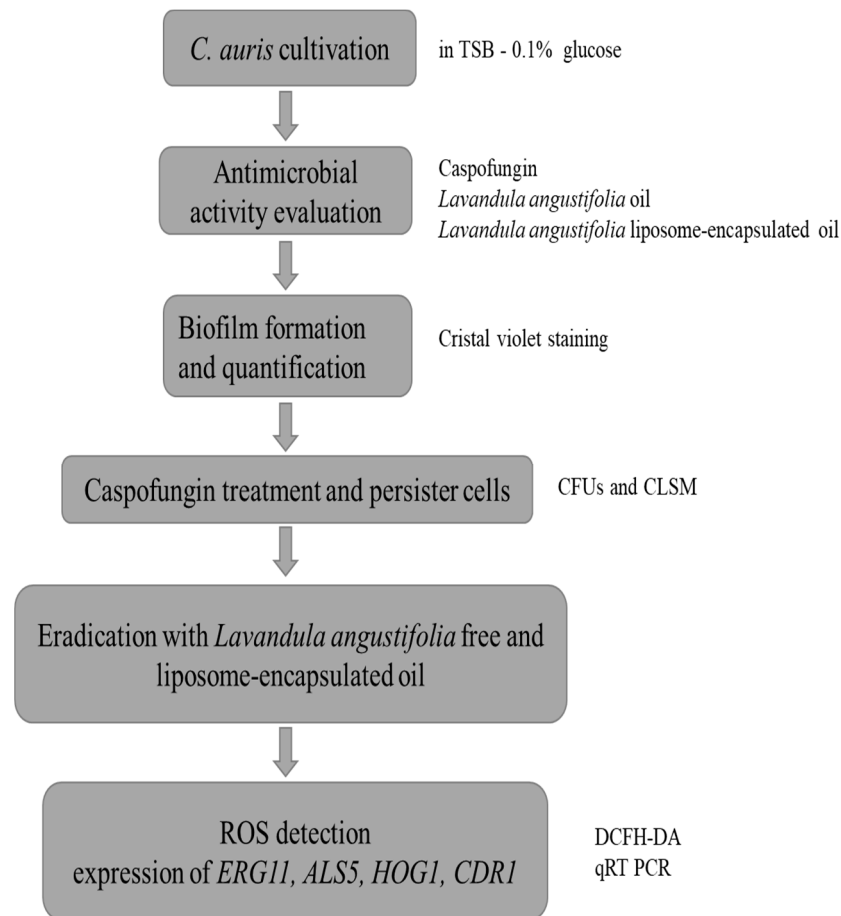
Indeed, in our study, the gene related to ergosterol biosynthesis, *ERG11*, was downregulated during eradication with liposome encapsulated oil, and this effect could be attributed to its cell membrane-targeting activity, while we could observe a significant increase in expression of the *ERG11* gene when the selected *L. angustifolia* oil were applied to persister-derived biofilm.

Although it had been previously shown that linalool, one of the major components of Lavandula oil, inhibited hyphal growth and biofilm formation of *C. albicans* by downregulating, between others, the expressions of *ALS3* [36], in the present study, we observed that only the gene expression of hyphae-specific *ALS5* in biofilm-persister cells treated with *L. angustifolia* liposome-encapsulated were downregulated. It appears that in persister-cells derived biofilm treated with essential oil only, other hyphal growth and biofilm formation genes had been involved to diminish its virulence.

*HOG1* was upregulated, when encapsulated oil was used, and since *HOG1* is involved in the oxidative stress response, this result strongly supports the implication of the *HOG1* pathway in the *C. auris* response to *L. angustifolia* encapsulated oil. Our results are interesting, since part of the side effects caused by antifungal compounds are due to their ability to trigger oxidative stress. When intracellular ROS is elevated, *C. auris* will initiate an effective oxidative stress response regulated by the transcription factor *HOG1*, as shown for other *Candida* spp. Regarding the expression of *CDR1*, one of the genes encoding for the efflux pump, we observed that both the application of free lavender and the encapsulated one upregulated this gene. We hypothesized that other genes correlated with resistance should be investigated.

#### 4. Materials and Methods

In Figure 9 the flow chart of the experimental design is reported.



**Figure 9.** Flow chart of study design.

##### 4.1. Strain and Culture Condition

*Candida auris* strain DSM 21092 (DSMZ German Collection) was maintained in glycerol at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The strain was cultured in shake flasks containing Tryptic Soy Broth (TSB) (OXOID, Basingstoke, UK) with 1% *w/v* glucose, starting from an overnight pre-culture prepared in the same medium. Shake flasks were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm.

##### 4.2. GC-MS Analysis of *L. angustifolia* Oil

Composition of *L. angustifolia* oil (Natura Zen Srl, Italy) (Lot n. 0281-4392105-2023/2; expiry date 12/2023) was determined by GC-MS analysis performed with an Agilent 6850 GC (Milan, Italy), equipped with an HP-5MS capillary column (5% phenyl methyl poly siloxane stationary phase), coupled to an Agilent 5973 Inert MS detector operated in the full scan mode ( $m/z$  18–550) at a frequency of 3.9 Hz and with the EI ion source and quadrupole mass filter temperatures kept, respectively, at  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Helium was used as carrier gas at a flow rate of  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The injector temperature was  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the temperature ramp raised the column temperature from  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ :  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min;  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  until reaching  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; and  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  until reaching  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The solvent delay was 3 min. Compounds were identified by comparing their EI mass spectra at 70 eV with spectra of known substances present in the NIST 14 mass spectral library (NIST 14, <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a> (accessed on 3 November 2021)). Moreover, the identification was supported by Kovats retention index



(RI) calculated for each analyte by the Kovats equation, using the standard *n*-alkane mixture in the range C7-C40 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

The relative percentage of each compound is defined by the area of selected peak divided for the sum of the peak area.

#### 4.3. Preparation of Liposome-Encapsulated *L. angustifolia* Oil

L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) and cholesterol (Chol) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

Small unilamellar vesicles (SUV) consisting of PC/Chol (70/30 mol/mol) were prepared. The liposomes were prepared at a total lipid concentration of 0.1 mM, mixed aggregates of PC, Chol and *L. angustifolia* oil were dissolved in chloroform and subsequently the solvent was evaporated under a stream of nitrogen gas. Appropriate amounts of *L. angustifolia*, in particular 20  $\mu$ L were added to 200  $\mu$ L of liposomes, so that oil in the liposome formulation had a concentration of 10% *v/v*. Following, lipid films were hydrated with water for 1 h. The lipid suspension was freeze-thawed 6 times, Liposomes were obtained sonicating the solution for 40 min. Unloaded drugs were removed by the Sephadex G50 column to purify the final formulation and evaluate the efficiency of encapsulation. Dynamic light scattering (DLS) measurements were made using Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), to check the Zeta potential and the size (Table 2). The analysis was performed with He-Ne laser 4 mW operating at 633 nm at scattering angle fixed at 173° and at 25 °C. The results were determined three times for each sample and each measurement was performed at least in triplicate.

#### 4.4. Determination of Caspofungin Minimum Inhibitory Concentration

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of caspofungin (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) against *C. auris* were determined with a broth microdilution method, as described by CLSI-M27-A3 [37] with some modifications. Concentrations of caspofungin from 0.1 to 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> were added to wells of a 96-well microplate containing the microorganism in TSB with 1% *w/v* glucose. The plate was incubated at 37 °C for 24 h. MIC value was determined as the lowest concentration inhibiting fungal growth at 590 nm using a microplate reader (Synergy H4; BioTek Instruments, Agilent Technologies, Winooski VT 05404 USA).

#### 4.5. Effect of *L. angustifolia* Oil and Liposome-Encapsulated Oil on Planktonic *C. auris* Cells

The effect of both *L. angustifolia* oil and liposome-encapsulated oil on planktonic cells of *C. auris* was evaluated incubating fungal cultures in shake flasks containing TSB medium with 1% *w/v* glucose, in the presence of different oil or liposome-encapsulated oil concentrations, ranging from 0.005 to 0.5% *v/v*. Stock solutions of the oil were prepared diluting it in 0.1% *v/v* Tween 80; stock solutions of the liposome-encapsulated oil were prepared in distilled water. The cultures were inoculated with proper aliquots of an overnight pre-culture prepared in the same conditions. The flasks were incubated at 37 °C for 24 h at 200 rpm. Cell growth was monitored spectrophotometrically at OD<sub>590</sub> and growth reduction expressed as percentage of the control.

#### 4.6. Biofilm Formation and Quantification

*C. auris* cells used to start biofilm formation were obtained collecting cells in mid-exponential phase from shake flask cultures in TSB with glucose 1% and re-suspending them in RPMI 1640 (*w/o* glutamine) (Lonza, Switzerland) to 1  $\times$  10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Aliquots of 100  $\mu$ L of cell suspensions were loaded into a polystyrene 96-well microplate and incubated at 37 °C for 24 or 48 h. Wells were then washed three times with 200  $\mu$ L PBS to remove non-adherent cells.

Quantification of the biofilm biomass was performed by crystal violet staining, as previously described [33]. To quantify the biofilm formation, the optical density cut off value (ODc) was calculated as the three standard deviations above the mean OD of the

negative. Final OD value of the tested strain was interpreted as negative ( $OD \leq ODc$ ), weak ( $ODc \leq OD \leq 2ODc$ ), moderate ( $2ODc < OD \leq 4ODc$ ), or strong ( $4ODc < OD$ ) biofilm former [38].

#### 4.7. Detection of Persisters Cells

The quantification of persister cells in *C. auris* biofilm was performed as previously described [11], with some modifications. Briefly, the 48 h *C. auris* biofilm, grown as previously described, was challenged with caspofungin buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinopropanesulfonic acid (MOPS, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) at concentrations ranging from 5 to 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for 24 h at 37 °C in RPMI medium. Caspofungin stock solution at concentration of 500  $\text{mg mL}^{-1}$  was prepared in DMSO 1.3% *v/v*. Preliminarily, it was shown that DMSO was not toxic against *C. auris* up to concentrations of 5% *v/v* (data not shown).

Biofilms were abundantly washed with PBS, then disrupted by scraping and vortexed vigorously for 30 s before serial dilution and plating on YPD (1% yeast extract, 2% bactopeptone, 2% glucose) agar medium. Plates were incubated at 37 °C for 48 h. The number of surviving cells (persisters) was expressed as CFU per well.

#### 4.8. Development of Persister-Derived Biofilm of *C. auris*

The small number of cells not susceptible to caspofungin treatment (persisters) in the primary 48 h biofilm were the inoculum of a new biofilm (persister-derived biofilm), which developed in situ in the 96-well microplate.

Therefore, to obtain the persister-derived biofilm, following the caspofungin treatment of the primary biofilm, the wells were abundantly washed with PBS, and incubation was allowed to continue for 12 d during which 200  $\mu\text{L}$  YPD medium were added to each well every 24 h. Biofilm mass was estimated every 48 h by CFU assay, as described above.

#### 4.9. Eradication of Biofilm with Free Liposome-Encapsulated *L. angustifolia* Oil

The eradication activity of *L. angustifolia* oil, and liposome-encapsulated oil, was evaluated exposing *C. auris* primary and persister-derived biofilms for 24 h to different concentrations of each of the two compounds ranging from 0.05 to 1% *v/v*, in RPMI medium and quantified the residual biomass by crystal violet assay. The percentage of eradication was calculated as biofilm reduction % =  $(OD_{570} \text{ control} - OD_{570} \text{ sample}) / OD_{570} \text{ control} \times 100$ , where  $OD_{570} \text{ control}$  and  $OD_{570} \text{ sample}$  corresponded to the untreated and treated biofilm, respectively.

#### 4.10. Determination of iROS in Persisters-Derived Biofilms of *C. auris*

Intracellular ROS levels were investigated using the fluorescent dye dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). To persister-derived biofilms of *C. auris*, developed in the wells of the microplate and treated with different concentration of *L. angustifolia* free and liposome-encapsulated oil, 10  $\mu\text{M}$  2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) in PBS was added. Biofilms were incubated for 1 h at 37 °C, then fluorescence intensities (excitation and emission of 488 and 540 nm, respectively) were measured with a microtiter plate reader (Synergy H4; BioTek Instruments, Inc.) Fluorescence values were normalized to biofilm biomass, as determined by crystal violet staining.

#### 4.11. Gene Expression in *C. auris* Persister-Derived Biofilms Treated with *L. angustifolia* Free and Liposome-Encapsulated Oil

The effect of *L. angustifolia* free and liposome-encapsulated oil on the expression of *ERG 11*, *ALS 5*, *HOG 1* and *CDR1* (Table S1) [39,40] in persister-derived biofilms of *C. auris* was analysed using qRT-PCR. Briefly, persister-derived biofilms were treated with 0.05% *v/v* oil or liposome-encapsulated oil for 24 h at 37 °C. Then, the biofilms were scraped from the polystyrene surface, and collected by centrifugation ( $3000 \times g$ , 5 min). The pellets were used to extract total RNA using the Direct-zolTM RNA Miniprep Plus Kit (ZYMO

RESEARCH). The purity and concentration of the extracted RNA were verified using Nanodrop spectrophotometer 2000 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA USA). A total of 1000 ng of extracted RNA was retrotranscribed with an iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Milan, Italy) and it was used as a template in a reaction containing primer (0.3 mM) and 1× SensiFAST™ SYBR Green master mix (Meridiana Bioline, Aurogene, Rome, Italy). PCR amplifications were performed in a AriaMx Real-Time PCR instrument (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured using Agilent Aria 1.7 software (Agilent Technologies, Inc.). The expression of gene was analyzed and normalized against *ACT1* gene using REST software (Relative Expression Software Tool, Weihenstephan, Germany, version 1.9.12) based on the Pfaffl method [41,42]. Relative expression ratios greater than  $\pm 1.5$  were considered significant. A Brown–Forsythe test was applied, followed by Tukey's post hoc test.

#### 4.12. Confocal Laser Scanning Microscopy

The occurrence of persisters in *C. auris* biofilm was also evaluated by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The biofilm was allowed to form for 48 h on Nunc™ Lab-Tek® 8-well Chamber Slides (n° 177445; 209 Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada) and treated with 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  caspofungin. Then, it was thoroughly washed with PBS and stained with 5  $\mu\text{M}$  SYTO9 (ThermoFisher Scientific MA, USA) that penetrates both viable and nonviable cells, followed by 20  $\mu\text{M}$  propidium iodide, a non-vital nuclear stain commonly used for identifying dead cells, for 15 min at room temperature, in the dark. Observation was performed with Zeiss LSM700 microscope at 20× magnification.

#### 4.13. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (version 8.02 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) (accessed on 6 November 2021)). Data were reported as the mean  $\pm$  standard deviation obtained from three independent experiments. Data of development of a new biofilm from persisters and of effect of *L. angustifolia* free and liposome-encapsulated oil on planktonic cells were analysed by one-way ANOVA followed by Holm–Sidak's test ( $p < 0.05$ ); data of eradication were analysed by two-way ANOVA followed by Tukey's test for the difference between the groups.

## 5. Conclusions

Our results show that persister cells tolerant to caspofungin are present in a biofilm of *C. auris*. Persisters can progressively re-colonize the support, giving rise to a new persister-derived biofilm.

*L. angustifolia* oil shows antifungal and antibiofilm properties in the two formulations tested towards *C. auris*, being effective also against persister-derived biofilm.

Overall, the results indicate the possibility of extending the use of EOs, confirming the great potential represented by the use of alternative compounds to combat emergent fungal pathogen infections.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11010026/s1>, Table S1: Name, acronym, sequence and references of used primer for RT-qPCR; Table S2: Data of expression levels in *C. auris* biofilm.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.G. and E.d.A.; data curation, A.M. and A.F.; formal analysis, M.M.S.; funding acquisition, M.G.; investigation, M.M.S., R.B. and L.A.; project administration, E.G.; resources, M.G.; software, A.M.; supervision, S.G., E.d.A. and M.G.; validation, E.G. and E.d.A.; visualization, S.G.; writing—original draft, E.G. and E.d.A.; writing—review and editing, S.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Sergio Sorbo for the observation of samples at confocal laser scanning microscope.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Satoh, K.; Makimura, K.; Hasumi, Y.; Nishiyama, Y.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* **2009**, *53*, 41–44. [[CrossRef](#)]
2. Bidaud, A.L.; Chowdhary, A.; Dannaoui, E. *Candida auris*: An emerging drug resistant yeast—A mini-review. *J. Mycol. Méd.* **2018**, *28*, 568–573. [[CrossRef](#)]
3. Chaabane, F.; Graf, A.; Jequier, L.; Coste, A.T. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ruiz, G.B.; Lorenz, A. What do we know about the biology of the emerging fungal pathogen of humans *Candida auris*? *Microbiol. Res.* **2021**, *242*, 126621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kean, R.; Delanaey, C.; Sherry, L.; Borman, A.; Johnson, E.M.; Richardson, M.D.; Rautemaa-Richardson, R.; Williams, C.; Ramage, G. Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. *mSphere* **2018**, *3*, e00334-18. [[CrossRef](#)]
6. Kean, R.; Ramage, G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: The Global Threat of *Candida auris*. *mSphere* **2019**, *4*, e00458-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Dominguez, E.G.; Zarnowski, R.; Choy, H.L.; Zhao, M.; Sanchez, H.; Nett, J.E.; Andes, D.R. Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance. *Msphere* **2019**, *4*, e00680-18. [[CrossRef](#)]
8. Short, B.; Borwn, J.; Delanaey, C.; Sherry, L.; Williams, C.; Ramage, G.; Kean, R. *Candida auris* exhibits resilient biofilm characteristics in vitro: Implications for environmental persistence. *J. Hosp. Infect.* **2019**, *103*, 92–96. [[CrossRef](#)]
9. Taff, H.T.; Mitchell, K.F.; Edward, J.A.; Andes, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 1325–1337. [[CrossRef](#)]
10. Wuyts, J.P.; Van Dijck, P.; Holtappels, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007301. [[CrossRef](#)]
11. Galdiero, E.; de Alteriis, E.; De Natale, A.; D’Alterio, A.; Siciliano, A.; Guida, M.; Lombardi, L.; Falanga, A.; Galdiero, S. Eradication of *Candida albicans* persister cell biofilm by the membranotropic peptide gH625. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–12.
12. Aboualigalehdari, E.; Birgani, M.T.; Fatahinia, M.; Hozzeinzadeh, M. Transcription Factors of CAT1, EFG1, and BCR1 Are Effective in Persister Cells of *Candida albicans*-Associated HIV-Positive and Chemotherapy Patients. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 651221. [[CrossRef](#)]
13. LaFleur, M.D.; Kumamoto, C.A.; Lewis, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3839–3846. [[CrossRef](#)]
14. Dudiuk, C.; Berrio, I.; Leonardelli, F.; Morales-Lopez, S.; Theill, L.; Macedo, D.; Yesid-Rodriguez, J.; Salcedo, S.; Marin, A.; Gamarra, S.; et al. Antifungal activity and killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and amphotericin B against *Candida auris*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 2295–2302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Karpinski, T.M.; Ozarowski, M.; Seremak-Mrozikiewicz, A.; Wolski, H.; Adamczak, A. Plant Preparations and Compounds with Activities against Biofilms Formed by *Candida* spp. *J. Fungi* **2021**, *7*, 360. [[CrossRef](#)]
16. Butassi, E.; Svetaz, L.; Carpinella, M.C.; Efferth, T.; Zacchino, S. Fungal Biofilms as a Valuable Target for the Discovery of Natural Products That Cope with the Resistance of Medically Important Fungi—Latest Findings. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tariqa, S.; Wania, S.; Rasoola, W.; Shafia, K.; Bhat, M.A.; Prabhakar, A.; Shallaa, A.H.; Rather, M.A. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog.* **2019**, *134*, 103580. [[CrossRef](#)]
18. Tran, H.N.; Graham, L.; Adukwu, E.C. In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8911–8924. [[CrossRef](#)]
19. Wińska, K.; Mączka, W.; Łyczko, J.; Grabarczyk, M.; Czubaszek, A.; Szumny, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* **2019**, *24*, 2130. [[CrossRef](#)]
20. Minami, M.; Kita, M.; Nakaya, T.; Yamamoto, T.; Kuriyama, H.; Imanishi, J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol. Immunol.* **2003**, *47*, 681–684. [[CrossRef](#)]
21. Roller, S.; Ernest, N.; Buckle, J. The Antimicrobial Activity of High-Necrodane and Other Lavender Oils on Methicillin-Sensitive and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *J. Altern. Complementary Med.* **2009**, *15*, 275–279. [[CrossRef](#)]
22. Kraśniewska, K.; Gniewosz, M.; Kosakowska, O.; Pobięga, K. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil from lavender (*Lavandula angustifolia* L.) in commercial available preparation. *Postępy Fitoter.* **2017**, 113–118. [[CrossRef](#)]

23. Sherry, M.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Greige-Gerges, H. Essential oils encapsulated in liposomes: A review. *J. Liposome Res.* **2013**, *23*, 268–275. [[CrossRef](#)]
24. Wen, Z.; Yu, X.; Tu, S.T.; Yan, J.; Dahlquist, E. Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by  $\gamma$  TiO<sub>2</sub>–MgO mixed oxides. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 9570–9576. [[CrossRef](#)]
25. Verma, M.L.; Chaudhary, R.; Tsuzuki, T.; Barrow, C.J.; Puri, M. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 2–6. [[CrossRef](#)]
26. Drulis-Kawa, Z.; Dorotkiewicz-Jach, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int. J. Pharm.* **2010**, *387*, 187–198. [[CrossRef](#)]
27. Lockhart, S.R.; Etienne, K.A.; Vallabhaneni, S.; Farooqi, J.; Chowdhary, A.; Govender, N.P.; Colombo, A.L.; Calvo, B.; Cuomo, C.A.; Desjardins, C.A.; et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 134–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Osei Sekyere, J. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen* **2018**, *7*, e00578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Magnasco, L.; Mikulska, M.; Giacobbe, D.R.; Taramasso, L.; Vena, A.; Dentone, C.; Dettori, S.; Tutino, S.; Labate, L.; Di Pilato, V.; et al. Spread of Carbapenem-Resistant Gram-Negatives and *Candida auris* during the COVID-19 Pandemic in Critically Ill Patients: One Step Back in Antimicrobial Stewardship? *Microorganisms* **2021**, *9*, 95. [[CrossRef](#)]
30. Walraven, C.J.; Bernardo, S.M.; Wiederhold, N.P.; Lee, S.A. Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Med. Mycol.* **2013**, *52*, 131–139. [[CrossRef](#)]
31. Shaban, S.; Patel, M.; Ahmad, A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–8.
32. D’auria, F.D.; Tecca, M.; Strippoli, V.; Salvatore, G.; Battinelli, L.; Mazzanti, G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Med. Mycol.* **2005**, *43*, 391–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. de Rapper, S.; Kamatou, G.; Viljoen, A.; van Vuuren, S. The In Vitro Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Other Aroma-Therapeutic Oils. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 852049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. de Souza, E.L. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *56*, 1–12. [[CrossRef](#)]
35. Gupta, P.; Pruthi, V.; Poluri, K.M. Mechanistic insights into *Candida* biofilm eradication potential of eucalyptol. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 105–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hsu, C.C.; Lai, W.L.; Chuang, K.C.; Lee, M.H.; Tsai, Y.C. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **2013**, *51*, 473–482. [[CrossRef](#)]
37. Fothergill, A.W. Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. In *Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detect Resistance*; Hall, G.S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; pp. 65–74.
38. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* **2007**, *115*, 891–899. [[CrossRef](#)]
39. Bhattacharya, S.; Holowka, T.; Orner, E.P.; Fries, B.C. Gene Duplication Associated with Increased Fluconazole Tolerance in *Candida auris* cells of Advanced Generational Age. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13.
40. Wang, L.; Chen, R.; Weng, Q.; Lin, S.; Wang, H.; Li, L.; Fuchs, B.B.; Tan, X.; Mylonakis, E. *SPT20* Regulates the Hog1-MAPK Pathway and Is Involved in *Candida albicans* Response to Hyperosmotic Stress. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 213. [[CrossRef](#)]
41. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36. [[CrossRef](#)]
42. Riesgo, A.; Pérez-Porro, A.R.; Carmona, S.; Leys, S.P.; Giribet, G. Optimization of preservation and storage time of sponge tissues to obtain quality mRNA for next-generation sequencing. *Mol. Ecol. Resour.* **2012**, *12*, 312–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Résumé

Les bactéries présentes dans les biofilms ont une tolérance aux antibiotiques beaucoup plus élevée jusqu'à 1 000 fois supérieure à leurs homologues planctoniques et cela en raisons de la diminution de la diffusion des agents antimicrobiens dans la matrice extracellulaire, augmentation d'activité des pompes à efflux, détection de système quorum et la présence des cellules persistantes. Les huiles essentielles (HE) issues de plantes médicinales représentent une alternative valable dans le traitement des biofilms bactériennes et fongiques.

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude de synthèse d'un travail sur l'application de , l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia*, libre ou encapsulée dans des liposomes, pour éliminer les biofilms primaires et les cellules persistantes de *C. auris*, confirmant le grand potentiel des composés alternatifs contre les pathogènes fongiques émergents.

*L. angustifolia* présente des propriétés antifongiques et antibiofilm dans les deux formulations libre et encapsulée contre le biofilm primaire *C. auris*, et sur les cellules persistantes dérivées du biofilm primaire.

**Mots clés :** biofilm, huile libre, huile encapsulé, *candida auris*

## Abstract

Bacteria present in biofilms have a much higher antibiotic tolerance of up to 1,000 times their planktonic counterparts due to reduced diffusion of antimicrobial agents in the extracellular matrix, increased activity of efflux pumps, detection of quorum system and presence of persistent cells. Essential oils (OE) from medicinal plants are a valuable alternative in the treatment of bacterial and fungal biofilms.

The objective of this work is to carry out a synthesis study of a work on the application of , the essential oil of *Lavandula angustifolia*, free or encapsulated in liposomes, to eliminate primary biofilms and persistent cells of *C. auris*, confirming the great potential of alternative compounds against emerging fungal pathogens.

*L. angustifolia* has antifungal and antibiofilm properties in both free and encapsulated formulations against the primary biofilm *C. auris*, and on persistent cells derived from the primary biofilm.

**keywords:** biofilm, free oil, encapsulated oil, *candida auris*

## المخلص

تتمتع البكتيريا الموجودة في الأغشية الحيوية بتحمل مضاد حيوي أعلى بكثير يصل إلى 1000 ضعف نظيراتها من العوالق بسبب انخفاض انتشار العوامل المضادة للميكروبات في المصفوفة خارج الخلية، وزيادة نشاط مضخات التدفق، واكتشاف نظام النصاب ووجود الخلايا الثابتة. الزيوت الأساسية من النباتات الطبية هي بديل قيم في علاج الأغشية الحيوية البكتيرية والفطرية. الهدف من هذا العمل هو إجراء دراسة توليفية لعمل حول تطبيق زيت *Lavandula angustifolia* ، الحر أو المغلف في liposomes ، للقضاء على الأغشية الحيوية الأولية والخلايا الثابتة من *C. auris* ، مما يؤكد الإمكانات الكبيرة للمركبات البديلة ضد مسببات الأمراض الفطرية الناشئة.

يتميز *L. angustifolia* بخصائص مضادة للفطريات ومضادة للفيلم في كل من التركيبات الحرة والمغلقة مقابل الأغشية الحيوية الأولية *C. auris* ، وعلى الخلايا الثابتة المشتقة من الأغشية الحيوية الأولية.

**الكلمات الرئيسية:** أغشية حيوية، زيت حر، زيت مغلف، *Candida auris*