

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD– TLEMCEM –
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE
ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



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

THESE

Présentée
En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Spécialité : **Microbiologie**

Par : **Mr. BENZIANE Mohammed Yassine**

Thème

**Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de plantes
endémiques contre la candidose orale chez les patients
immunodéprimés au CHU de Tlemcen**

Soutenue publiquement, le 21/12/2023 devant le jury composé de :

Président	LAZOUNI HAMADI Abderrahmane	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	BENDAHOU Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs	SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib	Professeur	Centre Universitaire de Naâma
	BEKHECHI Chahrazed	Professeur	Université de Tlemcen
	KHADIR Abdelmounaim	Docteur	Université d'Oran 1

Année Universitaire : 2022 ~ 2023

Dédicaces

À mes parents et ma famille, je dédie cette thèse avec amour et gratitude infinis.
Votre soutien inconditionnel a été la force motrice derrière mes réalisations. Merci
d'avoir été mes piliers tout au long de ce parcours.

Mohammed Yassine

Remerciements

Ce travail a été mené au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, sous la direction de Monsieur **Bendahou Mourad**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à la directrice du laboratoire LAMAABE, Madame **Hassaine Hafida**, professeure à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein du laboratoire. Je suis également reconnaissant pour les moyens matériels qu'elle a mis à ma disposition, et qui m'ont permis de mener à bien mes recherches.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Monsieur **Bendahou Mourad**, professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, pour son encadrement attentif et son soutien tout au long de ce projet. Ses conseils avisés, son expertise et son dévouement ont grandement contribué à la réussite de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au président, Monsieur **Lazouni Hamadi Abderrahmane**, professeur à l'Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté avec bienveillance de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur **Seddiki Sidi Mohammed Lahbib**, professeur au Centre Universitaire de Naâma, qui m'a fait l'honneur d'examiner cette thèse.

Je remercie Madame **Bekhechi Chahrazed**, professeur à l'Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir généreusement accepté d'examiner cette thèse.

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur KHADIR Abdelmounaim, docteur à l'Université d'Oran, pour son soutien continu tout au long de ce travail, ainsi que pour sa disponibilité et sa bienveillance dans l'évaluation de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers Monsieur BENBELAID Fethi, docteur à l'Université de Biskra, pour ses conseils éclairés et son soutien précieux tout au long de cette thèse.

Je remercie également Monsieur Muselli Alain directeur du laboratoire CPN de l'Université de Corse (France) pour l'analyse des huiles essentielles.

Mes remerciements vont également au personnel du service d'Hématologie Clinique au CHU de Tlemcen, en particulier Docteurs Bendahmane Ahmed Fouad et Belhadeh Hanane, pour leur accueil, leur soutien et leur gentillesse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur LOUCIF Lotfi, professeur à l'Université de Batna 2, pour son expertise et son soutien dans l'identification des souches par MALDI-TOF/SM.

Je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur Medjahedi Boumediène, professeur au département de foresterie de l'Université de Tlemcen pour son assistance précieuse dans l'identification des plantes.

Je suis reconnaissant envers toutes les personnes du laboratoire LAMAABE, enseignants, doctorants et ingénieurs, pour les moments précieux que nous avons partagés ensemble, que ce soit lors de discussions scientifiques, de séminaires, de collaborations ou simplement dans nos échanges informels. Ces interactions ont créé un environnement stimulant et convivial, propice à l'épanouissement académique et personnel.

Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont contribué, directement ou indirectement, à l'accomplissement de ce travail.

عنوان: الأنشطة المضادة للميكروبات لزيت أساسية مستخلصة من نباتات محلية ضد داء المبيضات الفموي عند المرضى الذين يعانون من نقص المناعة في المستشفى الجامعي لتلمسان.

ملخص

في السنوات الأخيرة، أصبح الانتشار المتزايد لداء المبيضات الفموي، خاصة عند المرضى الذين يعانون من نقص المناعة، يشكل مصدر قلق كبير نظراً لظهور مقاومة للأدوية الحالية المضادة للفطريات وندرتها في الصيدليات. هدف هذه الدراسة كان استكشاف داء المبيضات الفموي عند المرضى الذين يعانون من نقص المناعة في مستشفى جامعة تلمسان وتقييم تأثير الزيوت الأساسية من نباتات *Origanum glandulosum*، *Ammoides verticillata*، و *Saccocalyx satureioides* على سلالات *Candida* المعزولة. تم عزل 27 سلالة من *Candida*، تنتمي لثلاثة أنواع مختلفة: *Candida albicans* (74.07%)، *Candida glabrata* (22.22%) و *Candida krusei* (3.70%). وجد أن 65% من سلالات *Candida albicans* مقاومة للفلوكونازول بينما كانت جميع السلالات المعزولة حساسة لأمفوتيريسين ب. أظهرت الزيوت الأساسية المختارة الغنية بثيمول نشاطاً كبيراً ضد سلالات *Candida*، سواء في الحالة البلاكتونية أو البيوفيلم. كانت تراكيز الزيوت الأساسية الدنيا المثبطة والتراكيز الدنيا المبيدة للفطريات بين 250 إلى 2000 ميكروغرام/مل. بالإضافة إلى ذلك، أثبتت الزيوت الأساسية قدرتها على تثبيط والقضاء على البيوفيليمات بتراكيز 500 و 1000 ميكروغرام/مل على التوالي. أظهر المجهر الإلكتروني الماسح انخفاضاً في البيوفيليمات المشكلة مسبقاً بعد المعالجة بزيت *Origanum glandulosum*، سواء البيوفيليمات الأحادية الأنواع أو المختلطة. أظهر مزيج زيت *Origanum glandulosum* مع أمفوتيريسين ب تأثيراً تآزرياً ضد *Candida albicans*.

الكلمات الدالة: *Candida*، بيوفيلم، داء المبيضات الفموي، نباتات محلية، زيوت أساسية، نشاط مضادات الميكروبات.

Titre : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de plantes endémiques contre la candidose orale chez les patients immunodéprimés au CHU de Tlemcen.

Résumé

Ces dernières années, la prévalence croissante de la candidose orale, en particulier chez les patients immunodéprimés, est devenue une préoccupation majeure en raison de l'émergence de résistances aux antifongiques existants et la pénurie de ces derniers dans les pharmacies. L'objectif assigné à ce travail était d'explorer la candidose orale chez des patients immunodéprimés au CHU de Tlemcen et d'évaluer l'effet des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*, *Ammoides verticillata* et *Saccocalyx satureioides* sur les souches de *Candida* isolées. Au total, 27 souches de *Candida* ont été isolées, révélant trois espèces différentes : *Candida albicans* (74,07%), *Candida glabrata* (22,22%) et *Candida krusei* (3,70%). 65% de souches *Candida albicans* étaient résistantes au fluconazole alors que toutes les souches isolées étaient sensibles à l'amphotéricine B. Les huiles essentielles sélectionnées riches en thymol ont démontré une activité significative contre les souches de *Candida*, tant à l'état planctonique qu'en biofilm. Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales fongicides des huiles essentielles se sont situées entre 250 et 2000 µg/mL. De plus, les huiles essentielles ont inhibé et éradiqué les biofilms à des concentrations de 500 et 1000 µg/mL respectivement. L'observation au microscope électronique à balayage a révélé une réduction des biofilms préformés suite au traitement avec l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, que ce soit pour les biofilms mono-espèce ou mixte. L'association de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* avec l'amphotéricine B a montré un effet synergique contre *Candida albicans*.

Mots-clés: *Candida*, Biofilm, Candidose orale, plantes endémiques, huiles essentielles, Activité antimicrobienne.

Title: Antimicrobial activities of essential oils from endemic plants against oral candidiasis in immunocompromised patients at the CHU of Tlemcen.

Abstract

In recent years, the increasing prevalence of oral candidiasis, particularly in immunocompromised patients, has become a major concern due to the emergence of resistance to existing antifungal drugs and their shortage in pharmacies. The objective of this study was to explore oral candidiasis among immunocompromised patients at the Tlemcen University Hospital and evaluate the effect of essential oils from *Origanum glandulosum*, *Ammoides verticillata*, and *Saccocalyx satureioides* against isolated *Candida* strains. In total, 27 *Candida* strains were isolated, revealing three different species: *Candida albicans* (74.07%), *Candida glabrata* (22.22%), and *Candida krusei* (3.70%). 65% of *Candida albicans* strains were resistant to fluconazole, while all isolated strains were sensitive to amphotericin B. The selected thymol-rich essential oils, demonstrated significant activity against *Candida* strains, both in planktonic and biofilm states. The minimum inhibitory concentrations and minimum fungicidal concentrations of the essential oils were between 250 to 2000 µg/mL. Furthermore, the essential oils inhibited and eradicated biofilms at concentrations of 500 and 1000 µg/mL, respectively. Scanning electron microscopy revealed a reduction in preformed biofilms following treatment with the essential oil of *Origanum glandulosum*, for both mono-species and mixed biofilms. The combination of the essential oil of *Origanum glandulosum* with amphotericin B showed a synergistic effect against *Candida albicans*.

Keywords: *Candida*, Biofilm, Oral candidiasis, Endemic plants, Essential oils, Antimicrobial activity.

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	4
1. Candidose orale	4
1.1. Présentation clinique de la candidose orale	4
1.1.1. La candidose pseudomembraneuse	5
1.1.2. La candidose atrophique chronique	5
1.1.3. La candidose hyperplasique	5
1.1.4. La candidose érythémateuse aiguë	6
1.1.5. La chéilite angulaire	6
1.1.6. La candidose mucocutanée chronique	6
1.1.7. La glossite rhomboïde médiane	6
1.2. Traitement de la candidose orale	6
1.3. Les principales espèces responsables de candidose orale	13
1.3.1. <i>C. albicans</i>	13
1.3.2. <i>C. glabrata</i>	14
1.4. Facteurs de virulence des espèces de <i>Candida</i>	14
1.4.1. Adhésion	14
1.4.2. Sécrétion d'enzyme hydrolytique	14
1.4.3. Transition morphologique	15
1.4.4. Formation du Biofilm	15
1.4.4.1. Processus de formation de biofilm chez les espèces de <i>Candida</i>	16
1.4.4.2. Résistance des biofilms de <i>Candida</i> sp.	18
A. L'impact de la densité de cellules de <i>Candida</i> , de la disponibilité en nutriments et des limitations de croissance.	19
B. La matrice extracellulaire	19
C. Les pompes à efflux	19
D. Les cellules persistantes	20
1.4.4.3. Les biofilms mixtes	20
2. Les huiles essentielles : une alternative naturelle pour lutter contre les infections fongiques	21
2.1. Les huiles essentielles : aperçu général	21
2.2. Extraction des huiles essentielles	22
2.3. Composition des huiles essentielles	22
2.4. Activité antifongique des huiles essentielles contre <i>Candida</i> : Mécanismes d'action	23
2.5. Activité antibiofilm des huiles essentielles contre <i>Candida</i>	24
2.6. Combinaison des huiles essentielles avec les antifongiques	24
3. Généralités sur les espèces de plantes retenues dans le présent travail	26

3.1. <i>Origanum glandulosum</i>	26
3.1.1. Présentation de la plante.....	26
3.1.2. Description botanique	27
3.1.3. Systématique d' <i>Origanum glandulosum</i>	27
3.1.4. Usage traditionnel	27
3.1.5. Composition chimique	28
3.2. <i>Ammoïdes verticillata</i>	28
3.2.1. Présentation de la plante.....	28
3.2.2. Description botanique	29
3.2.3. Systématique d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	29
3.2.4. Usage traditionnel	29
3.2.5. Composition chimique	30
3.3. <i>Saccocalyx satureioides</i>	31
3.3.1. Présentation de la plante.....	31
3.3.2. Description botanique	31
3.3.3. Systématique de <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Durieu	31
3.3.4. Usage traditionnel	32
3.3.5. Composition chimique	32
Matériel et Méthodes	33
1. Prélèvements	33
1.1. Isolement et purification des souches	33
1.2. Identification des souches	33
1.2.1. Test de blastèse (test de germination).....	33
1.2.2. Milieu CHROMagar <i>Candida</i>	33
1.2.3. Identification par galerie Api <i>Candida</i>	34
1.2.4. Identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS	34
1.3. Test de sensibilité aux antifongiques : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).	35
1.4. Étude du pouvoir des souches isolées à former des biofilms	35
1.4.1. Quantification de la biomasse du biofilm	36
2. Matériel végétal	36
2.1. Extraction des huiles essentielles	37
2.2. Analyse chimique des huiles essentielles	37
2.3. Test de sensibilité aux huiles essentielles	38
2.3.1. Technique de diffusion en gélose	38
2.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	39
2.3.3. Détermination des concentrations minimales fongicides « CMFs »	39

2.4. Effet des huiles essentielles sur les biofilms mono-espèce et mixte de <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i>	39
2.4.1. Effet des huiles essentielles sur le développement de biofilms mono-espèce et mixte : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm	39
2.4.2. Effet des huiles essentielles sur les biofilms préformés : Détermination de la concentration minimale éradicatrice de biofilm.....	40
2.5. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec amphotéricine B	41
2.6. Effet de l'huile essentielle d'<i>O. glandulosum</i> sur les biofilms préformés de <i>Candida albicans</i> et <i>Candida glabrata</i> : Observation par microscopie électronique à balayage	41
2.7. Analyse statistique	42
Résultats et discussion	43
1. Prélèvements	43
2. Isolement et identification des levures de <i>Candida</i> spp.	44
3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) aux antifongiques ...	45
4. Evaluation de la capacité de <i>Candida</i> spp. à former des biofilms	47
5. Composition chimique des huiles essentielles étudiées	48
6. Activité antifongique des huiles essentielles	50
7. Effet des huiles essentielles et de l'amphotéricine B sur le développement des biofilms.	53
8. Effet des huiles essentielles et de l'amphotéricine B sur les biofilms préformé	55
9. Effet synergique des huiles essentielles combinées à l'amphotéricine B contre les souches planctoniques de <i>Candida albicans</i> et <i>Candida glabrata</i>.	56
Conclusion générale	58
Références bibliographiques	60
Annexes	81
Publications	83

Liste des Figures

Figure 1: Manifestations cliniques de la candidose orale. (A) Candidose pseudomembraneuse, (B) Candidose érythémateuse aiguë (C) Stomatite dentaire associée à <i>Candida</i> , (D) Candidose hyperplasique	4
Figure 2: Les principaux antifongiques utilisés dans le traitement de la candidose orale et leurs mécanismes d'action.....	7
Figure 3: Structure chimique des polyènes	7
Figure 4: Structure chimique des azolés.....	9
Figure 5: Structure chimique des échinocandines.....	11
Figure 6: Phases de la formation du biofilm de <i>Candida</i>	16
Figure 7: Mécanisme de résistance des biofilms de <i>Candida</i> sp.	18
Figure 8: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles.....	23
Figure 9: Mécanisme d'action des combinaisons synergiques d'huiles essentielles et d'antibiotiques contre <i>Candida</i> spp.....	25
Figure 10: Composants majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i> Desf.	28
Figure 11: Composants majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i>	30
Figure 12: Composants majoritaires de l'huile essentielle <i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Dur.	32
Figure 13: Stations de récolte des plantes	36
Figure 14: Conversion de résazurine en résorufine.....	40
Figure 15: Interprétation des résultats de la technique Checkerboard	41
Figure 16: Répartition par âge et par sexe des patients.....	43
Figure 17: Distribution des <i>Candida</i> spp. isolées de la cavité orale des patients atteint de candidose orale au service d'hématologie clinique du CHU de Tlemcen.....	44

Figure 18: Capacité des souches <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> à former des biofilms.....	47
Figure 19: Capacité des souches <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> à former un biofilm mixte	48
Figure 20: Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles sur <i>C. albicans</i> par diffusion sur disque.....	51
Figure 21: Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles sur <i>C. glabrata</i> par diffusion sur disque.....	51

Liste des Tableaux

Tableau 1: Résultats des CMI (µg/mL) de fluconazole, amphotéricin B, et de la caspofungine vis-à-vis les souches <i>Candida</i> isolées	46
Tableau 2: Composition chimique des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> , d' <i>Origanum glandulosum</i> et de <i>S. satureioides</i>	49
Tableau 3: CMI, CMF, et CMF/CMI (µg/mL) des huiles essentielles contre <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i>	52
Tableau 4: Effets des huiles essentielles étudiées et de l'amphotéricine B sur des biofilms mono-espèce et mixtes de <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> (en µg/mL).	54
Tableau 5: Résultats de la combinaison des huiles essentielles avec l'amphotéricine B.	57
Tableau 6: Répartition par âge et par sexe des patients	81
Tableau 7: Capacité des souches <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> à former des biofilms.....	81
Tableau 8: Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles sur <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> par diffusion sur disque.....	82

Liste des Photos

Photo 1: <i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>glandulosum</i> Terni-Tlemcen (2019).....	27
Photo 2: <i>Ammoides verticillata</i> Terni-Tlemcen (2019).....	29
Photo 3: <i>Saccocalyx satireioides</i> Coss. et Dur. Ain-Sefra (2019).....	31
Photo 4: Dispositif Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	37
Photo 5: Microscopie électronique à balayage Hitachi TM-1000.....	42
Photo 6: Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches <i>Candida</i>	51
Photo 7: Effet des huiles essentielles étudiées sur les biofilms de <i>Candida</i>	54
Photo 8: Les images MEB de l'effet d'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> à 1× CMI sur les biofilms mono-espèce et mixte préformés de <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i>	56

Liste des abréviations

AmB: Amphotéricine B.

ATCC: American Type Culture Collection.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CMF: Concentration minimale Fongicide.

CMIB: Concentration minimale inhibitrice du biofilm.

CMEB: Concentration minimale éradicatrice du biofilm.

CFI: Concentration fractionnelle inhibitrice.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse.

FLC : Fluconazole.

H.E : Huile essentielle.

ICIF : Indice de concentration inhibitrice fractionnaire.

MOPS: Morpholinepropanesulfonic.

MEB: Microscope Electronique à Balayage.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

RPMI: Roswell Park Memorial Institut

Introduction

Les infections opportunistes représentent un défi majeur pour les patients immunodéprimés. Ces derniers ont un système immunitaire affaibli, ce qui les rend plus susceptibles de développer des infections. L'immunodépression peut être causée par divers facteurs tels que le VIH/SIDA, la chimiothérapie, la radiothérapie, les maladies auto-immunes, la transplantation d'organes, les maladies hématologiques, les maladies inflammatoires chroniques et la prise de médicaments immunosuppresseurs. Cette condition affaiblit le système immunitaire, augmentant ainsi la vulnérabilité des patients aux infections, notamment la candidose orale.

La candidose orale est l'une des infections opportunistes fongique les plus courantes chez ces patients. Elle est causée par une croissance excessive du champignon *Candida* dans la bouche. Bien que ce champignon soit normalement présent dans la bouche en petite quantité, lorsque le système immunitaire est affaibli, il peut se développer rapidement et causer des symptômes tels que des douleurs, des brûlures, une perte de poids, une détérioration de l'état nutritionnel et une diminution de la qualité de vie. Il est important de noter également que cette infection peut entraîner des complications graves dans les cas les plus sévères, telles que la propagation de l'infection à d'autres parties du corps et une septicémie. Par conséquent, un diagnostic rapide et un traitement efficace de l'infection fongique sont cruciaux (**Vila et al.,2020; Gheorghe et al., 2021**).

L'antifongique le plus efficace contre *Candida* spp. reste l'amphotéricine B sauf que son utilisation prolongée peut entraîner des effets secondaires indésirables tels que des nausées, des vomissements, des diarrhées, des maux de tête et des troubles hépatiques (**Laniado-Laborín et Cabrales-Vargas, 2009**). De plus, en raison de la préoccupation croissante quant au développement de la résistance aux antifongiques conventionnels, son efficacité peut être compromise, ce qui rend difficile la lutte contre l'infection. Devant ces problèmes, il est impératif de trouver de nouvelles options de traitement efficaces et sûres pour cette infection. Parmi les alternatives, l'utilisation des huiles essentielles a montré leur efficacité comme agents naturels antifongiques. De nombreuses recherches ont été menées pour évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles. Par exemple, une étude récente menée par **Jafri et Ahmad (2020)** s'est penchée sur l'impact de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de son principal composé actif, le thymol, sur *C. tropicalis*. Les résultats ont été remarquables: l'huile essentielle et le thymol, à des concentrations allant de 0,78 à 25 µg/mL, ont entraîné une réduction significative de la formation de biofilm par *C. tropicalis*. De plus, d'autres huiles essentielles se sont révélées particulièrement efficaces contre des souches de *Candida* multi-résistantes. L'huile essentielle de lemongrass, le citral et le cinnamaldéhyde ont ainsi démontré des activités inhibitrices significatives, avec des CMI's allant de 90 à 100 µg/mL, surpassant ainsi l'efficacité du fluconazole et de l'amphotéricine

B (**Khan et al., 2012**). Un autre exemple est celui de l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha piperita*), qui a révélé une puissante activité antifongique contre *Candida* spp., des dermatophytes et d'*Aspergillus* spp. Les CMI obtenues se situent entre 40 et 7000 µg/mL, entre 800 et 3500 µg/mL et entre 400 et 3500 µg/mL, respectivement (**Stringaro et al., 2018**).

En effet, les huiles essentielles possèdent des propriétés antifongiques, anti-inflammatoires et analgésiques qui peuvent aider à soulager les symptômes de la candidose orale (**Ferreira et al., 2021; Singh et al., 2022**). Contrairement aux antifongiques conventionnels, elles ont un profil de sécurité supérieur et présentent moins d'effets secondaires indésirables (**Nazzaro et al., 2017; Cuenca-León et al., 2022; Shala et al., 2022**).

L'Algérie est un pays riche en biodiversité végétale et en plantes médicinales endémiques, utilisées depuis des siècles dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter diverses affections. Cependant, avant que les huiles essentielles puissent être considérées comme une alternative, il est nécessaire de mener des études rigoureuses pour évaluer leur efficacité. C'est dans ce contexte que la présente thèse a pour objectif d'évaluer l'effet inhibiteur de certaines huiles essentielles extraites de plantes médicinales endémiques algériennes sur les souches de *Candida albicans* et *Candida glabrata* isolées à partir de patients hospitalisés présentant des symptômes de candidose orale dans le service d'hématologie clinique du CHU de Tlemcen. Cette étude a été motivée par la récente rupture de stock de Fungizone en Algérie, l'antifongique le plus utilisé, en particulier chez les patients atteints d'hémopathies malignes, ce qui a entraîné une augmentation du nombre de cas de candidose orale chez ces patients. En outre, cette recherche s'inscrit dans une démarche de valorisation des substances naturelles antimicrobiennes d'origine végétale, visant à explorer les propriétés curatives de ces plantes endémiques dans la lutte contre les infections fongiques. Les résultats de cette étude pourraient ainsi contribuer à la mise au point de nouvelles thérapies pour le traitement de la candidose orale, et ouvrir la voie à de nouvelles pistes de recherche sur les huiles essentielles comme alternatives thérapeutiques aux antifongiques conventionnels.

Dans cette optique, cette thèse vise à évaluer si les extraits des plantes retenues, en l'occurrence les huiles essentielles des plantes endémiques choisies, ont une bonne action sur les souches de *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Cette étude se penchera également sur les interactions éventuelles avec les antifongiques les plus utilisés pour le traitement de la candidose orale, ainsi que sur l'effet sur les biofilms mono-espèce et mixte formés par ces deux souches.

Pour atteindre ces objectifs, cette étude est divisée en trois parties. La première partie présente une synthèse bibliographique sur la candidose orale, le biofilm *Candida* et sur l'importance des huiles essentielles pour la lutte contre les infections fongiques. La deuxième partie est consacrée à la

présentation des différentes méthodes utilisées pour l'identification, la caractérisation des souches *Candida* et l'évaluation de la sensibilité des souches aux huiles essentielles. Enfin, la troisième partie présente les résultats et les discussions.

Synthèse bibliographique

1. Candidose orale

La candidose orale est une infection opportuniste de la cavité buccale. Elle est courante chez les personnes âgées, en particulier celles qui portent des prothèses dentaires, les personnes immunodéprimés, tels que ceux atteints du VIH/SIDA, d'un cancer et du diabète, ainsi que chez ceux qui utilisent des corticostéroïdes ou des antibiotiques. Elle est causée par une prolifération ou une infection de la cavité buccale par un champignon de type levure, *Candida*. *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* représentent plus de 80% des isolats d'infection clinique. Cependant, la prolifération de *Candida* peut entraîner une gêne locale, une altération de la sensation de goût, une dysphagie due à une prolifération œsophagienne entraînant une mauvaise nutrition, une récupération lente et une hospitalisation prolongée. Chez les patients immunodéprimés, l'infection peut se propager dans le sang ou le tractus gastro-intestinal supérieur, entraînant une infection sévère avec une morbidité et une mortalité significatives (Akpan et Morgan, 2002).

1.1. Présentation clinique de la candidose orale

Il existe différents types de candidose orale, tels que la candidose pseudomembraneuse, la candidose atrophique chronique, la candidose hyperplasique, la candidose érythémateuse aiguë, la chéilite angulaire, la candidose mucocutanée chronique et la glossite rhomboïde médiane (figure 1).

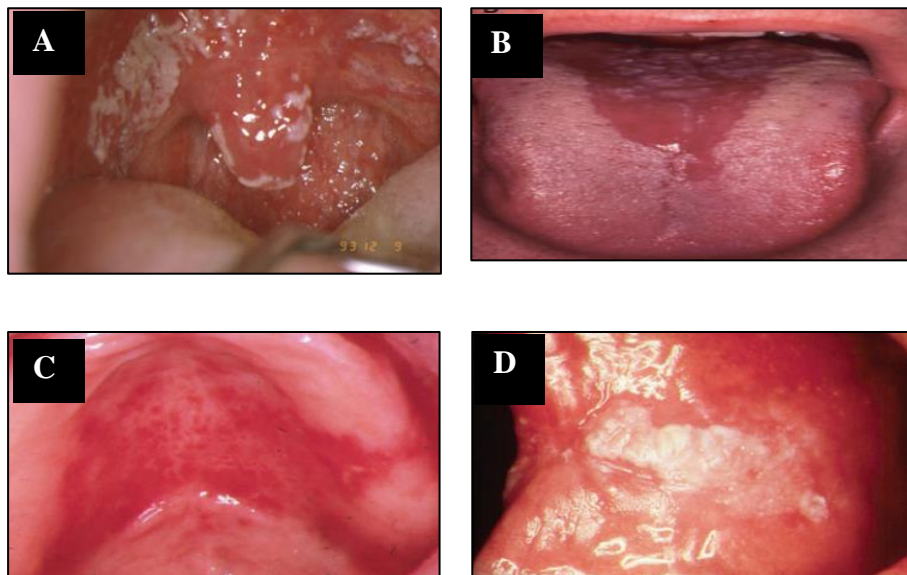


Figure 1: Manifestations cliniques de la candidose orale (Samaranayake et al., 2009).

(A) Candidose pseudomembraneuse, (B) Candidose érythémateuse aiguë, (C) Stomatite dentaire associée à *Candida*, (D) Candidose hyperplasique

1.1.1. La candidose pseudomembraneuse

La candidose pseudomembraneuse également connue sous le nom de muguet, est une infection courante chez les nouveau-nés et est associée à une immunodéficience chez les patients atteints du SIDA et du cancer, ainsi qu'à ceux recevant des thérapies immunosuppressives. Elle se présente sous la forme de plaques crémeuses blanches-jaunes qui apparaissent sur toute la muqueuse buccale et qui peuvent être facilement enlevées par un grattage doux, laissant une base érosive rouge sous-jacente. Ces plaques sont constituées de cellules épithéliales et immunitaires desquamées, ainsi que de levures et de filaments (**Samaranayake et al., 2009; Millsop et Fazel, 2016; Vila et al., 2020**).

1.1.2. La candidose atrophique chronique

La candidose atrophique chronique également appelée stomatite dentaire associée à *Candida*, est caractérisée par une rougeur et un gonflement chronique du tissu en contact avec la surface d'ajustement de la prothèse. Elle est causée par une prolifération de *Candida*, entre la prothèse et le palais. Bien que cette condition soit généralement asymptomatique, les patients peuvent présenter des symptômes tels que des douleurs, des brûlures, des picotements et une chéilite angulaire. Les principaux facteurs qui favorisent cette affection sont une hygiène buccale insuffisante, le port des prothèses dentaires pendant le sommeil et une mauvaise adaptation de la prothèse. En effet, jusqu'à 75 % des porteurs de prothèses dentaires présentent des signes cliniques de cette affection, ce qui en fait la forme la plus courante de candidose orale (**Samaranayake et al., 2009; Williams et al., 2012**).

1.1.3. La candidose hyperplasique

La candidose hyperplasique également connue sous le nom de leucoplasie candidale, est un type rare de candidose orale. Elle se caractérise par des lésions élevées et chroniques qui peuvent varier en taille et en opacité, et présenter des zones dures et rugueuses lors de la palpation. Contrairement à la candidose pseudomembraneuse, les lésions de la candidose hyperplasique ne se détachent pas facilement. Ces lésions sont généralement situées sur la surface interne des joues et moins fréquemment sur la langue, et présentent un risque de transformation maligne. Une biopsie est recommandée pour confirmer le diagnostic lorsque les lésions ne répondent pas au traitement antifongique (**Samaranayake et al., 2009; Williams et al., 2012; Vila et al., 2020**).

1.1.4. La candidose érythémateuse aiguë

La candidose érythémateuse aiguë est causée par une prolifération excessive du *Candida* après une thérapie antibiotique à large spectre et se caractérise cliniquement par une plaque rougeâtre qui apparaît fréquemment sur la partie moyenne à postérieure du dos de la langue, le palais ou la muqueuse buccale interne. Cette infection est généralement résolue sans traitement (**Samaranayake et al., 2009; Williams et al., 2012; Vila et al., 2020**).

1.1.5. La chéilite angulaire

La chéilite angulaire est une condition caractérisée par des lésions érythémateuses qui se produisent à un ou aux deux coins de la bouche. Outre *Candida*, diverses espèces de streptocoques et *Staphylococcus aureus* ont également été identifiés dans cette condition, soit seuls, soit en combinaison (**Samaranayake et al., 2009; Williams et al., 2012; Vila et al., 2020**).

1.1.6. La candidose mucocutanée chronique

La candidose mucocutanée chronique est une condition rare dans laquelle on observe une variété d'infections chroniques à *Candida* des muqueuses, de la peau et des ongles. Le principal facteur prédisposant à la candidose mucocutanée chronique est une immunité cellulaire altérée congénitale contre *Candida* (**Samaranayake et al., 2009; Williams et al., 2012; Vila et al., 2020**).

1.1.7. La glossite rhomboïde médiane

La glossite rhomboïde médiane caractérisée par une zone chronique et symétrique située à l'avant des papilles circumvallées, est souvent liée au tabagisme et à l'utilisation de stéroïdes inhalés. Dans plus de 85% des cas, la présence de *Candida* peut être détectée par une biopsie (**Samaranayake et al., 2009; Williams et al., 2012; Vila et al., 2020**).

1.2. Traitement de la candidose orale

Le traitement de la candidose orale repose sur trois piliers : le dépistage précoce et précis du type de candidose, la correction des facteurs de risque ou des maladies sous-jacentes, et l'utilisation des antifongiques les plus adaptés. La promotion d'une bonne hygiène buccale et d'examen réguliers pour contrôler les facteurs de risque ou les éléments facilitant l'infection sont également importants pour prévenir et faciliter le traitement. Les antifongiques sont classés en trois grandes familles: les polyènes, les azolés et les échinocandines (**figure 2**). Le traitement peut être administré par voie topique ou systémique, et les formulations orales sont couramment utilisées. Les antifongiques topiques sont appliqués directement sur la zone affectée et sont efficaces pour traiter les infections localisées. Les médicaments systémiques sont prescrits lorsque l'infection est plus répandue et que la thérapie topique n'a pas été suffisante. Les antifongiques topiques ont généralement des effets

secondaires minimales et n'interagissent pas avec d'autres médicaments. Les diverses formulations de médicaments antifongiques disponibles, telles que les comprimés, les gels et les dentifrices, sont très efficaces pour guérir la plupart des cas de candidose orale en quelques semaines (García-Cuesta et al., 2014; Quindós et al., 2019).

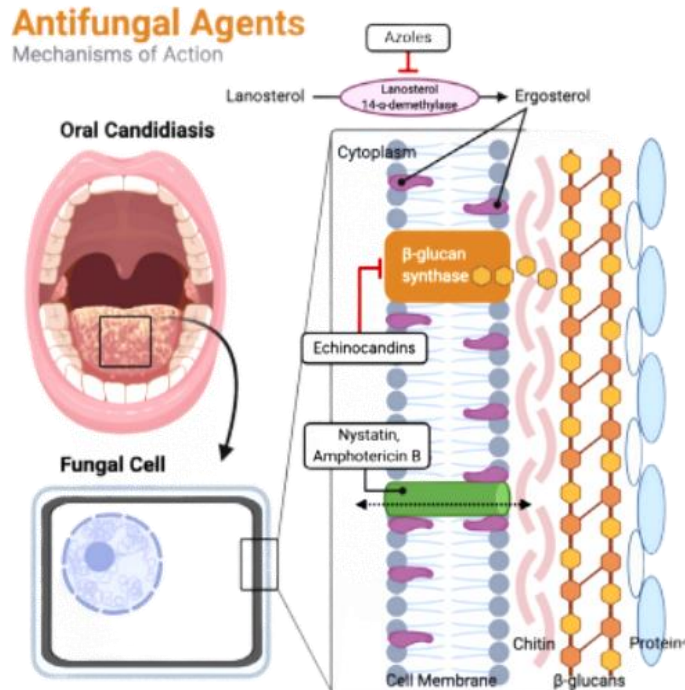


Figure 2: Les principaux antifongiques utilisés dans le traitement de la candidose orale et leurs mécanismes d'action (Lombardi et Ouanounou, 2020)

Les polyènes

Les polyènes représentent la première classe d'agents antifongiques utilisés en pratique clinique, grâce à leurs puissantes propriétés fongicides et leur spectre d'activité le plus large parmi toutes les molécules antifongiques connues (figure 3). En tant que perturbateurs de l'ergostérol, un composant vital des membranes cellulaires fongiques, les polyènes interagissent avec l'ergostérol, formant des complexes qui perturbent la membrane plasmique fongique. En conséquence, la membrane devient plus perméable, ce qui entraîne la fuite du contenu cellulaire et finalement la destruction de la cellule fongique (Kathiravan et al., 2012).

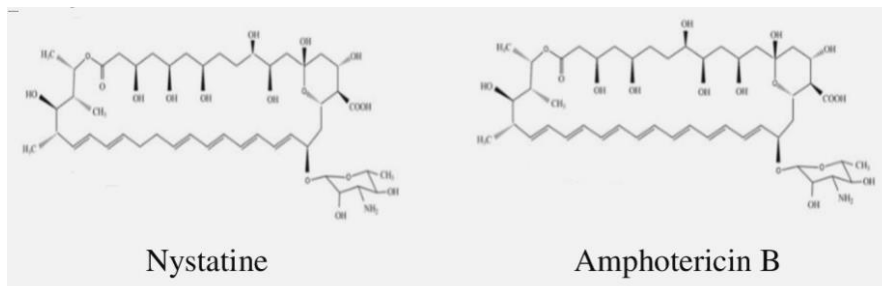


Figure 3: Structure chimique des polyènes

Un de ces polyènes est la nystatine, un composé macrolide actif contre les membranes fongiques, découverte en 1950 par fermentation de *Streptomyces noursei*. En plus de son effet sur l'ergostérol, la nystatine induit des dommages cellulaires secondaires par auto-oxydation. Bien qu'elle ne soit pas absorbée par voie orale, la nystatine s'est avérée efficace dans le traitement de la candidose oropharyngée lorsqu'elle est appliquée localement. Cependant, il est important de noter que les effets indésirables de la nystatine comprennent une irritation locale, ainsi que des nausées, des vomissements et des diarrhées lorsqu'elle est prise par voie orale. Bien que son utilisation parentérale soit connue pour être toxique, des essais cliniques récents ont exploré le potentiel d'une formulation liposomale pour l'administration intraveineuse. La nystatine est disponible sous différentes formes pour répondre à différents besoins de traitement, notamment une suspension buvable, une crème topique et une pastille orale. Malgré son efficacité, l'obtention de résultats de traitement réussis avec la nystatine repose sur une administration cohérente pendant une durée adéquate (**Pappas et al., 2016; Quindós et al., 2019**).

L'amphotéricine B, un autre polyène largement utilisé, est employée depuis plusieurs années dans le traitement de la candidose orale. En plus de son effet sur l'ergostérol, des preuves indiquent que l'amphotéricine B joue également un rôle d'agent pro-inflammatoire, contribuant ainsi à stimuler la réponse immunitaire innée de l'hôte. Ce mécanisme implique l'interaction entre l'amphotéricine B et le récepteur de type Toll 2 (TLR-2), le récepteur CD14, ce qui entraîne la libération ultérieure de cytokines, de chimiokines et d'autres médiateurs immunologiques (**Thompson et al., 2009**). Malheureusement, il devient de plus en plus difficile de trouver des préparations topiques de ce médicament antifongique dans de nombreux pays. La Société des maladies infectieuses d'Amérique (IDSA) suggère d'utiliser une suspension buccale d'amphotéricine B désoxycholate comme traitement alternatif pour la candidose orale qui ne répond pas au fluconazole (**Pappas et al., 2016**). Dans les cas graves, la formulation intraveineuse conventionnelle d'amphotéricine B désoxycholate, ainsi que les formulations moins néphrotoxiques telles que l'amphotéricine B liposomale et l'amphotéricine B complexe lipidique, peuvent être utilisées. Lorsque la résistance à l'amphotéricine B se produit, elle est généralement attribuée à des réductions dans la biosynthèse de l'ergostérol ou à la synthèse de stérols alternatifs ayant une affinité réduite pour l'amphotéricine B (**Thompson et al., 2009; Hamill, 2013**).

Les azolés

Les azolés constituent le groupe le plus important d'agents antifongiques disponibles. Ces composés organiques cycliques se divisent en deux catégories principales: les imidazoles et les triazoles (**figure 4**). Leur principal mode d'action consiste à inhiber le processus de déméthylation en position 14 α du lanostérol dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. En épuisant l'ergostérol

et en incorporant des stérols atypiques, ces agents perturbent la perméabilité et la fluidité normales de la membrane fongique, ce qui affecte les enzymes liées à la membrane impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire (**Odds et al., 2003**).

Les imidazoles tels que le miconazole et le kétoconazole ont été les premiers azolés développés (**Kathiravan et al., 2012**). En laboratoire, le miconazole a démontré une efficacité antifongique remarquable contre *Candida*. Cependant, il est moins efficace contre certaines souches de *C. glabrata* et *C. krusei*. Le miconazole peut être administré par voie topique, orale ou intraveineuse, bien que ces dernières méthodes soient moins courantes. Diverses formulations de miconazole sont disponibles, notamment des comprimés buccaux, du chewing-gum, du gel oral et du vernis. Une récente méta-analyse réalisée par **Zhang et al. (2016)** a suggéré que le miconazole est plus efficace que la nystatine pour le traitement de la candidose orale pseudomembraneuse. Cependant, l'utilisation topique du miconazole peut parfois entraîner des démangeaisons ou une sensation de brûlure en raison d'une irritation locale (rapportée chez moins de 5% des patients). De plus, le miconazole présente un potentiel d'interaction avec d'autres médicaments (**Hellfritsch et al., 2017**).

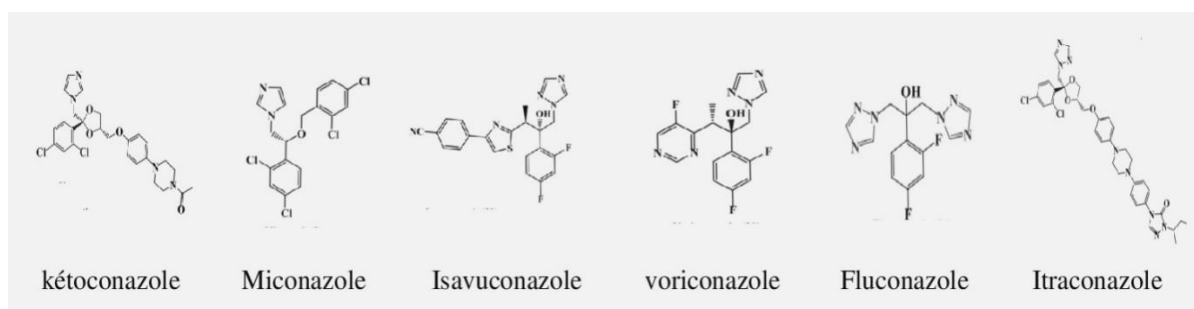


Figure 4: Structure chimique des azolés

Le kétoconazole, le premier imidazole par voie orale biodisponible, a révolutionné le traitement de la candidose orale en tant qu'azolé antifongique à large spectre. Cependant, il a été remplacé par d'autres alternatives en raison de sa forte toxicité et de ses effets secondaires graves, notamment une hépatite toxique fatale associée à son utilisation (**Kathiravan et al., 2012**).

Les imidazoles ont été progressivement remplacés par les triazoles en raison de leur forte toxicité, de leurs effets secondaires graves et de leurs interactions médicamenteuses potentielles. L'introduction des triazoles de première génération tels que l'itraconazole et le fluconazole a entraîné des améliorations significatives en termes de sécurité et d'activité antifongique élargie.

Le fluconazole est largement utilisé pour la prévention et le traitement des infections à *Candida*, qu'elles soient superficielles ou invasives. Ses caractéristiques favorables comprennent une faible toxicité et une biodisponibilité élevée, attribuées à sa solubilité accrue dans l'eau et à sa faible

liaison aux protéines plasmatiques. Le fluconazole oral est recommandé pour la prise en charge des cas modérés à sévères de candidose orale (**Pappas et al., 2016**). Le seuil de sensibilité *in vitro* pour les isolats cliniques de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* est fixé à 2 µg/ml. En revanche, les isolats de *C. glabrata* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de fluconazole inférieure à 32 µg/ml indiquent une sensibilité dépendante, tandis que tous les isolats de *C. krusei* sont considérés comme intrinsèquement résistants au fluconazole. Des cas de résistance au fluconazole ont été signalés chez certains isolats de *C. albicans* et *C. dubliniensis* chez des patients infectés par le VIH ayant présenté des épisodes répétés de candidose oropharyngée traités avec du fluconazole. L'incidence des effets indésirables avec le fluconazole est faible, les plus courants étant les nausées, les vomissements, les maux de tête, les éruptions cutanées, les douleurs abdominales et la diarrhée. Les effets indésirables graves sont extrêmement rares (**Quindós et al., 2019**).

L'itraconazole est recommandé pour la gestion des infections résistantes au fluconazole. Ce triazole lipophile appartient à la première génération d'antifongiques, mais son utilisation est limitée en raison de son absorption orale inconstante et de ses interactions potentielles avec d'autres médicaments. L'itraconazole s'est avéré efficace contre les souches résistantes à la fluconazole de *C. glabrata* et *C. krusei*. Le seuil de sensibilité *in vitro* pour les isolats cliniques de *Candida* est fixé à 0,125 µg/ml. Cependant, la forme orale de l'itraconazole peut provoquer des inconforts gastriques. Environ 2% des patients peuvent présenter une élévation temporaire des enzymes hépatiques. D'autres effets indésirables signalés comprennent la neuropathie, les hallucinations, les anomalies du cervelet et une élévation des niveaux de triglycérides (**Quindós et al., 2019**).

Le posaconazole constitue une option viable pour le traitement de la candidose orale résistante au fluconazole. Il présente une structure similaire à celle de l'itraconazole et offre l'un des spectres antifongiques les plus étendus parmi les triazoles. Le seuil de sensibilité *in vitro* du posaconazole vis-à-vis de *Candida* est de 0,06 µg/ml. Les effets indésirables les plus fréquemment signalés incluent des troubles gastro-intestinaux, des éruptions cutanées et des maux de tête (**Pappas et al., 2016; Wiederhold, 2018**).

Le voriconazole, un triazole de deuxième génération dérivé du fluconazole, est un agent antifongique à faible poids moléculaire, soluble dans l'eau, qui présente un large spectre d'activité. Il est utilisé comme traitement alternatif contre la candidose orale réfractaire au fluconazole. Les seuils de sensibilité *in vitro* pour les isolats cliniques de *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* sont respectivement établis à 0,125 µg/ml, tandis que pour *C. krusei*, le seuil est de 0,5 µg/mL (**Wiederhold, 2018**). La formulation orale peut entraîner des inconforts gastriques, et des perturbations visuelles transitoires ont été signalées chez un tiers des patients. Parmi les effets

secondaires supplémentaires, on trouve des anomalies des enzymes hépatiques, qui peuvent nécessiter l'arrêt du traitement, ainsi que des éruptions cutanées, des hallucinations, des maux de tête, de la confusion, de l'hypotension et des altérations hématologiques. Bien que rares, des cas d'hépatite clinique, de cholestase et d'insuffisance hépatique fulminante ont été documentés (**Pappas et al., 2016; De-La-Torre et al., 2017**).

Isavuconazole, le dernier ajout parmi les agents antifongiques de deuxième génération de la classe des triazoles, a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration en 2015. Structuellement lié au fluconazole et au voriconazole, il présente l'un des spectres antifongiques les plus étendus parmi les triazoles. L'isavuconazole est remarquable par son excellente absorption par voie orale, qui n'est pas altérée par la présence de nourriture, les variations du pH gastrique ou la mucoïte. Comparé aux autres azoles, il présente une probabilité plus faible d'interactions pharmacologiques avec d'autres médicaments, facilitant ainsi la gestion de ces interactions (**Perea, 2018**).

Les échinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides amphiphiles produits à partir de la cyclopentamine, qui se forme lors de la fermentation de certains champignons comme *Zalerion arboricola* ou *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*. Cette classe de lipopeptides a donné naissance à trois membres approuvés: le caspofungin, l'anidulafungin et le micafungin (**figure 5**). Leur mode d'action repose sur l'inhibition de la (1,3)- β -D-glucanesynthase, une enzyme essentielle à la

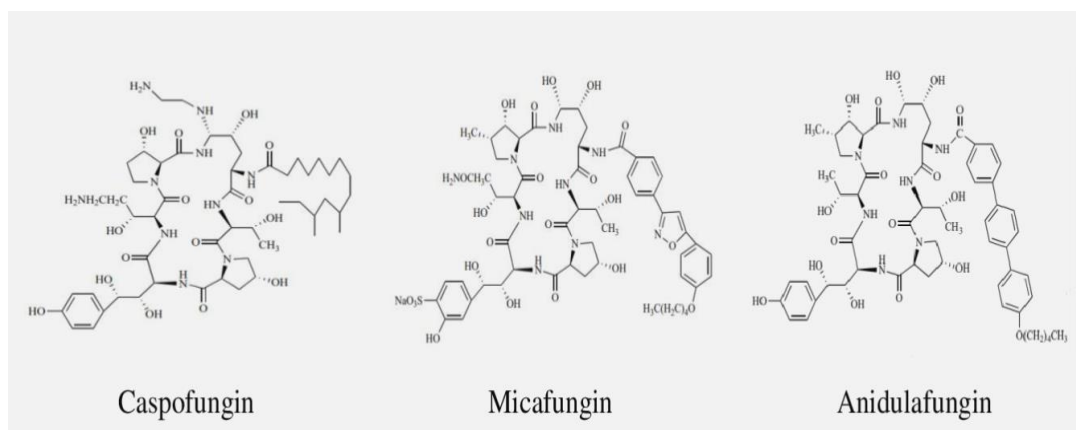


Figure 5: Structure chimique des échinocandines

synthèse du 1,3- β -D-glucane, constituant vital de la paroi cellulaire des champignons. Les échinocandines ciblent spécifiquement le gène FKS1, responsable des composants de la synthase du glucane (**Cappelletty et Eiselstein-McKittrick, 2007**). L'inhibition entraîne la perturbation de la structure de la paroi cellulaire en croissance, ce qui provoque une instabilité osmotique et la mort des cellules de levure. La cible des échinocandines n'existe pas dans les cellules mammifères, ce qui rend leur toxicité minimale (**Onishi et al., 2000**). Les seuils critiques des échinocandines

sont établis à une CMI de 0,125 µg/ml pour *C. glabrata* (excepté pour le micafungin, dont la CMI est de 0,06 µg/ml), 0,25 µg/ml pour *C. albicans*, *C. krusei* et *C. tropicalis*, et 2 µg/ml pour *C. guilliermondii* et *C. parapsilosis*. Les échinocandines offrent plusieurs avantages dans le traitement des cas de candidose orale sévère et persistante, notamment leur capacité à lutter contre les biofilms et leur effet antifongique prolongé. Elles sont souvent privilégiées en tant qu'option thérapeutique pour les cas de candidose sévère chez les personnes immunodéprimées, les patients gravement malades et ceux exposés à un risque élevé d'interactions médicamenteuses (**Quindós et al., 2009; Gil-Alonso et al., 2015, 2016**). La résistance aux échinocandines a été associée à des mutations génétiques dans les gènes responsables de la 1,3-β-D-glucanesynthase, en particulier FKS1, et dans une moindre mesure FKS2. Ces mutations entraînent des modifications de la structure de la sous-unité catalytique FKS1 au sein du complexe de synthèse du glucane, qui constitue la cible principale des échinocandines. On pense que de telles mutations conduisent à une résistance croisée à tous les membres de cette classe de médicaments. D'autres mécanismes de résistance suggérés incluent la présence d'une pompe d'efflux de médicament dans la paroi cellulaire fongique et la surexpression de protéines de transport de la paroi cellulaire (**Sucher et al., 2009**).

Le caspofungin est souvent considéré comme une option thérapeutique pour les cas sévères ou réfractaires de candidose orale, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli ou celles qui n'ont pas répondu favorablement à d'autres traitements antifongiques. Les effets secondaires du caspofungin sont généralement limités et comprennent principalement des maux de tête, de la fièvre, des nausées, des éruptions cutanées, une phlébite au site de perfusion et une élévation réversible des taux d'enzymes hépatiques (**Sucher et al., 2009**).

Le micafungin a été approuvé pour la prise en charge de la candidose orale ainsi que pour une utilisation prophylactique chez les patients recevant une greffe de cellules souches. Des études ont démontré son efficacité dans le traitement de la candidose orale, et il s'est révélé supérieur au fluconazole lorsqu'il est utilisé en prophylaxie lors de la transplantation de cellules souches. De plus, le micafungin présente moins d'interactions médicamenteuses par rapport au caspofungin (**Kathiravan et al., 2012**).

Quant à l'anidulafungin, il a été autorisé pour le traitement de la candidose orale. Il présente une caractéristique unique parmi les échinocandines, car il subit une biotransformation plutôt qu'un métabolisme classique, ce qui entraîne une dégradation lente dans le corps humain. Des études *in vitro* ont démontré son efficacité élevée contre différentes espèces de *Candida*, y compris celles présentant une résistance aux azolés (*C. krusei*), à l'amphotéricine B (*C. lusitaniae*) ou à d'autres échinocandines (*C. parapsilosis*). Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés lors des

essais cliniques incluent l'hypotension, les vomissements, la constipation, les nausées, la fièvre, l'hypokaliémie et l'élévation des enzymes hépatiques (**Kathiravan et al., 2012**).

1.3. Les principales espèces responsables de candidose orale

Candida est un élément normal du microbiote présent dans la cavité buccale. Cependant, un déséquilibre de la flore buccale habituelle peut entraîner une prolifération de *Candida* spp. et conduire à une candidose orale. La principale cause de cette affection est largement attribuée à *C. albicans*, l'espèce la plus fréquemment isolée de la cavité orale chez les patients atteints de candidose orale. Malgré cela, au cours des dernières années, le nombre d'infections causées par des espèces de *Candida* non-*albicans* (NCAC) telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* et *C. dubliniensis* a considérablement augmenté. La prévalence élevée des espèces de NCAC pourrait être due à leur résistance intrinsèque à certains agents antifongiques par rapport à *C. albicans*, ce qui pourrait favoriser leur persistance dans les infections mixtes traitées avec des agents antifongiques traditionnels, potentiellement au détriment de *C. albicans*. Cette augmentation peut également être attribuée à l'amélioration des méthodes de diagnostic, telles que l'utilisation de milieux chromogènes capables de différencier les espèces de *Candida*, ainsi qu'à l'introduction de techniques moléculaires (**González et al., 2008; Liguori et al., 2009; Silva et al., 2012; Seddiki et al., 2015**).

1.3.1. *C. albicans*

C. albicans est l'agent principal responsable de la candidose orale, représentant la majorité des cas, soit environ 95 %. Bien qu'il soit reconnu comme un agent pathogène, *C. albicans* est naturellement présent dans la muqueuse buccale et se trouve couramment dans la cavité buccale des individus en bonne santé. De manière intéressante, environ 80 % de la population générale sont porteurs asymptomatiques, et la simple présence du micro-organisme ne conduit pas nécessairement à une infection. La capacité de transition de commensalisme à un état pathogène chez *C. albicans* est grandement soutenue par un répertoire remarquable de facteurs de virulence, comprenant des adhésines à la surface cellulaire, des enzymes protéolytiques, des changements morphologiques, ainsi que le développement de résistance aux médicaments (**Southern et al., 2008; Naglik et al., 2011; Vila et al., 2020**). La réponse immunitaire à *C. albicans* dans la candidose orale implique à la fois le système immunitaire inné et adaptatif. Les cellules épithéliales buccales constituent la première ligne de défense contre *C. albicans* en agissant comme une barrière physique. Cependant, le flux constant de salive joue également un rôle crucial en empêchant l'adhésion de *Candida* aux cellules épithéliales, et donc la sécrétion de salive est essentielle pour maintenir l'état commensal de *C. albicans* dans la bouche. De plus, la salive est

fortement enrichie en peptides antimicrobiens, qui jouent un rôle vital dans l'immunité innée et la défense contre la colonisation microbienne (**Amerongen et Veerman, 2002; Sultan et al., 2018**). En ce qui concerne l'immunité adaptative, les réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T sont essentielles pour contrôler efficacement l'infection par *C. albicans*, en particulier les réponses Th1 et Th17, qui revêtent une importance particulière au niveau de la muqueuse buccale (**Conti et al., 2009; Pirofski et Casadevall, 2009**).

1.3.2. *C. glabrata*

Historiquement, *C. glabrata* était considéré comme un saprophyte relativement non pathogène faisant partie du microbiote commensal des individus sains, provoquant rarement des infections graves chez l'homme (**Stenderup et Pedersen, 1962**). Cependant, en raison de l'utilisation répandue et croissante de thérapies immunosuppressives et de la prophylaxie antifongique à large spectre, *C. glabrata* est devenu un pathogène opportuniste important affectant la muqueuse buccale. Les facteurs de risque d'infection incluent le port de prothèses dentaires, l'immunosuppression, l'utilisation d'antibiotiques et le vieillissement. Contrairement à *C. albicans*, *C. glabrata* présente une adhésion plus faible aux kératinocytes buccaux mais une adhésion plus forte aux surfaces des prothèses dentaires (**Biasoli et al., 2002**). Le rôle de la production d'hydrolases extracellulaires dans sa virulence est moins significatif. *C. glabrata* peut subir des changements phénotypiques et former des pseudohyphes, mais leur impact sur la maladie n'est pas clair. Comparé à *C. albicans*, il induit une réponse pro-inflammatoire plus faible dans les cellules épithéliales buccales. *C. glabrata* est moins sensible aux bêta-défensines humaines, aux histatines salivaires et aux mucines. Il possède à la fois une résistance inhérente et acquise aux antifongiques, ce qui contribue à sa prévalence chez les populations immunodéprimées (**Li et al., 2007**).

1.4. Facteurs de virulence des espèces de *Candida*

1.4.1. Adhésion

La capacité de *Candida* spp. à adhérer aux surfaces est un facteur crucial de leur virulence, permettant la colonisation et le développement de l'infection. L'adhésion est un processus complexe qui implique à la fois des interactions non spécifiques, telles que l'hydrophobicité et les forces électrostatiques, ainsi que des interactions spécifiques médiées par des protéines adhésives appelées adhésines. Le degré d'adhésion dépend de divers facteurs tels que l'espèce, la réponse des cellules hôtes et les propriétés de la surface (**Silva et al., 2011**).

1.4.2. Sécrétion d'enzyme hydrolytique

Les espèces de *Candida* sont connues pour produire divers enzymes hydrolytiques qui contribuent à leur pathogénicité. L'un des enzymes cruciaux est la production d' aspartyl protéinases (Saps),

qui facilitent la colonisation et l'invasion des tissus hôtes en dégradant les membranes muqueuses et les protéines de défense de l'hôte (**Staniszewska et al., 2012**). Des études ont montré que les souches de *C. albicans* responsables de la candidose orale ont une production accrue de Saps par rapport à celles trouvées chez les porteurs sains, suggérant que ces souches pourraient être plus virulentes en raison d'une expression plus élevée des gènes (**Kuriyama et al., 2003**).

En plus des Saps, les espèces de *Candida* produisent également des phospholipases (PLs) et des lipases, qui favorisent l'invasion des tissus hôtes. Ces enzymes sont capables de maintenir leur stabilité même dans des conditions de températures élevées et de solvants organiques, et elles présentent également une résilience à la protéolyse. Les PLs ont été classés en quatre types et tous les types ont été observés chez les espèces de *C. albicans*. Les espèces *Candida* non-*albicans* peuvent également produire des PLs, bien que à des niveaux inférieurs à ceux de *C. albicans*. Les lipases, quant à elles, ont été montrées comme des facteurs de virulence importants chez *C. albicans* et *C. parapsilosis*, car elles sont impliquées dans l'hydrolyse et la synthèse de triacylglycérols (**Silva et al., 2011**).

Un autre facteur de virulence produit par les espèces de *Candida* est l'hémolysine, qui leur permet d'obtenir du fer élémentaire à partir de l'hémoglobine des cellules hôtes. *C. albicans* peut utiliser le fer acquis pour produire un facteur hémolytique qui peut libérer plus d'hémoglobine en lysant les érythrocytes. Ces facteurs contribuent collectivement à la pathogénicité des espèces de *Candida*, ce qui en fait une préoccupation de santé significative (**Watanabe et al., 1999**).

1.4.3. Transition morphologique

Les espèces de *Candida*, en particulier *C. albicans*, peuvent subir des changements de forme, passant de la forme de levure à des formes pseudohyphale et hyphale en fonction de leur environnement. Les hyphes sont considérés comme essentiels pour l'invasion des tissus et des biomatériaux. Des études menées *in vitro* ont montré que les souches de *C. albicans* dépourvues de formation d'hyphes ou qui présentent des mutations hyphales sont moins capables d'envahir les tissus par rapport aux souches *C. albicans* sauvages (**Jayatilake et al., 2006**). De plus, les hyphes de *Candida* présentent des propriétés d'adhésion supérieures et sont plus résistants à la phagocytose que les levures. Par conséquent, la formation d'hyphes est considérée comme étant significative pour la pathogénicité de *Candida* (**Williams et al., 2012**).

1.4.4. Formation du Biofilm

Le premier rapport scientifique documenté sur le biofilm a été rédigé en 1683 par Antoni van Leeuwenhoek à la Royal Society de Londres (**Gulati et Nobile, 2016**). Depuis lors, la définition

du biofilm a évolué pour décrire une communauté de cellules adhérentes qui se développent sur des surfaces vivantes ou inertes, enfermées dans une matrice d'exopolysaccharides auto-synthétisante (Costerton et al., 1987). Les micro-organismes dans cette communauté présentent un comportement distinct par rapport aux cellules planctoniques, tels que des taux de croissance réduits et une résistance accrue à la thérapie antimicrobienne. La croissance en biofilm est maintenant considérée comme le mode de vie microbien prédominant, avec jusqu'à 80% de tous les micro-organismes dans l'environnement vivant de manière sessile (Donlan et Costerton, 2002). Il est important de noter que la formation de biofilm est associée à 65% à 80% des infections humaines, ce qui en fait un problème de santé publique important ayant un impact économique substantiel. Aux États-Unis seulement, environ 100 000 décès et 6,5 milliards de dollars sont dépensés chaque année pour traiter ces infections (Davies, 2003).

1.4.4.1. Processus de formation de biofilm chez les espèces de *Candida*

Pour gérer et prévenir efficacement les infections associées aux biofilms, il est essentiel de comprendre les mécanismes qui contribuent à la croissance et à la formation des biofilms. Cette compréhension peut ensuite aider à identifier les cibles thérapeutiques appropriées (Williams et al., 2012). La formation de biofilm est un processus complexe bien décrit pour *C. albicans* qui implique plusieurs étapes (figure 6). Initialement, le processus commence par l'attachement des cellules de levure à une surface, suivie de la formation des microcolonies. Dans la phase intermédiaire, les cellules sont organisées et commencent à produire et à libérer des substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces substances facilitent le développement d'une structure tridimensionnelle, qui forme finalement le biofilm dans la phase de maturation. Une fois que le biofilm est pleinement mature, il existe encore la possibilité de propagation des cellules de biofilm qui se détachent et migrent pour former de nouveaux biofilms dans différents endroits (Seneviratne et al., 2008).

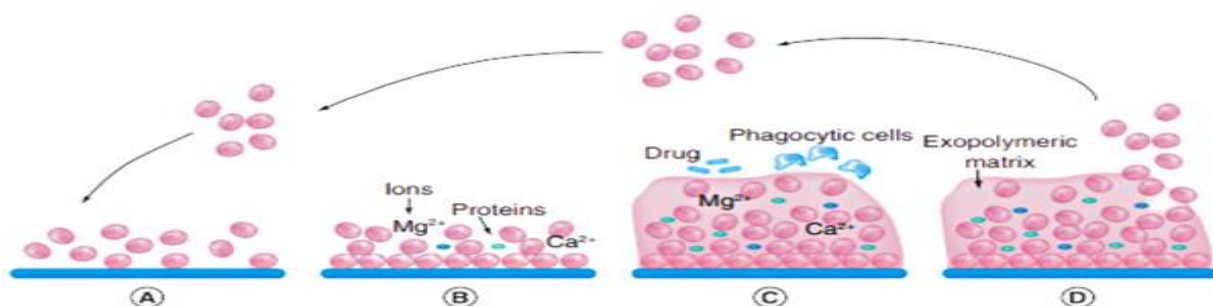


Figure 6: Phases de la formation du biofilm de *Candida* (Cuéllar-Cruz et al., 2012)

(A) Adhésion de *Candida* par les protéines de la paroi cellulaire. (B) *Candida* commence à proliférer en formant une matrice de polysaccharides, de glucides, de protéines et de composants inconnus. (C) La croissance se poursuit, donnant lieu à la formation d'un biofilm mature, où *Candida* est protégé contre les cellules phagocytaires, les médicaments et les substances toxiques. (D) Enfin, certaines des cellules fongiques se détachent et colonisent les tissus ou d'autres dispositifs implantés de l'hôte.

L'adhésion, première étape cruciale dans le processus de formation du biofilm, est médiée par des interactions non spécifiques, telles que des forces hydrophobes et électrostatiques, entre les cellules et le substrat, ainsi que par des interactions spécifiques entre les protéines de la paroi cellulaire, appelées adhésines (Seneviratne et al., 2008; Cavalheiro et Teixeira, 2018). Les adhésines favorisent l'attachement à d'autres cellules, qu'elles soient épithéliales, microbiennes ou sur des surfaces abiotiques, en se liant à des résidus spécifiques d'acides aminés ou de sucres. (Verstrepen et Klis, 2006). Chez *C. albicans*, la famille Als (Agglutinin-like sequence) comprend plusieurs adhésines, dont Als3 est le membre le plus important. La famille des protéines de paroi hyphale (Hwp), qui inclut Hwp1, joue également un rôle important dans la formation de biofilm, avec quatre autres protéines de cette famille nécessaires pour le développement du biofilm. Chez *C. glabrata*, la famille EPA est responsable de l'adhésion, en particulier les gènes EPA1, EPA6 et EPA7 (De Groot et al., 2013; Modrzewska et Kurnatowski, 2015). La phase d'adhésion se compose en deux étapes successives: une étape réversible, où l'attachement initial à la surface est faible et les blastospores peuvent se détacher facilement (Baillie et Douglas, 1999), et une étape irréversible, où les blastospores adhèrent fortement à la surface sans se détacher (Jabra-Rizk et al., 2004). Au début de cette phase, la plupart des cellules sont sous forme de blastospores, mais par la suite, des microcolonies distinctes se forment sur la surface, caractérisées par une absence de matériel extracellulaire (Zhou et al., 2010).

Après l'adhésion, le développement du biofilm se poursuit en subissant des modifications morphologiques et en augmentant le nombre de cellules, accompagné de la production d'exopolysaccharides (EPS) qui influencent l'architecture finale du biofilm. Des chercheurs ont mené une étude sur plusieurs isolats de *Candida*, notamment *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. glabrata*, provenant de différentes sources et ont identifié des différences significatives dans la formation de biofilm entre ces espèces. Les biofilms de *C. albicans*, par exemple, présentent des formes morphologiques diverses, telles que des bourgeons ovales, des hyphes septées continues et des pseudohyphes dans les tissus infectés, et sont plus étroitement liés que ceux des autres espèces de *Candida* (Douglas, 2003; Seneviratne et al., 2008). D'autre part,

les biofilms de *C. glabrata* contiennent des niveaux élevés de glucides et de protéines, tandis que ceux de *C. parapsilosis* sont principalement composés de glucides avec de faibles niveaux de protéines, produisant un agrégat de cellules compact multicouche ou non contigu. Les biofilms de *C. tropicalis* sont principalement constitués de cellules en forme de levure, bien que certaines souches puissent présenter des formes filamenteuses dans des biofilms épais de cellules coagrégées ou dans une monocouche discontinue de levures ancrées à la surface. Il est à noter que, malgré leur faible teneur en glucides et en protéines dans la matrice extracellulaire (MEC), les biofilms de *C. tropicalis* sont plus résistants au détachement de la surface que ceux formés par *C. albicans* (Silva et al., 2009).

Les biofilms formés dépendent également de la présence d'EPS, qui crée une structure tridimensionnelle hydratée qui restreint partiellement le mouvement des cellules. L'EPS remplit plusieurs fonctions, notamment en se protégeant contre la phagocytose, en fournissant un soutien structurel au biofilm et en empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. La quantité d'EPS produite dépend de facteurs tels que l'espèce et la souche, la disponibilité des sources de carbone et le débit de fluide. Les polysaccharides, principalement le glucose et l'hexosamine, constituent le principal composant de l'EPS du biofilm de *Candida*. Des protéines, du phosphore et de l'acide uronique peuvent également être présents, mais en faibles quantités (Flemming et Wingender, 2010; Cavaleiro et Teixeira, 2018).

I.4.4.2. Résistance des biofilms de *Candida* sp.

La résistance des biofilms de *Candida* spp. représente un enjeu majeur en microbiologie médicale, nécessitant une exploration approfondie des divers mécanismes, tels que l'impact de la densité cellulaire, la composition de la matrice extracellulaire, les pompes à efflux et les cellules persistantes (figure 7).

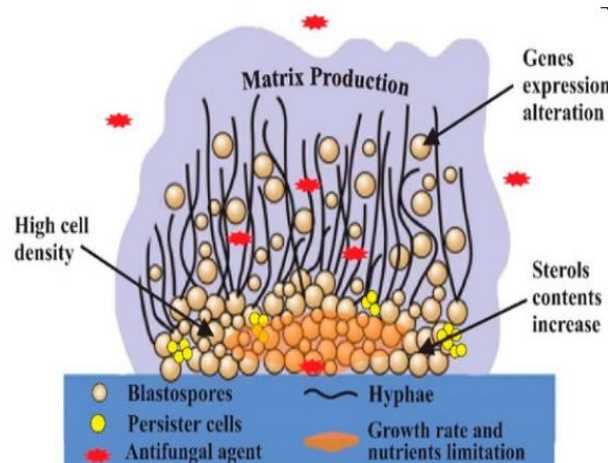


Figure 7: Mécanisme de résistance des biofilms de *Candida* sp. (Silva et al., 2017)

A. L'impact de la densité de cellules de *Candida*, de la disponibilité en nutriments et des limitations de croissance.

Les biofilms de *Candida* ont une concentration relative élevée de cellules par rapport aux conditions planctoniques, ce qui peut influencer leur résistance antifongique (**Perumal et al., 2007**). Les biofilms de *C. albicans* sont composés de deux couches distinctes, tandis que les biofilms de *C. parapsilosis* sont moins structurés. Les biofilms de *C. glabrata* ont une densité de cellules plus élevée, ce qui les rend plus résistants aux azolés antifongiques et/ou à l'amphotéricine B. Les cellules situées dans les couches profondes du biofilm ont une croissance plus lente et peuvent donc être plus résistantes aux antifongiques. Le pH, la température et la disponibilité en oxygène peuvent affecter l'architecture des biofilms et leur sensibilité aux antifongiques. L'activité métabolique des cellules sessiles est également impliquée dans la résistance des biofilms de *Candida* (**Dumitru et al., 2004; Kucharíková et al., 2011**).

B. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (ECM) est une caractéristique importante des biofilms des espèces *Candida*, qui protège les cellules de divers facteurs nocifs, tels que l'immunité de l'hôte et les agents antifongiques. La quantité d'ECM dans les biofilms dépend fortement des espèces et des souches et augmente sous des conditions de flux dynamique (**Hawser et Douglas, 1995; Al-Fattani et Douglas, 2004**). Bien qu'elle entrave la diffusion, l'ECM ne semble pas avoir un rôle significatif dans la résistance des biofilms aux agents antifongiques. Néanmoins, des études récentes ont suggéré que la composition chimique de l'ECM pourrait être cruciale dans la neutralisation des agents antifongiques, contribuant ainsi à la résistance (**Al-Fattani et Douglas, 2004; Silva et al., 2017**).

C. Les pompes à efflux

Le développement de la résistance aux antifongiques chez les cellules de *Candida* est souvent lié à l'augmentation des pompes d'efflux dans la membrane, ce qui réduit l'accumulation d'antifongiques dans les cellules. Il existe deux grandes classes de pompes d'efflux qui modulent l'exportation de antifongiques chez *C. albicans* : la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) contenant les transporteurs Cdr1/Cdr2 et la classe des transporteurs Mdr1, contenant des transporteurs de la classe des facilitateurs majeurs (**Niimi et al., 2006**). Ces pompes d'efflux sont généralement surexprimées dans les cellules planctoniques uniquement lorsqu'elles sont exposées à des antifongiques. Cependant, dans les biofilms, ces pompes d'efflux sont fortement surexprimées pendant la phase d'adhésion de la formation du biofilm et restent

surexprimées à mesure que le biofilm mûrit, indépendamment de la présence ou non d'un antifongique (**Ramage et al., 2012; Silva et al., 2017**).

D. Les cellules persistantes

Les cellules persistantes sont des variantes métaboliquement dormantes des cellules microbiennes qui se forment de manière stochastique dans les populations microbiennes et sont très tolérantes aux antimicrobiens (**Lewis, 2010**). Dans les biofilms de *C. albicans*, ces cellules sont censées se former lors de l'attachement à la surface et se trouvent principalement dans les profondeurs de la couche basale du biofilm en tant que sous-ensemble de la population de cellules en forme de levure. La découverte de la présence de ces cellules dans les biofilms de *C. albicans* a été faite pour la première fois par LaFleur et ses collègues, qui ont démontré que ces cellules persistantes n'étaient pas présentes dans les populations planctoniques, mais étaient plutôt des variants phénotypiques du type sauvage (**LaFleur et al., 2006**).

I.4.4.3. Les biofilms mixtes

Les recherches sur les biofilms *Candida* ont principalement été axées sur leur étude en tant que biofilms mono-espèces, bien que cela ne reflète pas la situation réelle *in vivo*. En réalité, les biofilms sont généralement composés de plusieurs espèces qui interagissent les unes avec les autres, soit positivement (par la coopération métabolique), soit négativement (par la compétition pour les nutriments ou la production de composés inhibiteurs). Dans la cavité buccale, plusieurs études ont montré que *C. albicans* peut former des biofilms mixtes avec différentes espèces bactériennes et d'autres espèces de *Candida non-albicans*. Ces biofilms mixtes sont souvent plus résistants aux agents antimicrobiens et aux réponses immunitaires de l'hôte que les biofilms en monoculture de *Candida* ou de bactéries (**Elias et Banin, 2012**).

Des recherches ont été menées sur l'interaction entre *Staphylococcus aureus* et *C. albicans*. Ce biofilm comprend une couche de *C. albicans* adhérente à la surface, avec une couche de *S. aureus* intégrée à la matrice extracellulaire formée par les cellules de *Candida*. Cette matrice protège *S. aureus* des effets de la vancomycine (**Harriott et Noverr, 2009**). En 2017, Kean et ses collègues ont mené une étude sur l'interaction entre *C. albicans* et *S. aureus*. Ils ont également étudié l'impact du traitement au miconazole. Les résultats ont montré que les biofilms de *C. albicans* ont facilité l'adhésion et la colonisation de *S. aureus* en interagissant étroitement avec les éléments hyphales. Cela a conduit à une augmentation significative de la formation de biofilm de *S. aureus*. L'étude a trouvé également que le traitement au miconazole était moins efficace (**Kean et al., 2017**).

C. albicans et *Streptococcus mutans* ont une relation mutualiste fréquemment observée dans la cavité buccale humaine. Des études ont montré que la coexistence de ces microorganismes dans des biofilms conduit à une formation de biofilm plus importante que dans des biofilms mono-espèce. Ce biofilm mixte est organisé en deux couches, avec les cellules de *S. mutans* adhérant à la surface et les cellules de *C. albicans* formant la deuxième couche (**Pereira-Cenci et al., 2008**).

La formation de biofilms mixtes de *C. albicans* a également été décrite avec des combinaisons entre des espèces de *Candida non-albicans*. **Tati et al. (2016)** ont mené une étude en utilisant un modèle d'infection orale de souris pour étudier la co-colonisation de *C. glabrata* et *C. albicans* ainsi que la fonction d'adhésines des deux espèces. Les résultats ont révélé que *C. glabrata* ne pouvait pas coloniser et persister dans la muqueuse buccale à moins qu'il ne soit préalablement colonisé avec ou en même temps que *C. albicans*. L'étude a montré que la présence d'adhésines chez *C. albicans* a déclenché l'expression de gènes critiques d'adhésines de *C. glabrata* nécessaires pour l'établissement de l'infection. Les infections buccales impliquant à la fois *C. albicans* et *C. glabrata* sont plus difficiles à gérer et peuvent être plus graves. Cela est dû au fait que plusieurs souches de *C. glabrata* ont une résistance naturelle aux agents antifongiques azolés qui sont généralement utilisés pour traiter les infections muqueuses (**Vazquez, 1999**).

2. Les huiles essentielles : une alternative naturelle pour lutter contre les infections fongiques

2.1. Les huiles essentielles : aperçu général

Les huiles essentielles (HEs), également connues sous le nom d'essences, d'huiles volatiles ou d'aetheroleum, sont des mélanges complexes de composés volatils résultant du métabolisme secondaire des plantes. Ces huiles peuvent être extraites de différentes parties de la plante, telles que les fleurs, les bourgeons, les graines, les feuilles et les fruits, et sont stockées à la fois internement et externement dans des structures sécrétoires. La plupart des huiles volatiles sont constituées de mélanges chimiques complexes, certaines huiles contenant plus de 200 composants, y compris des constituants en traces qui sont essentiels à l'activité globale de l'huile (**Palmeira-de-Oliveira et al., 2009**).

Dans la nature, les HEs jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les agents nuisibles tels que les bactéries, les virus, les champignons, les insectes et les herbivores. Ces huiles attirent également des insectes bénéfiques qui aident à la dispersion des pollens et des graines, tout en repoussant les insectes nuisibles des plantes (**Bakkali et al., 2008**). L'utilisation thérapeutique des HEs a été documentée dans des civilisations anciennes, notamment les Égyptiens et les Chinois, qui les utilisaient pour la médecine à base de plantes. Paracelse von Hohenheim a utilisé

pour la première fois le terme "huile essentielle" au XVI^e siècle pour décrire le composant efficace d'un médicament appelé *Quinta essentia* (El-Tarabily et al., 2021)

Il existe environ 3000 types d'HEs, dont environ 300 ont des applications significatives dans diverses industries telles que la pharmacie, l'agriculture, les cosmétiques et les parfums. Les HEs et leurs composants sont utilisés dans un large éventail de produits, y compris des remèdes naturels, des produits dentaires, des désinfectants, des produits agricoles, des parfums et des cosmétiques (Nazzaro et al., 2017).

2.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs est un processus crucial qui implique l'utilisation de différentes méthodes en fonction de la source botanique et de l'état du matériau végétal. Un processus d'extraction inapproprié peut entraîner une perte des caractéristiques naturelles de l'huile. La méthode la plus courante est la distillation à la vapeur, qui permet d'extraire jusqu'à 93% des huiles. L'hydrodistillation est utilisée pour les matériaux végétaux ayant des points d'ébullition élevés, tandis que l'extraction par solvant est utilisée pour les matériaux délicats comme les fleurs qui ne peuvent pas résister à la chaleur. D'autres techniques innovantes telles que l'hydrodiffusion assistée par micro-ondes (MAHD), la gravité et l'hydrodiffusion par micro-ondes (MHG) ont également été développées et ont prouvé leur supériorité par rapport aux méthodes traditionnelles en termes de temps d'isolement plus court, de caractéristiques plus propres et d'activités antimicrobiennes et antioxydantes accrues. En fin de compte, le choix de la méthode et des matériaux dépend de la source botanique, de l'état du matériau, ainsi que de la qualité et des caractéristiques souhaitées pour l'huile essentielle résultante (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

2.3. Composition des huiles essentielles

Les HEs sont des extraits complexes de composés volatils issus de nombreuses plantes. Elles constituent généralement une petite partie de la composition de la plante, représentant moins de 5% de la matière végétale sèche, et se composent principalement de terpènes hydrocarbonés (isoprènes) et de terpénoïdes. Les monoterpènes (10 atomes de carbone) et les sesquiterpènes (15 atomes de carbone) sont les deux principales classes de terpènes présentes dans les HEs. Les terpénoïdes, également appelés isoprénoïdes, sont des dérivés oxygénés de terpènes hydrocarbonés, tels que des alcools, des aldéhydes, des cétones, des acides, des phénols, des éthers et des esters, et peuvent contenir des mono et des sesquiterpènes oxygénés. Certaines HEs contiennent également des phénylpropanoïdes et leurs dérivés. Les terpènes constituent la plus grande classe d'hydrocarbures naturels. Ils sont constitués d'unités d'isoprène liées, avec la règle

de l'isoprène développée par Ruzicka jouant un rôle clé dans la détermination de leur structure (El Asbahani et al., 2015) (figure 8).

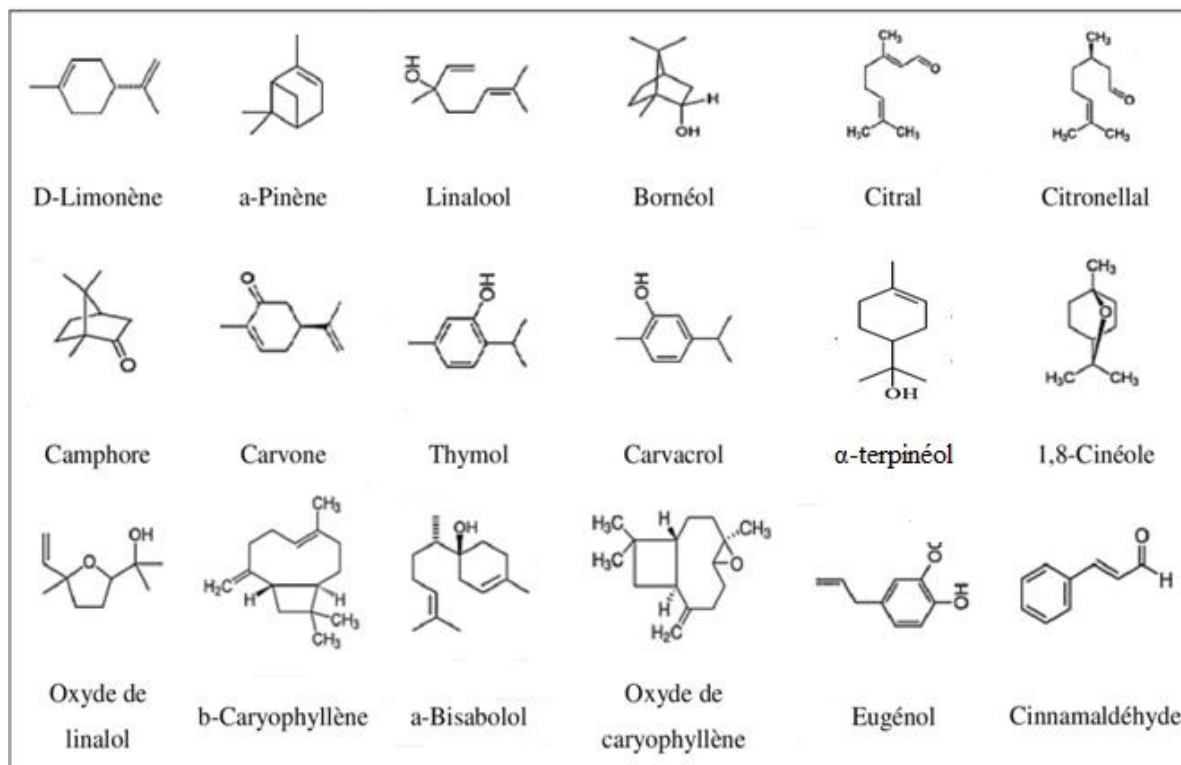


Figure 8: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles.

2.4. Activité antifongique des huiles essentielles contre *Candida* : Mécanismes d'action

Les HE ont montré une activité antifongique significative contre *Candida*, en ciblant différents mécanismes d'action comprennent la perturbation de la membrane cellulaire, l'altération et l'inhibition de la formation de la paroi cellulaire, la dysfonction des mitochondries fongiques, l'inhibition des pompes d'efflux et la production de ROS (Reactive Oxygen Species) (Nazzaro et al., 2017). La paroi cellulaire fongique joue un rôle critique dans la croissance et la viabilité des champignons, et de nombreuses HE ciblent cette structure en inhibant l'activité de la chitine synthase ou en causant des dommages à la paroi cellulaire et à la membrane cytoplasmique fongique (Wu et al., 2008; İşcan et al., 2016). Les HE peuvent également affecter la fonction mitochondriale de *Candida* en inhibant l'action des déshydrogénases mitochondriales impliquées dans la biosynthèse de l'ATP, ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse de l'ATP dans les mitochondries (Chen et al., 2013). L'inhibition de l'H⁺-ATPase de la membrane plasmique fongique par les HE conduit à l'acidification intracellulaire et à la mort cellulaire (Ahmad et al., 2010). Enfin, certaines HE et leurs composants peuvent induire la production de ROS, ce qui entraîne des dommages oxydatifs aux cellules de *Candida* (Khan et al., 2015).

2.5. Activité antibiofilm des huiles essentielles contre *Candida*

Plusieurs HEs ont été découvertes pour présenter une activité antibiofilm contre *Candida*. Par exemple, l'huile essentielle de *Thymbra capitata* a été trouvée pour inhiber les biofilms préformés de différentes espèces de *Candida*, sauf *C. glabrata*, probablement en raison de sa teneur élevée en phénols, en particulier le carvacrol (**Palmeira-de-Oliveira et al., 2012**). L'huile essentielle de *Coriandrum sativum* démontre également des propriétés d'inhibition de biofilm contre des souches *C. albicans* prélevées chez des patients souffrant de maladies parodontales (**Furletti et al., 2011**). De plus, une étude menée par Almeida et ses collègues a démontré que l'huile essentielle de *Cinnamon cassia* et l'HE de *Cymbopogon winterianus* ont réduit de manière significative la formation de biofilms de *C. albicans* (**Almeida et al., 2016**). La forte réduction des biofilms a été attribuée à la présence de cinnamaldéhyde dans les deux plantes, qui agit en se liant aux enzymes impliquées dans la formation de la membrane cytoplasmique des cellules fongiques (**da Nóbrega Alves et al., 2020**). L'HE de *Mentha piperita* a également montré une inhibition de la formation de biofilms de *C. albicans* et *C. dubliniensis* de manière dose-dépendante, avec une concentration maximale de 2 µL/mL, en raison de la haute concentration de menthol et de monoterpène phénolique dans l'HE. Ces composés sont capables de perturber la membrane cellulaire fongique et d'exercer des effets antimicrobiens, même contre les souches résistantes aux azolés (**Saharkhiz et al., 2012**). En outre, les HEs ont une contribution significative dans la lutte contre les biofilms mixtes. L'huile essentielle de *Cymbopogon flexuosus* (Citronnelle) et son composé actif citral ont été testés contre le biofilm mixte de *S. aureus* et *Candida*. Ces agents ont pu réduire la biomasse de biofilm et la viabilité cellulaire de chaque espèce dans le biofilm. L'examen microscopique a démontré que ces composants ont perturbé les caractéristiques adhésives de chaque espèce et ont altéré la matrice du biofilm en neutralisant les acides nucléiques, les protéines et les glucides dans le biofilm (**Gao et al., 2020**).

2.6. Combinaison des huiles essentielles avec les antifongiques

Au cours des dernières années, des efforts ont été déployés pour lutter contre l'émergence de souches fongiques résistantes en utilisant des combinaisons d'antifongiques (**Karlowksy et al., 2006; Chaturvedi et al., 2011**), mais les coûts élevés et les effets secondaires importants ont limité l'utilisation de ces combinaisons. Ainsi, la recherche s'est tournée vers l'étude de la combinaison d'antifongiques avec des agents non-antifongiques, tels que les HEs. Les HEs peuvent agir en synergie avec les antifongiques pour produire un effet microbicide sur le pathogène cible. Les mécanismes de cette synergie sont multiples et incluent la modification de la perméabilité de la membrane cellulaire, la fuite des composants intracellulaires de la cellule fongique, l'amélioration de la pénétration transdermique des médicaments, l'inhibition de la formation de biofilm fongique,

la modification de la structure de la paroi cellulaire, l'inhibition de la formation de tubes germinatifs, et la formation de structures de type mésosome (Bhattacharya et al., 2021) (figure 9). Par exemple, la combinaison d'une HE de *Thymus vulgaris* avec la nystatine a modifié la perméabilité de la membrane cellulaire, inhibant ainsi la croissance cellulaire (De Castro et al., 2015), tandis que la combinaison d'HE de *Coriandrum sativum* avec l'amphotéricine B a conduit à la perméation de la membrane cellulaire et à la fuite des composants intracellulaires chez *C. albicans* et *C. tropicalis* (Silva et al., 2011). Les HEs de plusieurs plantes médicinales ont été rapportées pour inhiber la formation de biofilm de *Candida* sp. (Jafri et Ahmad, 2020). La combinaison synergique de l'huile de *Mentha suaveolens* et de la fluconazole a également été rapportée pour modifier la structure de la paroi cellulaire, arrêtant ainsi la croissance cellulaire (Stringaro et al., 2014). Enfin, la combinaison synergique de l'huile de *Piper bredemeyeri* Jacq avec l'itraconazole a inhibé la croissance cellulaire de *C. albicans* en perturbant la formation de tubes germinatifs (Tangarife-Castaño et al., 2011).

Différentes méthodes sont actuellement utilisées au laboratoire pour évaluer l'effet combiné des antifongiques et des HEs. Parmi celles-ci, on peut citer la technique de checkerboard, la courbe de temps de destruction « *Time-kill curve* » et l'Epsilomètre (E-test).

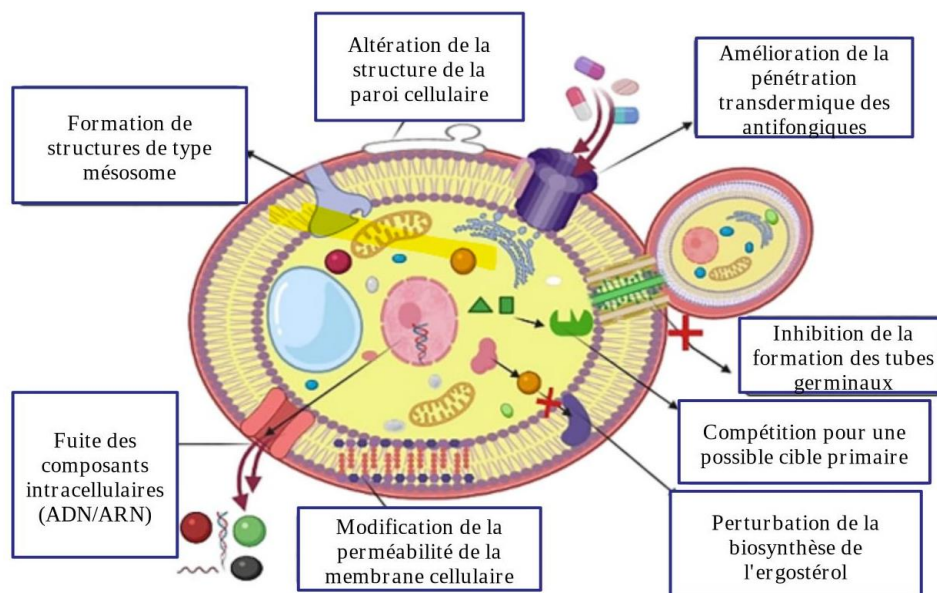


Figure 9: Mécanisme d'action des combinaisons synergiques d'huiles essentielles et d'antifongiques contre *Candida* spp. (Bhattacharya et al., 2021)

La technique de checkerboard consiste à disposer les concentrations de l'un des agents horizontalement et les concentrations de l'autre agent verticalement dans une plaque de

microtitration. Les dilutions testées sont basées sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) des agents. Cette méthode permet de déterminer si l'effet combiné des deux agents est synergique, additif, indifférent ou antagoniste en mesurant la croissance de l'agent pathogène après exposition à chaque concentration des deux agents. Les résultats sont interprétés en traçant un isobologramme ou en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnelle (ICIF) pour les deux agents (**White et al., 1996; Hemaiswarya et al., 2008; Langeveld et al., 2014**).

La courbe de temps de destruction « *Time-kill method* » mesure le nombre de champignons viables présents dans un milieu liquide lorsqu'ils sont traités avec des combinaisons spécifiques d'agents antifongiques à différents moments. La synergie se produit lorsque la combinaison entraîne une diminution ≥ 100 fois du nombre de colonies à 24 heures par rapport au médicament seul le plus efficace, tandis que l'additivité ou l'indifférence se produit lorsque le changement dans le nombre de colonies est < 10 fois à 24 heures. L'antagonisme est observé lorsque la combinaison entraîne une augmentation du nombre de colonies (**White et al., 1996; Hemaiswarya et al., 2008; Langeveld et al., 2014**).

L'Epsilomètre (E-test) est une méthode rapide et simple pour évaluer l'effet combiné de deux agents antimicrobiens. Cette méthode implique l'utilisation de bandelettes de test standard pour antibiotiques disponibles commercialement. Pour réaliser l'E-test, deux bandelettes en plastique sont enduites d'un gradient de deux antimicrobiens et sont positionnées à des angles de 90° l'une par rapport à l'autre sur une plaque d'agar recouverte de micro-organismes. Le point où les deux zones d'inhibition se croisent est utilisé pour déterminer la CMI de la combinaison. La nature de l'interaction est déterminée en calculant l'indice de FIC, comme expliqué précédemment pour la méthode checkerboard (**White et al., 1996; Hemaiswarya et al., 2008; Langeveld et al., 2014**).

3. Généralités sur les espèces de plantes retenues dans le présent travail

3.1. *Origanum glandulosum*

3.1.1. Présentation de la plante

Origanum vulgare L., communément appelé origan, est l'une des espèces aromatiques les plus renommées, ayant une solide tradition en tant qu'épice et plante médicinale, ainsi qu'une source bien établie de précieux médicaments à base de plantes dans la phytothérapie moderne. Il est souvent considéré comme une variété sauvage de la marjolaine et constitue un ornement odorant des montagnes. Selon la classification d'Ietswaart basée sur les caractères morphologiques, *Origanum vulgare* est divisé en six sous-espèces, parmi lesquelles se trouve *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum*, une espèce endémique des régions algériennes et tunisiennes (**Bekhechi et al., 2008; Bendahou et al., 2008a; Lombrea et al., 2020**) (photo 1).



Photo 1: *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* Terni-Tlemcen (2019)

3.1.2. Description botanique

Le genre *Origanum* comprend des plantes herbacées ou sous-ligneuses à la base. L'*Origanum glandulosum* se distingue par ses tiges dressées et ses épis denses. Les fleurs de cette plante sont de couleur blanche et demeurent étroitement groupées les unes contre les autres même après la floraison. La corolle présente une lèvre inférieure nettement plus longue que la lèvre supérieure (Quézel et Santa, 1963).

3.1.3. Systématique d'*Origanum glandulosum*

Origanum glandulosum Desf., synonyme d'*Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* Ietswaart (Desf.), est appelé en arabe "Zaâtar". C'est l'une des sous-espèces d'*Origanum vulgare* (Quézel et Santa, 1963). Selon Guignard (1996), l'espèce *O. glandulosum* est classée comme suit :

Embranchement	Phanérogames	Genre	<i>Origanum</i>
Sous-embranchement	Angiospermes	Espèce	<i>Origanum vulgare</i> (L.)
Ordre	Lamiales	Sous-espèce	<i>O. glandulosum</i> Desf.
Famille	Lamiacées		

3.1.4. Usage traditionnel

L'origan a été indiqué sous forme de teintures ou de tisanes pour les troubles respiratoires et digestifs, mais aussi sous forme de pommades pour traiter les blessures (Ličina et al., 2013). Il a également été utilisé comme remède contre les démangeaisons, les maux de tête et la dépression (Fikry et al., 2019). Des utilisations particulières ont été mentionnées pour différentes parties de la plante: Les parties aériennes ont été utilisées contre la douleur, la toux ou les troubles sexuels, les graines étaient utilisées contre les infections des voies urinaires ou les troubles menstruels, et les branches fleuries étaient utilisées en application externe pour soulager les fractures ou traiter

les maux de dents (**Bahmani et al., 2018**). Dans les pays méditerranéens, les parties aériennes de l'origan représentent une épice habituelle (**Sharifi-Rad et al., 2021**). En plus de ses utilisations culinaires et médicinales, l'origan était également utilisé en parfumerie ou comme arôme pour les boissons alcoolisées (**Kaurinovic et al., 2011**).

3.1.5. Composition chimique

L'HE d'*O. glandulosum* Desf. est principalement constituée de composés monoterpéniques. Plusieurs recherches ont indiqué que le carvacrol était le composant principal (**Belhattab et al., 2005; Sari et al., 2006; Nabti et al., 2020**), tandis que d'autres études ont montré que le thymol était le composant prédominant (**Ruberto et al., 2002; Bendahou et al., 2008a; Benbelaid et al., 2014**). À l'inverse, le *p*-cymène était le principal composant détecté dans les HEs provenant de trois localités en Tunisie (**Mechergui et al., 2010**) (**figure 10**).

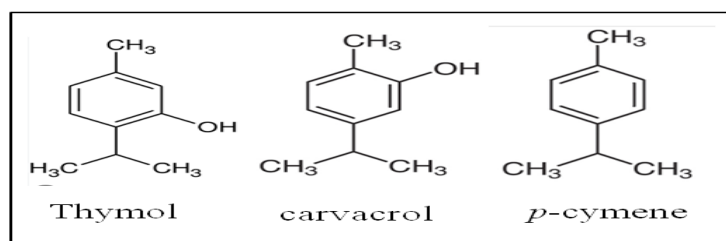


Figure 10: Composants majoritaires de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* Desf.

3.2. *Ammoides verticillata*

3.2.1. Présentation de la plante

Le genre *Ammoides* fait partie de la famille des Apiacées, également connue sous le nom d'Ombellifères. Les espèces appartenant à ce genre sont principalement des plantes herbacées annuelles ou vivaces, qui ont leur origine dans les régions méditerranéennes. En Algérie, on trouve deux espèces d'*Ammoides*, à savoir l'*Ammoides verticillata* et l'*Ammoides atlantica* (**Quézel et Santa, 1963**).

L'*Ammoides verticillata* se distingue par son arôme très aromatique et épicé. Même après avoir été desséchée, cette plante conserve une agréable odeur intense, persistante et balsamique (**BEKHCHI, 2002**) (**photo 2**).



Photo 2: *Ammoides verticillata* Terni-Tlemcen (2019)

3.2.2. Description botanique

Ammoides verticillata est une plante annuelle délicate avec une souche filiforme. Elle présente une tige très ramifiée mesurant entre 10 et 40 cm, et ne possède pas de rosette de feuilles basales. Les feuilles inférieures sont pétiolées et se composent de nombreux segments multifides disposés en verticilles. Les feuilles supérieures sont pennatifides avec des segments linéaires. Les ombelles principales de la plante se caractérisent par 8 à 15 rayons. Les fruits sont ovoïdes et mesurent moins de 1 mm de long (Quézel et Santa, 1963).

3.2.3. Systématique d'*Ammoïdes verticillata*

Ammoïdes verticillata, communément appelée Nounkha, Nûnkha et Nanoukha (Ajowan en français), est classée selon les critères de classification établis par Quézel et Santa (1963) de la manière suivante:

Embranchement	Phanérogames ou Spermaphytes	Famille	Apiacées
Sous-embranchement	Angiospermes	Genre	<i>Ammoïdes</i> Desf.
Ordre	Apiales	Espèce	<i>Ammoïdes verticillata</i> Desf.

3.2.4. Usage traditionnel

Les résultats d'une enquête ethnobotanique menée par BEKHCHI (2002) ont démontré que l'*Ammoides verticillata* possède un large éventail de propriétés médicinales, ce qui en fait une plante polyvalente pour le traitement de diverses affections. La décoction inhalée a montré des effets positifs dans le traitement de la fièvre, des rhumes, des gripes et des maladies broncho-pulmonaires. De plus, l'application de la plante mélangée avec du henné sur les sinus osseux de la face a été efficace dans le traitement de la sinusite. Pour soulager les céphalées et les

migraines, l'infusion ou la décoction de la plante associée à un citron s'est révélée efficace. De même, le mélange de la plante avec du miel a montré des effets bénéfiques dans le traitement de l'asthme, des parasites intestinaux et des douleurs gastriques. En outre, l'infusion et la décoction de la plante ont été efficaces dans le traitement des règles douloureuses, de la fièvre typhoïde, en tant qu'antipyrétiques, dépuratifs, antispasmodiques et dans les affections rénales. Les feuilles sont utilisées pour traiter diverses affections cutanées telles que les irritations dermiques, les abcès et les furoncles. Quant aux racines, elles sont employées pour traiter la diarrhée et comme diurétiques. La plante est également connue pour ses propriétés culinaires. Les feuilles et les fleurs sont utilisées comme condiment dans divers plats, tels que la soupe d'escargot. Elle est utilisée également dans la conservation des aliments. De plus, La décoction des feuilles et fleurs combinée à une tranche de citron et refroidie, offre une boisson rafraîchissante.

3.2.5. Composition chimique

La composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* présente une variabilité significative selon diverses études. Plusieurs recherches ont mis en évidence une prédominance des hydrocarbures monoterpéniques et des monoterpènes oxygénés dans cette huile. Les principaux constituants incluaient le carvacrol, le thymol, le limonène, le *p*-cymène et le γ -terpinène (Benbelaïd et al., 2014; Benyoucef et al., 2020; Senouci et al., 2020a). Dans l'étude effectuée par Bekhechi et al. (2010), quatorze composants ont été identifiés, parmi lesquels l'isothymol était prédominant lorsque la plante était collectée près de la mer à basse altitude et au début de l'étape de floraison, tandis que dans d'autres cas, le thymol était plus abondant. Une autre étude réalisée par Tefiani et al. (2015) a mis en évidence que les composants prédominants de l'huile étaient l'alcool de cumin, le *p*-cymène et le limonène (figure 11).

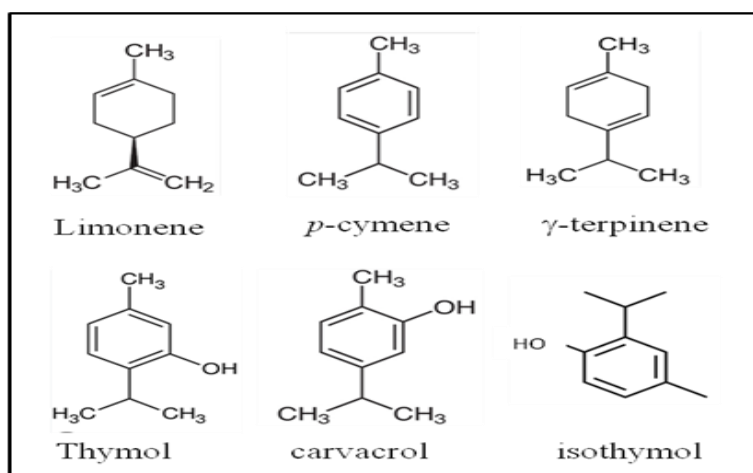


Figure 11: Composants majoritaires de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*

3.3. *Saccocalyx satureioides*

3.3.1. Présentation de la plante

Le genre *Saccocalyx*, appartenant à la famille des Lamiacées, se distingue par une espèce endémique en Algérie appelée *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. Cette plante prospère dans les dunes de sable de la région pré-désertique et est largement connue sous le nom local de "Zaatar" (Quézel et Santa, 1963) (photo 3).



Photo 3: *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. Aïn-Sefra (2019)

3.3.2. Description botanique

Saccocalyx satureioides est un sous-arbrisseau caractérisé par des tiges érigées d'une hauteur variant entre 20 et 100 cm. Ses feuilles sont ovales lancéolées, mesurant environ 4 à 6 mm de long sur 2 à 3 mm de large. Elles sont bordées de cils et couvertes de poils raides. Les fleurs se regroupent en verticillastres et sont de petite taille, de couleur blanche, rose ou pourpre. Le calice présente cinq dents et se développe fortement, devenant vésiculeux à maturité. La corolle possède quatre lobes très courts, sub-égaux, les lobes supérieurs sont \pm émarginés (Quézel et Santa, 1963).

3.3.3. Systématique de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Durieu

Selon Quézel et Santa (1963), la position systématique de *Saccocalyx satureioides* Coss. et Durieu est la suivante :

Embranchement	Phanérogames	Famille	Lamiacées
Sous-embranchement	Angiospermes	Genre	<i>Saccocalyx</i>
Ordre	Lamiales	Espèce	<i>Saccocalyx satureioides</i> Coss. et Durieu

3.3.4. Usage traditionnel

Bien que largement utilisée de manière traditionnelle, peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant l'utilisation traditionnelle de cette plante. La partie aérienne de la plante est communément préparée en décoction pour traiter les troubles gastriques et les spasmes (**Bendahou et al., 2008b**). Cependant, il est essentiel de mener des enquêtes approfondies pour documenter leur utilisation traditionnelle.

3.3.5. Composition chimique

Plusieurs groupes de recherche ont mené des analyses visant à déterminer la composition chimique de l'huile essentielle extraite des populations de *Saccocalyx satureioides* Coss. & Duren en Algérie. Leurs conclusions mettent en évidence une prédominance des monoterpènes oxygénés, suivie des hydrocarbures monoterpéniques. Parmi les principaux constituants de l'huile essentielle, on retrouve notamment le bornéol, l' α -terpinéol et le thymol. Selon ces études, l'huile essentielle extraite de *S. satureioides* Coss. & Dur en Algérie présente un chémotype dominant de thymol/ α -terpinéol/bornéol (**Biondi et al., 2006; Laouer et al., 2006; Bendahou et al., 2008b; Ammar et al., 2020**) (figure 12).

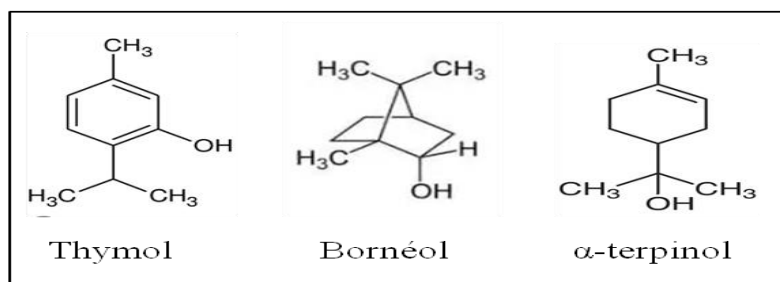


Figure 12: Composants majoritaires de l'huile essentielle *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur.

Matériel et Méthodes

1. Prélèvements

Les échantillons ont été prélevés entre février 2018 à mars 2019 auprès de patients hospitalisés atteints d'hémopathies malignes présentant des symptômes de candidose orale dans le service d'hématologie clinique du CHU de Tlemcen. Avant le prélèvement, chaque patient a subi un examen clinique complet, y compris un examen oral effectué par un médecin. Les échantillons oraux ont été collectés à l'aide d'écouvillons stériles et ont été immédiatement acheminés au laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au Biomedical et à L'environnement (LAMAABE) de l'université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen afin d'être analysés.

1.1. Isolement et purification des souches

Les prélèvements sont ensemencés directement sur gélose Sabouraud au chloramphénicol coulée en boîtes de Pétri puis incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Ensuite, les souches obtenues ont été purifiées par repiquages successifs sur milieu Sabouraud au chloramphénicol jusqu'à l'obtention des colonies homogènes. Après, les souches pures sont ensemencées sur gélose Sabouraud inclinée en tube puis incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures et conservée à 4°C.

1.2. Identification des souches

1.2.1. Test de blastèse (test de germination)

Le test de blastèse, également appelé test de germination, est une méthode utilisée pour différencier entre *C. albicans* et les autres espèces de *Candida*. Cette méthode est basée sur la capacité de *C. albicans* à former des tubes germinatifs lors de la germination. Le test de blastèse est réalisé en prélevant une colonie de la souche à tester et en l'émulsionnant dans 1 ml de sérum humain frais dans un tube à hémolyse stérile bouché. Le tube est ensuite incubé à 37°C pendant 3 à 4 heures pour permettre la germination. Une fois que la germination a eu lieu, une goutte de la suspension est déposée sur une lame de microscope et observée sous un grossissement de 400 fois (G×400). Si des tubes germinatifs sont présents, il s'agit probablement de *C. albicans*. Si aucun tube germinatif n'est observé, d'autres tests doivent être réalisés pour identifier l'espèce de *Candida* en question.

1.2.2. Milieu CHROMagar *Candida*

Cette méthode simple et efficace utilise des substrats chromogènes pour différencier les colonies de *Candida* en fonction de leur capacité à métaboliser différents sucres et à produire diverses enzymes. Le milieu utilisé (CHROMagar[®], France) est composé d'un mélange de substrats chromogènes et d'antibiotiques pour inhiber la croissance des bactéries. Les différentes espèces de *Candida* produisent des colonies de couleurs différentes, ce qui permet une identification facile.

Par exemple, *C. albicans* produit des colonies vert-bleuâtre, *C. tropicalis* des colonies bleu métallique, *C. krusei* des colonies larges rose pâle et mates, *C. glabrata* des colonies rose foncé à violette.

1.2.3. Identification par galerie Api *Candida*

La galerie Api *Candida* (bioMérieux, France) est un test d'identification de *Candida*, qui utilise une série de tests biochimiques pour identifier les différentes espèces de *Candida*. Le processus commence par la préparation d'une suspension de la souche de *Candida* à tester à partir d'une culture jeune de levure (18 à 24 heures) dans un milieu liquide. La suspension est ajustée à une turbidité de 3 McFarland. Ensuite, la suspension est utilisée pour ensemercer chaque puits de la galerie. Après l'ensemencement, la galerie est incubée pendant 24 à 48 heures à 37°C pour favoriser la croissance de la souche de *Candida*. Au cours de cette période, les enzymes produites par la levure dans chaque puits réagissent avec les substrats présents dans les milieux de culture. Ces réactions chimiques créent des changements de couleur, des turbidités ou des précipitations dans chaque puits, permettant ainsi de distinguer les différentes espèces de *Candida*. Les résultats des tests sont ensuite interprétés en utilisant une table de référence fournie par le fabricant de la galerie.

1.2.4. Identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS

Une identification fiable des souches de *Candida* est indispensable pour évaluer leur résistance aux antifongiques et pour sélectionner le traitement le plus approprié. Pour cette raison, une prestation de service a été réalisée à l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection en France pour confirmer l'identification de ces souches. La technique de MALDI TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (Microflex LTII, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) a été choisie pour cette analyse car elle est considérée comme étant une méthode de référence très fiable pour l'identification des espèces de *Candida*. La technique est basée sur la spectrométrie de masse, qui permet de mesurer la masse moléculaire des protéines présentes dans les souches de *Candida*. Les spectres de masse obtenus ont ensuite été comparés à une base de données de référence pour identifier les espèces de *Candida*. Cette technique est très sensible et spécifique, offrant une identification précise et rapide des souches de *Candida*. Elle est également très avantageuse en termes de coûts et de temps par rapport à d'autres méthodes d'identification.

1.3. Test de sensibilité aux antifongiques : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

La détermination des concentrations minimales inhibitrices des agents antifongiques amphotéricine B (Sigma Aldrich), fluconazole (Pfizer) et caspofungine (Sigma Aldrich) pour chaque souche, a été effectuée selon le protocole décrit par le M27-A3 du CLSI (CLSI 2008). Les solutions d'antifongiques ont été préparées dans du DMSO (amphotéricine B et caspofungine) ou de l'eau distillée stérile (Fluconazole) et diluées avec le milieu RPMI 1640. 100 µL de chaque dilution ont été distribués dans des puits de microplaques de 96 puits. Les concentrations finales étaient : Amphotericin B (0,031 à 16 µg/mL), fluconazole (0,125 à 64µg/mL) et caspofungine (0,015 à 8µg/mL).

Le matériel fongique a été mis en suspension dans une solution de NaCl à 0,85%, et la turbidité a été ajustée à 0,5 McFarland. Ensuite, la suspension a été diluée avec le milieu RPMI 1640 pour obtenir une densité de 2.5×10^3 UFC/mL. 100 µL de cette suspension ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les valeurs des CMI ont été déterminées visuellement.

1.4. Étude du pouvoir des souches isolées à former des biofilms

L'étude de la capacité des souches isolées à former des biofilms a été évaluée selon la méthode décrite par **Pierce et al. (2008)**. Les souches ont été inoculées dans 20 mL de bouillon Sabouraud et incubées à 30 °C pendant 18 heures sous agitation continue (120 tours/minutes). La suspension obtenue est centrifugée (3,000g/5 min/4 °C) puis le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans une solution tampon phosphate salé (PBS 10mM, pH 7,4) puis agiter par vortex et re-centrifugé pour être lavé. Le culot est ensuite re-suspendu dans 20 mL de milieu RPMI-1640 tamponné avec l'acide morpholino-propane sulfonique (MOPS 0,165 M, pH 7). Cette suspension est ensuite diluée avec le même milieu jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité de 10^6 cellules/mL. Il est important de noter que la densité cellulaire fongique de l'inoculum initial est critique pour le développement correct du biofilm. Des densités cellulaires trop élevées ou trop faibles entraîneront probablement de mauvais biofilms. À partir de l'inoculum standardisé préparé précédemment, 100µl sont pipetés dans des puits sélectionnés de la plaque de microtitration pour les biofilms mono-espèce de *C. albicans* et *C. glabrata*, et 50 µl sont utilisés pour chaque espèce dans le cas de biofilm mixte. Les plaques de microtitration sont recouvertes, scellées avec du parafilm, et placées à l'intérieur d'un incubateur pendant 24 heures à 37°C. Après l'incubation, le surnageant est éliminé et les biofilms ont été lavés avec du PBS puis quantifiés par la méthode de coloration au cristal violet (**O'Toole, 2011**).

1.4.1. Quantification de la biomasse du biofilm

Les biofilms ont été colorés avec 125 µL de cristal violet à 0,1 % pendant 15 minutes. Ensuite, l'excès de colorant a été éliminé et les puits ont été rincés avec PBS. Le cristal violet lié au biofilm a été dissous en ajoutant 125 µL d'acide acétique à 30 % et l'absorbance a été enregistrée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque *EL × 808™*. Chaque souche a été testée en triplicata. Les souches ont été classées en tant que productrices de biofilm faibles, modérées ou fortes en suivant les critères établis par **Stepanović et al. (2000)**: $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ producteur de biofilm faible; $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ un producteur de biofilm modéré ; $4 \times OD_c < OD$ un producteur de biofilm fort.

2. Matériel végétal

Les plantes choisies pour cette étude ont été sélectionnées en tenant compte de leur endémisme (**Quézel et Santa, 1963**) et de leurs richesses en huiles essentielles selon la littérature scientifique (**Bendahou et al., 2008a; Bendahou et al., 2008b; Benbelaïd et al., 2014**).

Les parties aériennes des plantes utilisées dans cette étude ont été récoltées en 2019 en pleine floraison. *Ammoides verticillata* Desf. (Nounkha) et *Origanum vulgare ssp. glandulosum* Desf., (Zaatar el berhouche) ont été récoltées à Tlemcen, par contre *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. (Zaater Armel) a été récoltée à Ain sefra (**figure 13**). L'identification botanique a été réalisée conformément à la flore de **Quézel et Santa (1963)** et confirmée par le laboratoire d'Ecologie et de la biodiversité végétale de l'Université de Tlemcen où des spécimens sont déposés et codés.

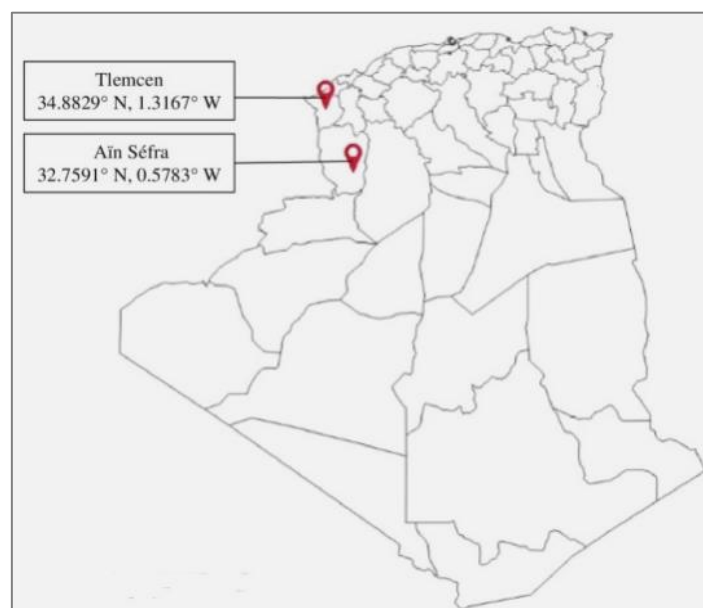


Figure 13: Stations de récolte des plantes

2.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation en utilisant le système Clevenger, tel que recommandé dans la pharmacopée européenne (**Pharmacopoeia 2008**). Cette méthode se compose d'un ensemble de procédures rigoureuses, débutant par la préparation de la matière végétale, qui est d'abord coupée en petits fragments, puis introduite dans un ballon. Le ballon est rempli d'eau de manière à immerger complètement la matière végétale et chauffé pendant trois heures pour produire de la vapeur contenant des molécules aromatiques. La vapeur est alors condensée pour séparer les huiles essentielles de l'eau, aboutissant à une huile pure et concentrée (**photo 4**). Pour affiner davantage l'huile obtenue, un processus de déshydratation a été appliqué en utilisant du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) afin d'éliminer toute trace d'eau. Enfin, les huiles essentielles ont été stockées dans des récipients propres et scellés à une température de 4°C.



Photo 4: Dispositif Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

2.2. Analyse chimique des huiles essentielles

L'analyse des composants présents dans les huiles essentielles a été réalisée en utilisant une technique de chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette analyse a été effectuée avec un chromatographe Perkin Elmer Autosystem CG, qui est équipé d'un seul injecteur et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les colonnes utilisées pour séparer les composés étaient deux colonnes capillaires en silice fondue de 60 m de longueur et 0,22 mm de diamètre, avec une épaisseur de film de 0,25 μm . Les phases stationnaires utilisées étaient Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Les conditions opératoires étaient les suivantes : l'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1 ml/min, l'injecteur et le détecteur étaient maintenus à une température de 280°C, la température de la colonne a été augmentée de

60 à 230°C à une vitesse de 2°C/min puis maintenue isotherme à 230°C pendant 30 minutes. L'injection a été réalisée en mode splitless avec un rapport de division de 1:80 et une quantité d'huile essentielle injectée de 0,1 µl.

En outre, des analyses de chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM) ont également été effectuées à l'aide d'un système intégré comprenant un détecteur Perkin Elmer TurboMass et un chromatographe XL Perkin Elmer Autosystem. Ce système était équipé de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 m x 0,22 mm de diamètre, épaisseur de film de 0,25 µm) avec des phases stationnaires différentes : Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Les conditions de chromatographie en phase gazeuse étaient les mêmes que décrites précédemment. Pour les analyses de spectrométrie de masse, les conditions étaient les suivantes : température de la source d'ions : 150 °C ; énergie d'ionisation : 70 eV ; les spectres électroniques de masse à ionisation ont été acquis sur la gamme de masse de 35 à 350Da. Le temps de numérisation était de 1 s. L'injection a été réalisée en mode splitless avec un rapport de division de 1:80.

La méthode utilisée pour identifier les composants des huiles essentielles est basée sur deux étapes principales : (i) en comparant les indices de rétention (IR) obtenus sur des colonnes apolaires et polaires avec des composés authentiques ou des données de la littérature, en utilisant une interpolation linéaire par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes, et (ii) en comparant les spectres obtenus avec ceux de bibliothèques spectrales de masses commerciales (Adams 2001; König et al. 2004), ainsi que ceux de la bibliothèque du laboratoire de Corse (France).

2.3. Test de sensibilité aux huiles essentielles

2.3.1. Technique de diffusion en gélose

La technique de diffusion en gélose décrite dans le document CLSI M44-A (Sheehan et al. 2004), a été utilisée pour une évaluation préliminaire de l'activité antifongique des huiles essentielles. Pour préparer l'inoculum, des colonies de morphologie similaire ont été sélectionnées et suspendues dans 5 mL de NaCl stérile à 0,85%. La suspension cellulaire a été vortexée pendant 15 secondes et la turbidité a ensuite été ajustée à 0,5 McFarland puis mesurée à une longueur d'onde de 530 nm, donnant une suspension de $1-5 \times 10^6$ cellules/mL. L'ensemencement de milieu Mueller-Hinton supplémenté de glucose et de bleu de méthylène en boîte de Petri a ensuite été effectué en faisant tremper un écouvillon stérile dans la suspension, puis en l'étalant soigneusement sur toute la surface de milieu dans trois directions différentes pour obtenir une croissance homogène. Ensuite, un disque en papier Whatman (No. 3) (6mm), imprégné par 3 µL d'huile

essentielle, est déposé sur la surface de la gélose pré-ensemencée. La boîte de pétri est ensuite placée en position inversée dans un incubateur réglé à 37°C. Après une incubation de 48 heures, les diamètres d'inhibition, y compris ceux des disques, sont mesurés en millimètres à l'aide d'une règle graduée. Chaque huile essentielle est testée indépendamment et l'expérience est répétée à trois reprises pour garantir une fiabilité maximale des résultats.

2.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, d'*Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* et de *Saccocalyx satureioides* a été réalisée en suivant un protocole adapté, inspiré du protocole M27-A3 du CLSI (CLSI 2008). Les solutions d'huiles essentielles ont été préparées en utilisant du DMSO et ont été diluées avec le milieu RPMI 1640. 100 µL de chaque dilution ont été distribués dans des puits de microplaques de 96 puits. Les concentrations finales en huiles essentielles variaient de 7,8 à 4000 µg/mL.

La méthode de préparation de la suspension a suivi le même protocole que celui décrit pour le test de sensibilité aux antifongiques. Ensuite, 100 µL de cette suspension ont été ajoutés à chaque puits, et les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Par la suite, les CMI ont été déterminées par observation visuelle.

2.3.3. Détermination des concentrations minimales fongicides « CMFs »

Les CMFs ont été déterminées en sous-cultivant 10 µL de chaque puits sans croissance visible dans l'essai CMI sur gélose Sabouraud pendant 48 h à 37 ° C. La plus faible concentration de l'agent antifongique pour laquelle une croissance négative a été enregistrée est considérée comme la CMF. Le rapport CMF/CMI a été calculé pour déterminer si le composé testé avait un effet fongicide (rapport CMF/CMI < 4) ou fongistatique (rapport CMF/CMI ≥ 4) (Peixoto et al. 2017).

2.4. Effet des huiles essentielles sur les biofilms mono-espèce et mixte de *C. albicans* et *C. glabrata*

2.4.1. Effet des huiles essentielles sur le développement de biofilms mono-espèce et mixte : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm

Des biofilms ont été formés en présence de diverses concentrations d'huiles essentielles et d'amphotéricine B. Dans un premier temps, un volume de 100 µL d'une suspension standardisée (1×10^6 cellules/mL dans RPMI1640) a été pipetée dans les puits de la microplaque de 96 puits pour les biofilms mono-espèce. Pour le biofilm mixte, 50 µL de chaque espèce (dans un ratio 1:1) ont été utilisés. Ensuite, les microplaques ont été incubées pendant 4 heures à 37 °C. Après incubation, les surnageants ont été éliminés et les biofilms formés ont été lavés deux fois avec du PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes.

Ensuite, 100 μ L de dilutions d'huiles essentielles à des concentrations de $1/2 \times$ CMI, CMI, $2 \times$ CMI et $4 \times$ CMI ou d'amphotéricine B allant de 128 μ g/mL à 0,125 μ g/mL ont été ajoutés et incubés pendant 24 h à 37 °C. Des puits exempts de composé test ont servi de témoin de croissance, tandis que des puits exempts de biofilm ont servi de témoins de stérilité. Ensuite, le milieu a été éliminé suivi d'un rinçage deux fois par le PBS pour éliminer les cellules non liées.

La viabilité des biofilms a été évaluée à l'aide d'un test de coloration au résazurine (Sigma-Aldrich), tel que décrit précédemment par **Heredero-Bermejo et al. (2020)**. Le résazurine est un indicateur de la viabilité cellulaire qui est réduit par les cellules vivantes en résorufine, un composé rose fluorescent. Les cellules mortes ne sont pas capables de réduire le résazurine, de sorte que la solution reste bleue (**figure 14**). Pour ce faire, un mélange de 100 μ L de milieu et de 20 μ L de solution de résazurine 0,01% (p/v) a été ajouté à chaque puits de la microplaque, puis recouvert d'aluminium. Après une incubation de 24 h à 37 °C, une lecture visuelle a été effectuée pour déterminer la concentration minimale d'inhibition de biofilm (CMIB), qui est définie comme la plus faible concentration d'huiles essentielles ou d'amphotéricine B qui empêche la réduction du résazurine bleu en résorufine rose.

2.4.2. Effet des huiles essentielles sur les biofilms préformés : Détermination de la concentration minimale éradicatrice de biofilm

Des biofilms ont été laissés se former pendant 24 heures en l'absence d'huiles essentielles et d'amphotéricine B. Après l'incubation, le milieu a été aspiré et les puits ont été lavés avec du PBS. Ensuite, 100 μ L d'huiles essentielles à des concentrations de $1/2 \times$ CMI, CMI, $2 \times$ CMI et $4 \times$ CMI ou d'amphotéricine B de 128 μ g/mL à 0,125 μ g/mL ont été ajoutés aux puits et incubés à 37 °C pendant 24 heures. Des puits sans composé de test et des puits sans biofilm ont servi de témoins de croissance et de stérilité, respectivement. La viabilité des biofilms a été surveillée par le test de résazurine de la même manière que décrite ci-dessus pour déterminer la concentration minimale d'éradication des biofilms (CMEB).

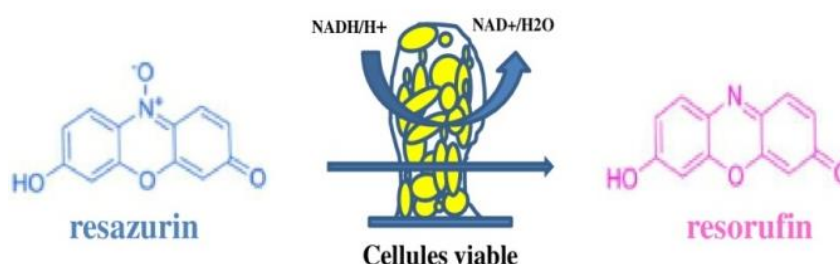


Figure 14: Conversion de résazurine en résorufine

2.5. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec amphotéricine B

Afin de déterminer l'existence potentielle d'effets synergiques, des combinaisons entre les huiles essentielles et l'amphotéricine B ont été testées sur des souches planctoniques de *C. albicans* (A22) et *C. glabrata* (G20) en utilisant la technique Checkerboard décrite par Vitale et al. (2005). Des dilutions des huiles essentielles et de l'amphotéricine B (CMI/8 à CMI x 8) ont été préparées dans le milieu RPMI 1640 de manière similaire au test de détermination de la CMI. Ensuite, 50 µl de chaque dilution de l'amphotéricine B ont été déposés verticalement dans les puits de la microplaque de 96 puits, suivis de 50 µL de chaque dilution huile essentielle à tester horizontalement. Après cela, 100 µl d'inoculum (10^3 UFC/mL) de souches *Candida* ont été ajoutées à chaque puits, suivies d'une incubation à 37°C pendant 24 heures. L'interaction a été déterminée en tant que l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (ICIF), qui a été calculé comme suit :

$$\text{ICIF} = \Sigma \text{CIF} = \text{CIF}_{\text{HE}} + \text{CIF}_{\text{AmB}}$$

$\text{CIF}_{\text{HE}} = \text{CMI}_{\text{HE en combinaison}} / \text{CMI}_{\text{HE seul}}$

$\text{CIF}_{\text{AmB}} = \text{CMI}_{\text{AmB en combinaison}} / \text{CMI}_{\text{AmB seul}}$

Les résultats ont été interprétés en fonction des valeurs de ICIF:

Synergie: $\text{ICIF} \leq 0,5$; Additif: $0,5 \leq \text{ICIF} \leq 1$; Indifférent: $1 < \text{ICIF} < 4$; Antagonisme: $\text{ICIF} \geq 4$ (Mulyaningsih et al. 2010) (figure 15).

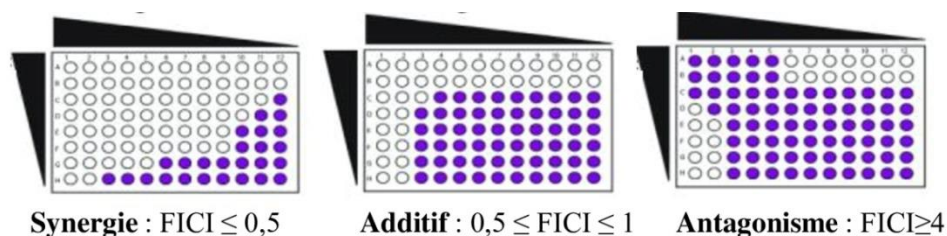


Figure 15: Interprétation des résultats de la technique Checkerboard

2.6. Effet de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur les biofilms préformés de *Candida albicans* et *Candida glabrata* : Observation par microscopie électronique à balayage

L'effet de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur les biofilms mono-espèce et mixte préformés a été observé par microscopie électronique à balayage (MEB) Hitachi TM-1000 (Hitachi, Japon) (photo 5). Le choix de cette huile essentielle était fondé sur sa forte activité comparée à celle des autres huiles. Brièvement, 500 µL d'une suspension de cellules standardisée de *C. albicans* (A22) ou *C. glabrata* (G20) (1×10^6 cellules/mL) pour les biofilms mono-espèce ou 250 µL de chaque isolat pour le biofilm mixte ont été dispersés sur une lamelle de verre stérile et incubés pendant 24

h à 37 °C. Ensuite, les biofilms ont été rincés deux fois avec du PBS et incubés avec une concentration de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* équivalente à 1x CMI pendant 24 h supplémentaires. Des biofilms non traités ont servi de témoin. Après incubation, les biofilms ont été lavés avec du PBS et fixés avec du glutaraldéhyde à 2,5%. Après fixation, une étape de déshydratation a été réalisée dans une série de solutions d'éthanol (70% /10 min, 95% /10 min et 100% /20 min) et les biofilms ont ensuite été laissés à sécher à l'air libre.



Photo 5: Microscopie électronique à balayage Hitachi TM-1000

2.7. Analyse statistique

Chaque essai a été réalisé en triplicata et répété deux fois de manière indépendante. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS Statistics V 26. La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Le test de Kruskal-Wallis H a été utilisé pour comparer les diamètres des zones d'inhibition. La formation de biofilm a été évaluée par le test ANOVA à un facteur. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

Résultats et discussion

La candidose orale suscite une préoccupation croissante pour les médecins soignants, en particulier parmi les patients immunodéprimés. L'émergence de cette infection fongique est amplifiée par l'apparition de résistances aux antifongiques et par la pénurie de ces derniers dans les pharmacies.

1. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués durant la période de 2018-2019 (juste avant le début du COVID) au service d'hématologie du CHU de Tlemcen. Au total, 27 prélèvements ont été collectés à partir des patients. D'après la **figure 16**, l'infection était légèrement plus fréquente chez les femmes (55,55 %) que chez les hommes (44,44 %). Notre constat est en accord avec les résultats des études précédentes qui ont observé que les femmes avaient plus de risques que les hommes de contracter cette infection (**Maheronnaghsh et al., 2020**). Nous avons également examiné l'impact de l'âge sur la susceptibilité à l'infection. Nos résultats ont mis en évidence une prévalence plus élevée chez les individus de 51 ans et plus. Cette corrélation a été observée dans des études antérieures et est souvent associée à une hygiène buccale insuffisante, à des altérations du statut nutritionnel, à une réduction de la production de salive, à une augmentation de la prise de médicaments, et au porte de prothèses dentaires (**Butticaz et al., 2003; Fanello et al., 2006; Schelenz et al., 2010; Hu et al., 2019**).

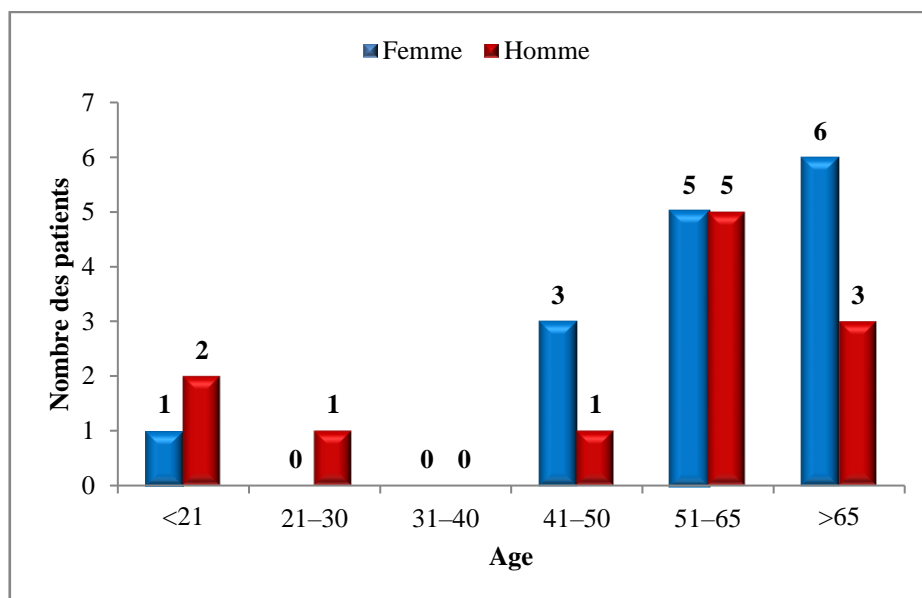


Figure 16: Répartition par âge et par sexe des patients

2. Isolement et identification des levures de *Candida* spp.

Les résultats des souches identifiées sont présentés dans la **figure 17**.

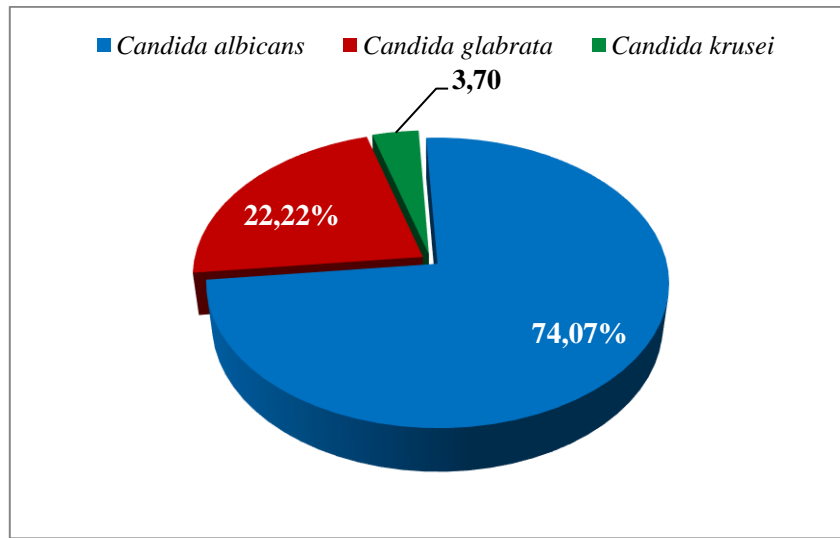


Figure 17: Distribution des *Candida* spp. isolées de la cavité orale des patients atteints de candidose orale au service d'hématologie clinique du CHU de Tlemcen

L'analyse des résultats révèle une prévalence dominante de *C. albicans* (n=20 ; 74,07%) suivi de *C. glabrata* (n=06 ; 22,22%) et *C. Krusei* (n=01 ; 3,70%).

La fréquence élevée de *C. albicans* est cohérente avec les résultats d'autres études. Dans une étude menée par **Mardani et al. (2020)** sur la candidose orale chez les patients atteints d'hémopathies malignes, *C. albicans* a été détecté dans environ 91,6 % des cas examinés. De même, **Arastehfar et al. (2019)** ont également constaté que *C. albicans* (80,3 %) était l'espèce la plus isolée chez des patients iraniens atteints d'hémopathies malignes souffrant de candidose orale. Il n'est pas surprenant que *C. albicans* soit l'espèce de *Candida* prédominante, étant donné sa présence abondante sur les muqueuses du tractus gastro-intestinal (**Hallen-Adams et Suhr, 2016**).

Cependant, bien que les recherches indiquant que *C. albicans* était l'espèce la plus fréquemment incriminée dans diverses formes de candidoses humaines, une augmentation significative des infections provoquées par des espèces de *Candida* non *albicans* a été constatée ces dernières décennies (**Ruan et Hsueh, 2009; Silva et al., 2012**). Dans notre étude, *C. glabrata* était la deuxième espèce (22,22%) la plus dominante parmi les espèces de *Candida* non *albicans* ce qui est en accord avec les résultats antérieurs obtenus par d'autres chercheurs. **Katirae et al. (2010)** ont rapporté que *C. glabrata* (22%) était la deuxième espèce la plus fréquemment détectée, après *C. albicans* (50,2%), chez des patients iraniens atteints du VIH souffrant de candidose orale. Des résultats similaires ont été relevés par **Sav et al. (2020)** en Turquie, où *C. glabrata* s'est classée en deuxième position (23,5%) après *C. albicans* (41,2%) parmi 34 patients souffrant de candidose

orale. Notons que les cas de candidose orale provoquée par *C. glabrata* chez les patients atteints du VIH et de cancer semblent être plus sévères et plus difficiles à traiter (Li et al., 2007).

En outre, nos résultats ont également révélé la présence de *C. krusei*, mais à une fréquence plus faible (3,70%). Cette observation est conforme aux résultats des travaux antérieurs qui ont souligné sa présence de façon occasionnelle dans la candidose orale (Hu et al., 2019 ; Nasri et al., 2023). Il est impératif de prendre en considération cette présence, car *C. krusei* peut jouer un rôle crucial dans l'infection en raison de sa résistance inhérente aux azolés, notamment le fluconazole (Whaley et al., 2017).

L'augmentation apparente de la prévalence des espèces de *Candida* non *albicans* provoquant la candidose chez l'homme peut être attribuée aux progrès dans les méthodes d'identification. Ces avancées impliquent l'utilisation de milieux chromogènes capables de distinguer différentes espèces de *Candida*, ainsi que l'intégration de techniques moléculaires pour une identification plus précise (Liguori et al., 2009).

3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) aux antifongiques

L'évaluation de la susceptibilité des isolats de *Candida* aux antifongiques est une étape cruciale pour orienter la sélection des antifongiques appropriés, garantissant un traitement efficace et prévenant le développement de la résistance antifongique. Dans notre étude, les tests de sensibilité aux antifongiques ont été réalisés en utilisant la méthode de microdilution conformément au document M27-A3/S4 du CLSI. Les résultats obtenus sont donnés dans le **tableau 1**.

D'après le **tableau 1**, l'amphotéricine B a démontré une excellente efficacité contre l'ensemble des souches isolées. Ces résultats correspondent à ceux obtenus dans l'étude menée par Monsen et al. (2023), où une sensibilité élevée des souches de *Candida*, isolées chez des patients atteints de cancer et souffrant de candidose orale, a été observée vis-à-vis de l'amphotéricine B. En effet, l'amphotéricine B est couramment considérée comme l'antifongique de premier choix pour le traitement des candidoses (Fang et al., 2021). Son mécanisme d'action repose sur la liaison directe à l'ergostérol présent dans les cellules fongiques et endommage les membranes cellulaires, entraînant l'efflux du contenu cytoplasmique et la mort cellulaire (Brajtburg et al., 1990).

Tableau 1: Résultats des CMI (µg/mL) de fluconazole, amphotéricin B, et de la caspofungine vis-à-vis les souches *Candida* isolées

Espèces de <i>Candida</i>	Antifongiques	CMI (µg/mL)	Nombre des isolats	Resistance (%)
<i>C. albicans</i> (n =20)	Fluconazole	R > 8	13	65
		I = 4	3	15
		S ≤ 2	4	20
	Amphotericin B	R > 1	0	0
		S ≤ 1	20	100
	Caspofungine	R ≥ 1	0	0
I = 0.5		6	30	
S ≤ 0.25		14	70	
<i>C. glabrata</i> (n =06)	Fluconazole	R > 64	0	0
		I ≤ 32	6	100
		S = ND	0	0
	Amphotericin B	R > 1	0	0
		S ≤ 1	6	100
	Caspofungine	R ≥ 0.5	0	0
I = 0.25		3	50	
S ≤ 0.12		3	50	
<i>C. Krusei</i> (n = 01)	Fluconazole	R	1	100
	Amphotericin B	R	0	0
		S	1	100
	Caspofungine	R > 1	0	0
		I = 0.5	1	100
		S ≤ 0.25	0	0

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

R : résistante ; I : intermédiaire ; S : sensible

Cependant, il est essentiel de noter que l'utilisation de l'amphotéricine B dans le traitement de la candidose orale est limitée par ses effets secondaires significatifs et sa toxicité associée (Fang et al., 2021). De plus, il est difficile de trouver des formulations topiques de cet antifongique dans de nombreux pays (Quindós et al., 2019).

En ce qui concerne le fluconazole, 65% d'isolats de *C. albicans* présentaient une résistance, tandis que 15% d'isolats ont montré une sensibilité intermédiaire et 20% d'isolats étaient sensibles. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Dos Santos Abrantes et al. (2014), qui a révélé une prévalence de 50% et 49,05% d'isolats de *C. albicans* résistants au fluconazole obtenus des lésions buccales des patients séropositifs au Cameroun et en Afrique du Sud, respectivement. En effet, le fluconazole est un agent antifongique fréquemment utilisé pour le traitement de la candidose orale et systémique en raison de sa toxicité réduite, de son efficacité et de sa bonne tolérance (Alkhars et al., 2023). Cependant, l'utilisation répandue de cet antifongique a contribué

à l'émergence des souches résistantes. Cette résistance peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la modification ou l'augmentation de la cible du médicament, l'augmentation de l'efflux du médicament et des altérations dans la biosynthèse de stérol (**Berkow et Lockhart, 2017**).

Concernant la caspofungine, six isolats (30 %) de *C. albicans* ont révélé une sensibilité intermédiaire, tandis que 14 autres isolats (70 %) étaient considérés comme sensibles. Quant à *C. glabrata*, 03 isolats (50 %) ont montré une sensibilité intermédiaire, tandis que les 03 restants (50 %) étaient considérés comme sensibles. De même, la seule souche isolée de *C. krusei* a présenté une sensibilité intermédiaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Mardani et al. (2020)**.

4. Evaluation de la capacité de *Candida* spp. à former des biofilms

Les **figures 18** et **19** représentent la capacité des souches *C. albicans* et *C. glabrata* à former des biofilms. Toutes les souches avaient la capacité de produire un biofilm, mais à des niveaux différents. La majorité des souches de *C. albicans* (76,19 %) était faiblement productrice de biofilm, tandis que 23,80 % étaient modérément productrices de biofilm. Toutes les souches de *C. glabrata* étaient faiblement productrices de biofilm. De plus, nous avons observé que la culture mixte de *C. albicans* et *C. glabrata* produisait une biomasse de biofilm plus importante que les biofilms formés individuellement.

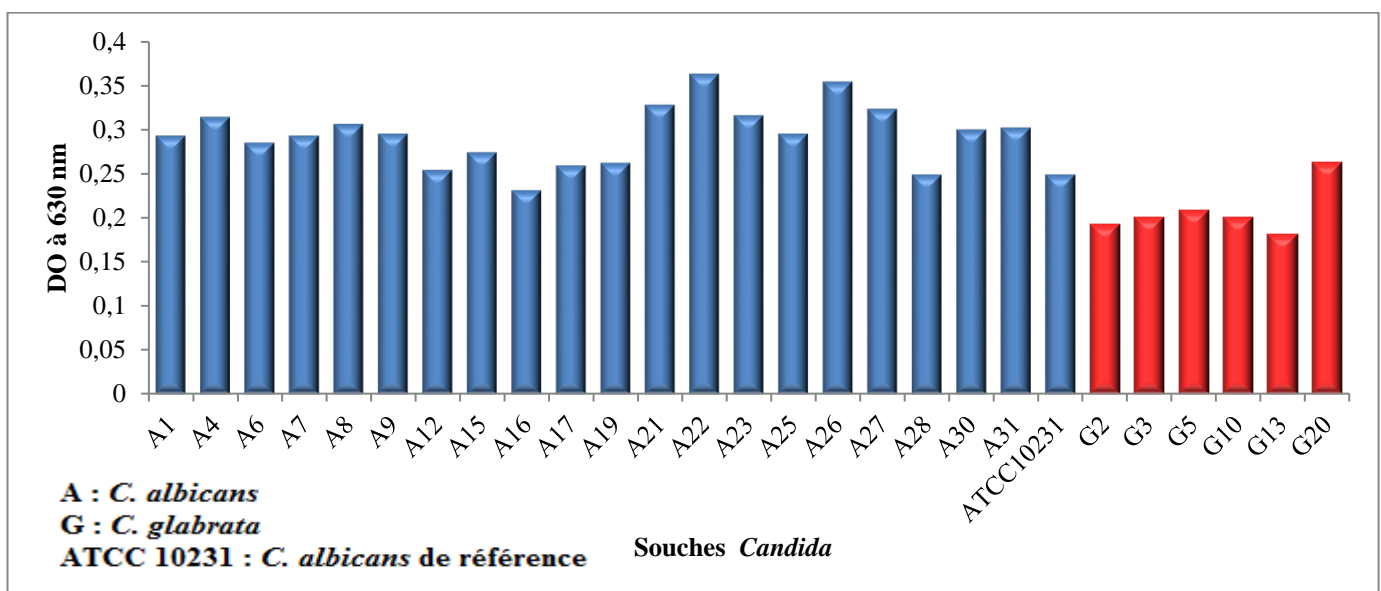


Figure 18: Capacité des souches *C. albicans* et *C. glabrata* à former des biofilms

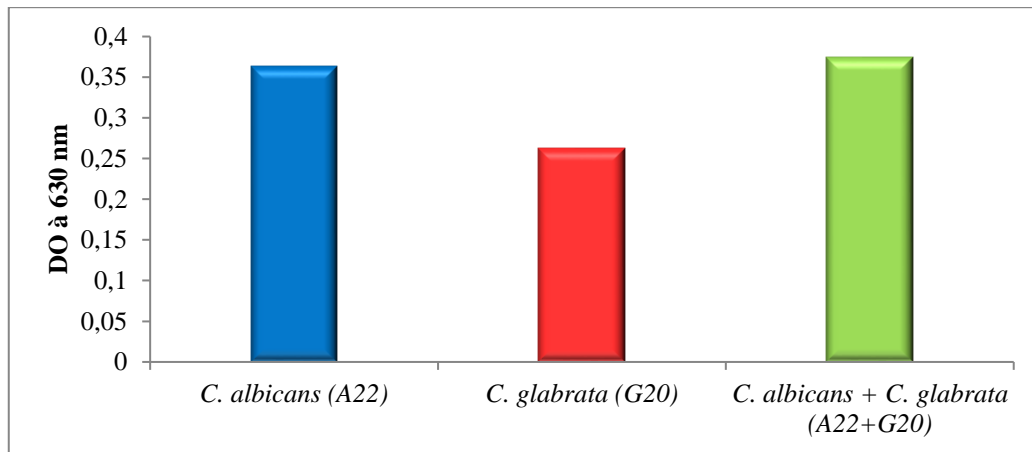


Figure 19: Capacité des souches *C. albicans* et *C. glabrata* à former un biofilm mixte

5. Composition chimique des huiles essentielles étudiées.

Les résultats de la composition chimique des HES d'*O. glandulosum*, d'*A. verticillata* et de *S. satureioides* ont consigné dans le **tableau 2**. On remarque que toutes les HES étudiées sont plus riches en monoterpènes. Selon les familles chimiques, les HES d'*A. verticillata* et de *S. satureioides* contiennent plus de monoterpènes oxygénés alors que l'HE d'*O. glandulosum* contient plus de monoterpènes hydrocarbonés.

Du point de vue composition chimique, l'HE d'*O. glandulosum* contient comme composés majoritaires le thymol (38,36%), le γ -terpinène (24,36%) et le p -cymène (18,33%). Aussi, l'analyse de l'HE d'*A. verticillata* a révélé une forte présence de thymol (48,99%), suivi de p -cymène (15,94%) et de limonène (15,41%). Par contre l'HE de *S. Satureioides* s'est révélé plus riche en bornéol (27,36%) suivi du thymol (20,01%) et de α -terpinéol (19,38%). Ces résultats sont en accord avec les études antérieures sur le plan qualitatif.

Tableau 2: Composition chimique des huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata*, d'*Origanum glandulosum* et de *S. satureioides*.

#	Component	nRI	pRI	<i>O. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>S. satureioides</i>	ID
1	<i>alpha</i> -Thujène	922	1023	1,03	0,57	0,56	RI, MS
2	<i>alpha</i> -Pinène	931	1022	0,68	0,89	3,54	RI, MS
3	Camphène	943	1066	1,52	-	8,25	RI, MS
4	Sabinène	964	1120	-	-	1,33	RI, MS
5	<i>beta</i> -Pinène	970	1110	0,32	0,09	0,71	RI, MS
6	Myrcène	979	1159	1,63	0,66	0,96	RI, MS
7	<i>alpha</i> -Terpinène	1008	1178	2,57	0,65	0,55	RI, MS
8	<i>para</i> -Cymène	1011	1268	18,33	15,94	3,78	RI, MS
9	Limonène	1020	1199	0,45	15,41	0,92	RI, MS
10	<i>gamma</i> -Terpinène	1047	1243	24,36	7,01	1,53	RI, MS
11	Linalool	1081	1544	0,96	0,23	2,74	RI, MS
12	Camphor	1123	1517	-	-	0,12	RI, MS
13	Borneol	1148	1698	0,08	-	27,36	RI, MS
14	Terpinen-4-ol	1161	1600	0,26	0,24	0,98	RI, MS
15	<i>alpha</i> -Terpinéol	1179	1700	0,27	0,08	19,38	RI, MS
16	Thymol	1266	2189	38,36	48,99	20,01	RI, MS
17	Carvacrol	1278	2219	2,94	4,08	2,01	RI, MS
18	<i>beta</i> -Caryophyllène	1424	1591	0,98	-	0,23	RI, MS
19	<i>alpha</i> -Humulène	1456	1605	0,07	-	0,09	RI, MS
20	<i>beta</i> -Sesquiphellandrène	1516	1765	0,86	-	-	RI, MS
Total (%)				95,67	94,84	95,05	
Monoterpènes hydrocarbonés				50.89	41.22	22.13	
Monoterpènes oxygénés				42.87	53.62	72.60	
Sesquiterpènes hydrocarbonés				1.91	-	0.32	

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) de composants pour les HEs d'*O. glandulosum*, d'*A. verticillata* et de *S. satureioides*. Les pourcentages et l'ordre d'éluion des composants individuels sont donnés sur colonne non polaire. Les indices de rétention nRI et pRI sont respectivement donnés sur colonne non polaire et polaire. L'identification (ID) est réalisée par la comparaison des indices de rétention (RI) et des spectres de masse (MS).

En effet, pour l'HE d'origan, **Bekhechi et al. (2008)** et **Nabti et al. (2020)** ont trouvés les mêmes composés majoritaires alors, que d'autres ont trouvé le carvacrol comme composé majoritaire (**Ruberto et al., 2002; Nabti et al., 2020**). Une autre étude réalisée sur des HEs d'*O. glandulosum* provenant de trois stations tunisiennes a révélé la présence de *p*-cymène (36%- 46%) et de thymol (32%-18%) (**Mechergui et al., 2010**).

Concernant l'HE d'*A. verticillata*, les résultats obtenus sont cohérents avec ceux trouvés par **Attou et al. (2019)**. Une étude plus récente effectuée par **Senouci et al. (2020b)** a montré une concentration élevée de carvacrol (44,3%), de limonène (19,3%) et de *p*-cymène (19,2%). Une autre étude menée par **Tefiani et al. (2015)** a identifié l'alcool de cumin (44%), le *p*-cymène (18%) et le limonène (14%) comme les principaux constituants de l'huile.

Pour l'HE de *S. satureioides*, les résultats trouvés corroborent ceux rapportée dans la littérature (**Bendahou et al., 2008**). En revanche, l' α -terpinéol a été détecté comme le constituant principal dans d'autres échantillons (**Biondi et al., 2006**). De plus, **Ammar et al. (2020)** ont rapporté des quantités comparables de thymol et d' α -terpinéol (25,6% et 24,6% respectivement).

La composition chimique entre les spécimens de la même espèce peut varier selon plusieurs facteurs, notamment l'origine géographique, les conditions climatiques, la saison et la partie de la plante (**Swamy et al., 2016**).

6. Activité antifongique des huiles essentielles

Les HEs d'*O. glandulosum*, d'*A. verticillata* et de *S. satureioides* ont été testées pour leur efficacité antifongique contre les souches cliniques de *Candida* spp. isolées, ainsi que la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231.

Les résultats sont présentés dans le **tableau 3** et illustrés par les **figures 20 ; 21** et la **photo 6**. Les données de diamètre de zone d'inhibition ont été soumises au test de normalité de Shapiro-Wilk, qui a révélé que les résultats n'étaient pas normalement distribués ($p < 0,05$). Par conséquent, le test de Kruskal-Wallis non paramétrique a été utilisé. Toutes les souches isolées étaient sensibles aux trois HEs. L'HE d'*O. glandulosum* s'est révélée la plus active, avec des zones d'inhibition allant de 28 mm à 37 mm contre *C. albicans* et de 21 mm à 35 mm contre *C. glabrata*. L'HE d'*A. verticillata* a également montré une activité antifongique contre *C. albicans* avec des zones d'inhibition de 18 mm à 36 mm, et de 14 mm et 24 mm contre *C. glabrata*. Concernant l'HE de *S. satureioides*, elle a également démontré une bonne activité antifongique où les zones d'inhibition variaient de 11 mm à 25 mm contre *C. albicans* et de 14 mm à 22 mm contre *C. glabrata*. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes ($p > 0,05$).

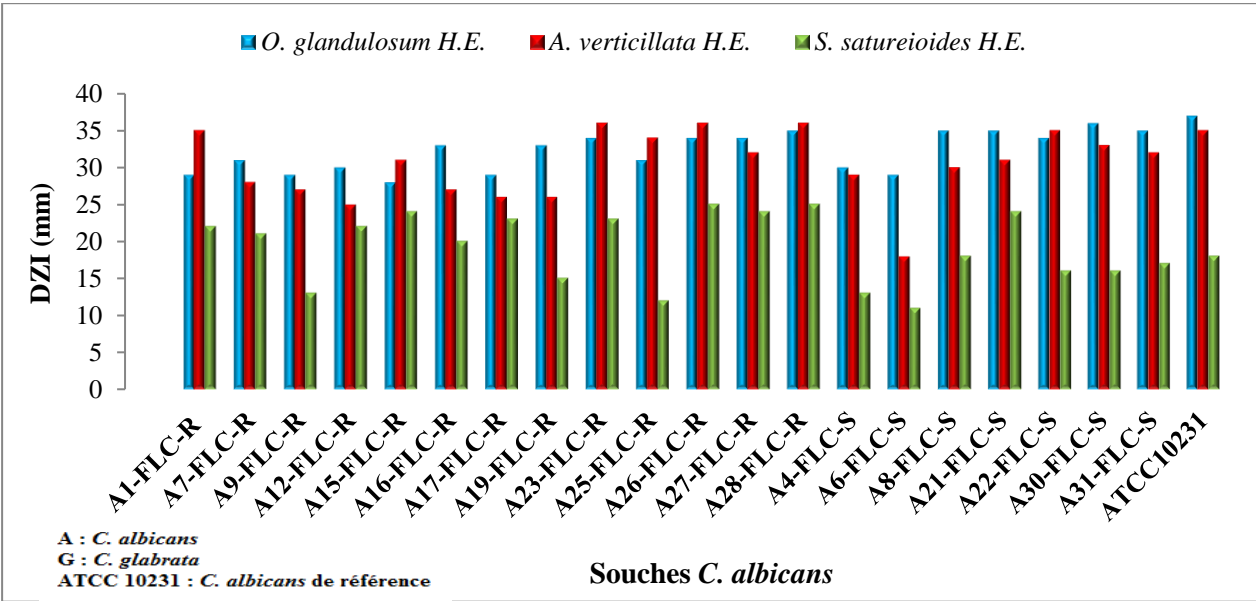


Figure 20: Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles sur *C. albicans* par diffusion sur disque

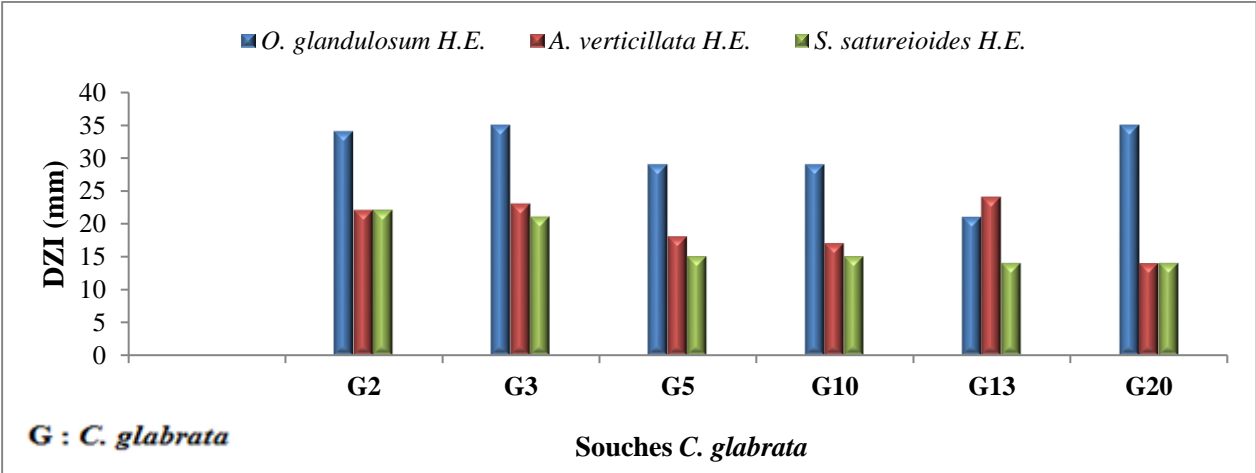


Figure 21: Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles sur *C. glabrata* par diffusion sur disque



O. glandulosum

A. verticillata

S. saturoioides

Photo 6: Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches *Candida*

Tableau 3: CMI, CMF, et CMF/CMI ($\mu\text{g/mL}$) des huiles essentielles contre *C. albicans* et *C. glabrata*.

Souches	<i>O. glandulosum</i>			<i>A. verticillata</i>			<i>S. satureioides</i>			
	CMI	CMF	CMF/CMI	MIC	CMF	CMF/CMI	CMI	CMF	CMF/CMI	
<i>C. albicans</i> FLC-R	A1	500	500	1	250	250	1	500	1000	2
	A7	250	250	1	250	250	1	500	1000	2
	A9	250	250	1	250	250	1	1000	1000	1
	A12	250	250	1	250	250	1	500	500	1
	A15	250	250	1	250	250	1	500	500	1
	A16	250	250	1	250	250	1	500	1000	2
	A17	250	250	1	250	250	1	500	1000	2
	A19	250	250	1	250	250	1	1000	2000	2
	A23	250	250	1	250	250	1	500	1000	2
	A25	250	250	1	250	250	1	1000	1000	1
	A26	250	250	1	250	250	1	500	500	1
	A27	250	250	1	250	250	1	500	500	1
	A28	250	250	1	250	250	1	500	1000	2
	<i>C. albicans</i> FLC-S	A4	250	250	1	250	250	1	1000	1000
A6		250	250	1	500	500	1	1000	1000	1
A8		250	250	1	250	250	1	500	500	1
A21		250	250	1	250	500	2	500	1000	2
A22		250	250	1	250	500	2	500	500	1
A30		250	250	1	250	250	1	500	500	1
A31		250	250	1	250	250	1	500	500	1
ATCC		250	250	1	250	250	1	500	500	1
<i>C. glabrata</i> FLC-S	G2	250	500	2	500	500	1	500	500	1
	G3	250	250	1	500	500	1	500	500	1
	G5	500	500	1	500	500	1	500	1000	2
	G10	250	500	2	500	500	1	500	500	1
	G13	500	500	1	250	500	2	500	1000	2
	G20	250	500	2	500	500	1	500	500	1

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CMF : Concentration minimale fongicide.

A: *C. albicans*.

G: *C. glabrata*.

***C. albicans* FLC-R** : *Candida albicans* résistante au fluconazole.

***C. albicans* FLC-S** : *Candida albicans* sensible au fluconazole.

***C. glabrata* FLC-S** : *Candida glabrata* sensible au fluconazole.

Les valeurs de CMI des HEs d'*A. verticillata* et d'*O. glandulosum* étaient comprises entre 250 et 500 $\mu\text{g/mL}$, tandis que celles de l'HE de *S. satureioides* se situaient dans les limites de 500 à 1000 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats du rapport CMF/CMI ont démontré que les trois HEs ont exercé un effet fongicide contre toutes les souches testées. Selon **Alijiannis et al. (2001)**, une HE avec une valeur

de CMI allant jusqu'à 500 µg/mL est considéré comme un agent antimicrobien fort, tandis que des valeurs comprises entre 600 et 1500 µg/mL indiquent un agent modéré et que des valeurs dépassant 1600 µg/mL indiquent un agent faible. Par conséquent, les HEs étudiées peuvent être considérées comme ayant une forte activité antifongique. À ce jour, seules quelques études ont porté sur le potentiel anticandidosique de ces HEs. **Bendahou et al. (2008)** ont étudié l'activité anticandidosique de l'HE d'*O. glandulosum* en Algérie contre les souches de référence de *C. albicans* IPP 444 et *C. albicans* 9036 et ont trouvé une activité anticandidosique très forte avec des valeurs de CMI de 36 et 57 µg/mL, respectivement. Pour l'HE d'*A. verticillata*, **Attou et al. (2019)** ont rapporté qu'une concentration de 0,78 µL/mL pouvait inhiber la croissance de *C. albicans* ATCC 10231. En ce qui concerne l'HE de *S. satureioides*, **Bendahou et al. (2008)** ont rapporté une valeur de CMI de 5316 µg/mL contre une souche clinique de *C. albicans*. La variabilité de la puissance antifongique entre les HEs de la même espèce végétale peut être attribuée à des facteurs saisonniers et géographiques (**Celiktas et al., 2007**). La comparaison de la susceptibilité des souches de *C. albicans* sensibles et résistantes au fluconazole aux HEs étudiées n'a montré aucune différence significative entre elles. Ce résultat suggère que le mécanisme d'action des trois HEs est indépendant des changements associés à la résistance au fluconazole.

7. Effet des huiles essentielles et de l'amphotéricine B sur le développement des biofilms.

Dans cette étude, nous avons étudié l'efficacité des trois HEs et de l'amphotéricine B pour inhiber la formation de biofilms de *C. albicans* et *C. glabrata*. Les résultats sont présentés dans le **tableau 4** et illustrés par la **photo 7**.

On remarque que les HEs à une concentration de 500µg/mL sont efficaces pour inhiber la formation de biofilms mono-espèce de *C. albicans* et *C. glabrata*. De plus, aux concentrations de 500µg/mL et 1000µg/mL, les HEs ont été capables de prévenir la formation de biofilm mixte, même si certaines études ont rapporté que la présence des deux espèces ensemble dans un biofilm renforce leur résistance par rapport à leur croissance séparée (**Silva et al., 2013**). Les CMIBs pour l'amphotéricine B était de 2 et 4 µg/mL pour les biofilms mono-espèce de *C. glabrata* et *C. albicans*, respectivement, ce qui est 8 fois plus élevé que leurs CMI. Pour le biofilm mixte, la CMIB était de 4 µg/mL.

Tableau 4: Effets des huiles essentielles étudiées et de l'amphotéricine B sur des biofilms mono-espèce et mixtes de *C. albicans* et *C. glabrata* (en µg/mL).

		A22	G20	A22+G20
CMIBs	<i>O. glandulosum</i>	500	500	500
	<i>A. verticillata</i>	500	500	500
	<i>S. satureioides</i>	500	500	1000
	Amphotericin B	4	2	4
CMEBs	<i>O. glandulosum</i>	1000	1000	1000
	<i>A. verticillata</i>	1000	1000	1000
	<i>S. satureioides</i>	1000	1000	1000
	Amphotericin B	4	2	4

CMIBs : Concentrations minimales inhibitrice de biofilm.

CMEBs : Concentrations minimales éradicatrice de biofilm.

A22: *C. albicans*22.

G20: *C. glabrata*20.

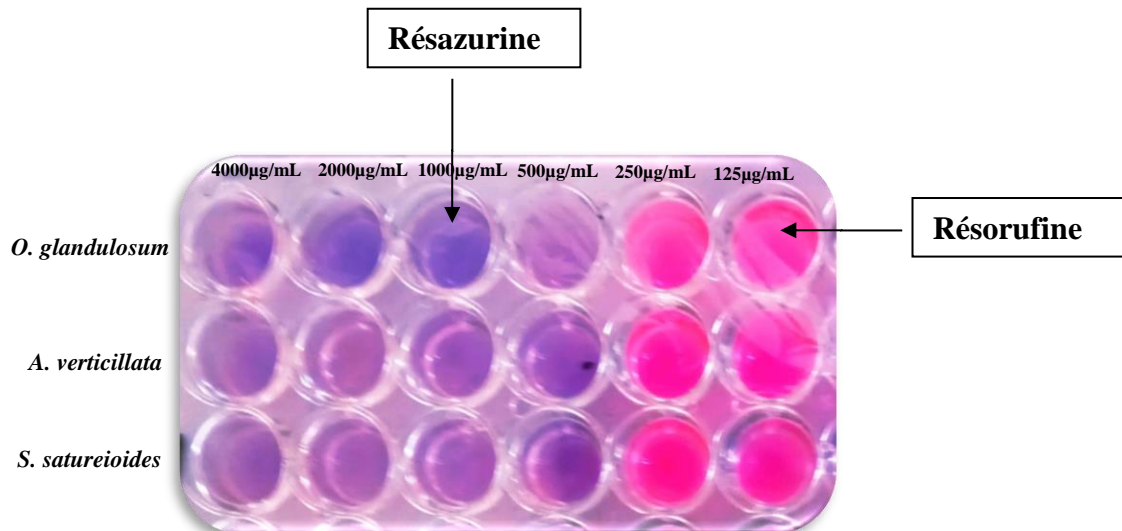


Photo 7: Effet des huiles essentielles étudiées sur les biofilms de *Candida*

Ces résultats intéressants peuvent être attribués à la richesse des huiles en monoterpènes oxygénés tel que le thymol, qui sont connus pour leur potentiel d'inhibition de biofilm (Braga et al., 2008; Karpinski et al., 2021). Les mécanismes précis de l'inhibition de biofilm induite par les terpénoïdes restent encore mal compris. Il est spéculé que les extraits de plantes ou les molécules peuvent agir en réprimant des gènes spécifiques tels que ALS1, ALS3 (Agglutinin-like sequence) et HWP1 (Hyphal wall protein 1) qui sont importants pour la formation de biofilm (Raut et al., 2013).

Un rapport antérieur a démontré que le farnésol, un composé terpénoïde produit par *C. albicans* et les plantes, inhibait la germination des cellules de levure en mycélium et la formation de biofilm. Le farnésol supprime l'expression des gènes spécifiques tels que HWP1 nécessaire à la formation du biofilm (**Ramage et al., 2002**). De même, **Hsu et al. (2013)** ont démontré que le linalol, un alcool terpénique, bloque la formation de biofilm de *C. albicans* en interférant avec le changement morphologique. En outre, dans une étude récente menée par **Benzaid et al. (2019)**, il a été indiqué que l'HE de *Mentha × piperita* était capable de diminuer l'expression de HWP1, ce qui empêche la formation de biofilm par *C. albicans*.

8. Effet des huiles essentielles et de l'amphotéricine B sur les biofilms préformés.

Nous avons étudié la capacité des trois HEs à éradiquer les biofilms mono-espèce et mixte préformés (**tableau 4**). Les trois HEs ont montré des effets éradicatifs contre les biofilms. Les valeurs CMEBs des trois HEs étaient de 1000 µg/mL. Les valeurs CMEB d'amphotéricine B pour les biofilms mono-espèce et mixte étaient similaires à leurs valeurs CMIBs. Il est communément admis que les biofilms préformés sont hautement résistants aux antifongiques conventionnels (**Braga et al., 2008**).

Dans notre étude, les HEs étudiées se sont révélées efficaces pour perturber les biofilms préformés. Cependant, l'activité d'éradication des biofilms de ces huiles était moins efficace que l'inhibition de la formation de biofilms. Une explication possible pourrait être attribuée à l'effet de la matrice extracellulaire qui restreint l'entrée des agents antimicrobiens dans le biofilm. Cela pourrait être principalement dû à l'absorption ou à la réaction de l'agent antimicrobien dans les composants de la matrice extracellulaire et à la limitation de la diffusion due à la structure tridimensionnelle de la matrice du biofilm. Par conséquent, l'agent antimicrobien ne peut pas atteindre les cellules fongiques les plus internes du biofilm (**Chatrath et al., 2019**). La perturbation des biofilms préformés par l'HE d'*O. glandulosum* a également été confirmée par des observations microscopiques. Comme indiqué dans la **photo 8**, le biofilm de contrôle de *C. albicans* était composé de cellules de levure, de pseudohyphes et d'hyphes. En revanche, le biofilm développé par *C. glabrata* était exclusivement composé de cellules de levure. Des résultats similaires ont été rapportés par **Seneviratne et al. (2009)**. Les images MEB ont également confirmé l'interaction synergique entre les deux espèces dans le biofilm mixte. Ce résultat était en accord avec ceux de **Silva et al. (2013)** et **Pesee et al. (2016)**. Le traitement des biofilms préformés avec la CMI de l'HE d'*O. glandulosum* a montré une diminution de l'agrégation des cellules des biofilms mono-espèces et mixte.

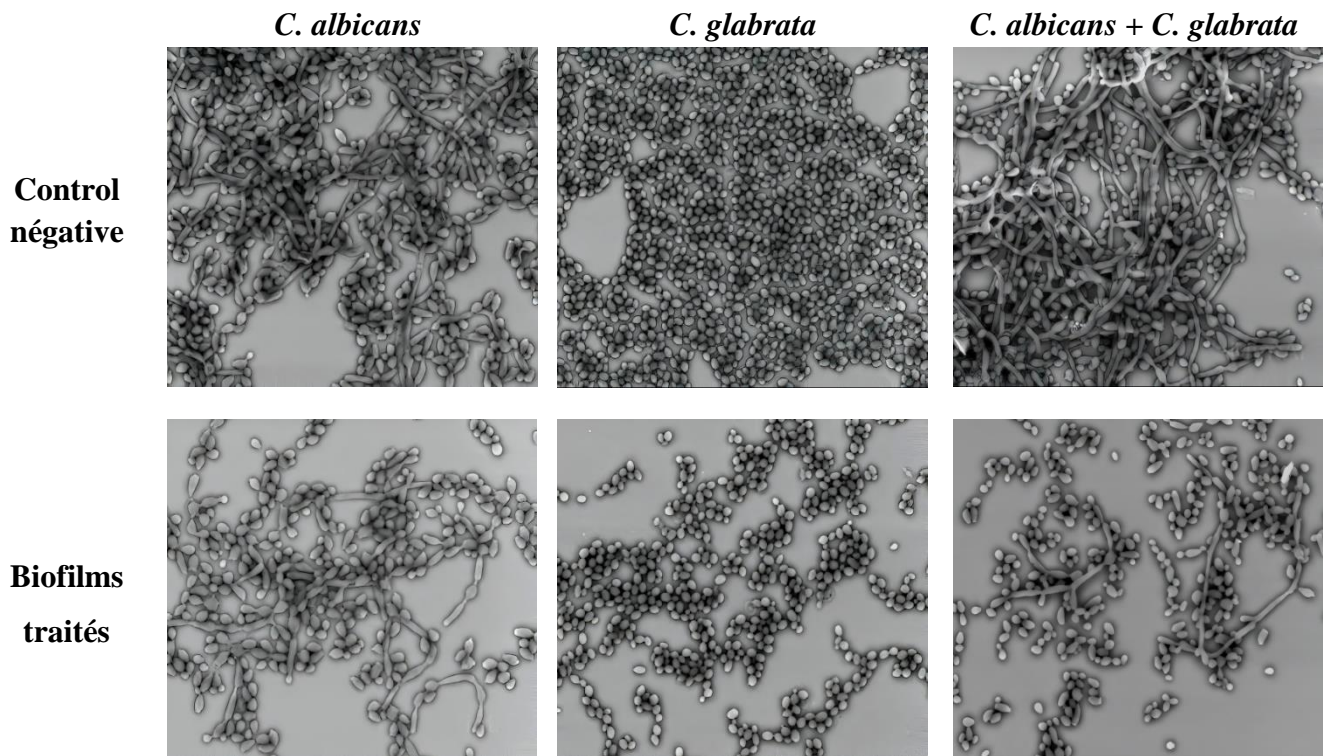


Photo 8: Les images MEB de l'effet d'huile essentielle d'*O. glandulosum* à 1× CMI sur les biofilms mono-espèce et mixte préformés de *C. albicans* et *C. glabrata*

9. Effet synergique des huiles essentielles combinées à l'amphotéricine B contre les souches planctoniques de *Candida albicans* et *Candida glabrata*.

La présente étude avait pour objectif d'explorer l'effet synergique des HEs combinées à l'amphotéricine B contre *C. albicans* A22 et *C. glabrata* G20. Les résultats sont présentés dans le **tableau 5**. On remarque que la combinaison de l'HE d'*O. glandulosum* avec l'amphotéricine B présentait un effet synergique contre *C. albicans*, avec une valeur d'ICIF de 0,50. De plus, la combinaison de l'HE d'*A. verticillata* avec l'amphotéricine B contre *C. albicans* et *C. glabrata* a démontré un effet additif avec une valeur d'ICIF de 0,75. Par ailleurs, un effet additif a été observé lorsque l'HE de *S. satureioides* a été combinée à l'amphotéricine B contre *C. albicans* (ICIF=0.75). Cependant, les HEs d'*O. glandulosum* et de *S. satureioides* ont présenté des effets indifférents avec l'amphotéricine B contre *C. glabrata*, avec des valeurs d'ICIF de 1,248 et 3, respectivement. Aucune combinaison n'a été trouvée pour être antagoniste.

Tableau 5: Résultats de la combinaison des huiles essentielles avec l'amphotéricine B.

Huile essentielle		A22	G20
<i>O. glandulosum</i>	CIF d' <i>O. glandulosum</i>	0.25	1
	CIF d'amphotéricin B	0.25	0.248
	ICIF	0.50	1.248
	Interprétation	Synergique	Indifférent
<i>A. verticillata</i>	CIF d' <i>A. verticillata</i>	0.50	0.25
	CIF d'amphotéricin B	0.25	0.50
	ICIF	0.75	0.75
	Interprétation	Additif	Additif
<i>S. satureioides</i>	CIF de <i>S. satureioides</i>	0.25	2
	CIF d'amphotéricin B	0.50	1
	ICIF	0.75	3
	Interprétation	Additif	Indifférent

CIF: Concentration inhibitrice fractionnaire.

ICIF: Indice de concentration inhibitrice fractionnaire.

A22: *C. albicans*22.

G20: *C. glabrata*20.

Notre étude est particulièrement significative étant donné que l'amphotéricine B est considérée comme le médicament de choix pour le traitement de la candidose, mais son application clinique est limitée en raison de sa toxicité. La thérapie combinatoire avec les HEs a été proposée comme une stratégie alternative pour minimiser ses effets secondaires toxiques. Les résultats obtenus suggèrent que la combinaison de l'HE *O. glandulosum* et de l'amphotéricine B pourrait constituer une approche thérapeutique potentielle pour le traitement de la candidose.

La nature hydrophobe des composants des HEs jouerait un rôle clé dans l'amélioration de l'activité antibiotique. Ces composants ont la capacité d'interagir avec les lipides membranaires, ce qui conduit à la perturbation de la structure cellulaire et à l'augmentation de la perméabilité membranaire. Ainsi, les antibiotiques peuvent plus facilement traverser la barrière membranaire et présenter une activité antimicrobienne accrue, même à des concentrations plus faibles (**Saad et al., 2010; Sikkema et al., 1995**).

Conclusion générale

La candidose orale est devenue une préoccupation majeure en Algérie, notamment chez les patients immunodéprimés. L'émergence de cette infection fongique est exacerbée par la rupture des stocks de l'amphotéricin B (Fungizone[®]), l'antifongique le plus largement utilisé, ainsi que par l'émergence de résistance aux autres antifongiques disponibles. Cette situation a conduit à la nécessité d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de cette infection. Dans ce contexte, l'objectif fondamental de cette thèse était d'explorer l'effet des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques et médicinales endémiques algériennes (*Origanum glandulosum*, *Ammoïdes verticillata* et *Saccocalyx satureioides*) sur les souches de *Candida*, dans le dessein de proposer une alternative novatrice aux antifongiques conventionnels pour le traitement de la candidose orale.

Au cours de cette étude, nous avons identifié un total de 27 souches de *Candida*, avec une prévalence dominante de *C. albicans*, représentant 74,07% (20 souches) des souches isolées. Nous avons également observé la présence de *C. glabrata* avec 22,22% (06 souches) et *C. Krusei* avec 3,70% (01 souche). En ce qui concerne la sensibilité aux antifongiques, nous avons observé que toutes les souches des trois espèces de *Candida* étaient sensibles à l'amphotéricine B, ce qui suggère son efficacité potentielle pour le traitement de la candidose orale. La caspofungine s'est également révélée efficace contre les souches isolées, ce qui en fait une option précieuse dans le traitement de cette affection. Cependant, 65 % des souches de *C. albicans* étaient résistantes au fluconazole, qui est un antifongique largement utilisé dans le traitement de la candidose orale. Cette résistance peut être préoccupante, car elle limite les options thérapeutiques disponibles et souligne la nécessité de trouver des alternatives efficaces.

L'évaluation de la formation de biofilm des souches de *Candida* a révélé que toutes les souches avaient la capacité de produire un biofilm, mais à des niveaux différents. La majorité des souches de *C. albicans* (76,19 %) était faiblement productrice de biofilm, tandis que 23,80 % étaient modérément productrices de biofilm. Toutes les souches de *C. glabrata* étaient faiblement productrices de biofilm. De plus, nous avons observé que la culture mixte de *C. albicans* et *C. glabrata* produisait une biomasse de biofilm plus importante que les biofilms formés par chaque espèce individuellement.

L'analyse chimique des huiles essentielles a révélé une prédominance de thymol dans les huiles essentielles d'*O. glandulosum* (38,36%), *A. verticillata* (48,99%) et *S. satureioides* (20,01%) reconnu comme un phénol doué d'activités biologiques.

Les tests *in vitro* ont clairement montré que les trois HEs testées présentaient une activité inhibitrice sur toutes les souches de *Candida*. Les HEs d'*O. glandulosum* et d'*A. verticillata* ont enregistré des zones d'inhibition allant de 14 mm à 37 mm, alors que l'HE de *S. saturoioides* a enregistré des diamètres d'inhibition de 11 mm à 25 mm.

Les HEs étudiées ont exhibé une forte activité envers *C. albicans* et *C. glabrata* à l'état planctonique, avec des CMI variant de 250 à 1000 µg/mL. Leur action s'est également manifestée contre la formation de biofilms, avec des CMIBs allant de 500 à 1000 µg/mL. De plus, ces huiles ont démontré une capacité d'éliminer les biofilms préformés, avec des CMEBs de 1000 µg/mL.

L'association des HEs avec l'amphotéricine B a révélée des interactions variables, incluant des effets synergiques, additifs et indifférents, selon la souche de *Candida* testée. Une seule interaction synergique a été observée lorsque l'amphotéricine B a été combinée avec l'HE d'*O. glandulosum*, avec une ICFI égale à 0,5.

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage a permis d'observer une désorganisation de la formation du réseau cellulaire par la diminution de l'agrégation des cellules dans les biofilms préformés traités avec l'HE d'*O. glandulosum*.

À la lumière des résultats obtenus, il est crucial de poursuivre la recherche sur les HEs étudiées et autres extraits de plantes dans le traitement de la candidose orale. Des études *in vivo* sont nécessaires pour évaluer leurs efficacités dans un modèle animal, tout en approfondissant les études sur leurs toxicités afin d'assurer leurs sécurités à long terme. Une fois leurs efficacités établies, il serait essentiel de développer des produits à base de ces huiles, tels que des gels, des suspensions buccales ou des pastilles à sucer. Des essais cliniques contrôlés et randomisés sont indispensables pour confirmer l'efficacité des HEs.

Références bibliographiques

1. Adams, R. P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured publishing corporation.
2. Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2010). Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, 81(8), 1157–1162.
3. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170.
4. Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2004). Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), 3291-3297.
5. Alkhars, N., Gaca, A., Zeng, Y., Al-Jallad, N., Rustchenko, E., Wu, T.T., Eliav, E. and Xiao, J. (2023). Antifungal Susceptibility of Oral *Candida* Isolates from Mother-Infant Dyads to Nystatin, Fluconazole, and Caspofungin. *Journal of Fungi*, 9(5), 580.
6. Almeida, L. d. F. D. d., Paula, J. F. d., Almeida, R. V. D. d., Williams, D. W., Hebling, J., & Cavalcanti, Y. W. (2016). Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(5), 393-398.
7. Amerongen, A. N., & Veerman, E. (2002). Saliva—the defender of the oral cavity. *Oral diseases*, 8(1), 12-22.
8. Ammar, S., Noui, H., Djamel, S., Madani, S., Maggi, F., Bruno, M., Romano, D., Canale, A., Pavela, R., & Benelli, G. (2020). Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides? *Environmental science and pollution research*, 27, 26594-26604.
9. Akpan, A., & Morgan, R. (2002). Oral candidiasis. *Postgraduate medical journal*, 78(922), 455-459.
10. Attou, A., Davenne, D., Benmansour, A., & Lazouni, H. (2019). Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie*, 17(1), 2-8.

11. Arastehfar, A., Daneshnia, F., Farahyar, S., Fang, W., Salimi, M., Salehi, M., Hagen, F., Pan, W., Roudbary, M., & Boekhout, T. (2019). Incidence and spectrum of yeast species isolated from the oral cavity of Iranian patients suffering from hematological malignancies. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1601061.
12. Bahmani, M., Khaksarian, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2018). Overview of the therapeutic effects of *Origanum vulgare* and *Hypericum perforatum* based on Iran's ethnopharmacological documents. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 12(7), FE01--FE04.
13. Baillie G.S. and Douglas L. J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 48 : 671-679.
14. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
15. BEKHCHI, C. (2002). *Analyse de l'huile essentielle d'Ammoides verticillata de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien* [Thèse de magister, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen].
16. Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oils contained in Algerian *Origanum glandulosum* (Desf.). *Phytothérapie*, 6, 153-159.
17. Bekhechi, C., Boti, J. B., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Casanova, J., & Tomi, F. (2010). Isothymol in Ajowan essential oil. *Natural Product Communications*, 5(7), 1934578X1000500726.
18. Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A. C., Santos, P. A., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2005). *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and fragrance journal*, 20(2), 209-212.
19. Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., Bendahou, M., Muselli, A., & Costa, J. (2014). Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus*

faecalis in both planktonic and biofilm state. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(6), 463-472.

20. Bendahou, M., Benyoucef, M., Muselli, A., Desjobert, J.M., Paolini, J., Bernardini, A.F., & Costa, J. (2008b). Antimicrobial activity and chemical composition of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. essential oil and extract obtained by microwave extraction. Comparison with hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 20(2), 174-178.
21. Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.-M., Bernardini, A.-F., & Costa, J. (2008a). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132-139.
22. Benyoucef, F., Dib, M. E., Tabti, B., Zoheir, A., Costa, J., & Muselli, A. (2020). Synergistic effects of essential oils of *Ammoides verticillata* and *Satureja candidissima* against many pathogenic microorganisms. *Anti-Infective Agents*, 18(1), 72-78.
23. Benzaid, C., Belmadani, A., Djeribi, R., & Rouabhia, M. (2019). The effects of *Mentha × piperita* essential oil on *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and the expression of secreted aspartyl proteinases genes. *Antibiotics*, 8(1), 10.
24. Berkow, E. L., & Lockhart, S. R. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*, 10, 237–245.
25. Bhattacharya, R., Rolta, R., Dev, K., & Sourirajan, A. (2021). Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal pathogens: Present status and future perspectives. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6089-6100.
26. Biasoli, M. S., Tosello, M. E., & Magaró, H. M. (2002). Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses*, 45(11-12), 465-469.
27. Biondi, D. M., Sari, M., Ghani, Z. A., & Ruberto, G. (2006). Essential oil of Algerian *Saccocalyx satureioides* Coss. et Durieu. *Flavour and fragrance journal*, 21(3), 546-548.

28. Braga, P. C., Culici, M., Alfieri, M., & Dal Sasso, M. (2008). Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 31(5), 472-477.
29. Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., & Medoff, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), 183-188.
30. Butticaz, G., Zulian, G. B., Preumont, M., & Budtz-Jørgensen, E. (2003). Evaluation of a Nystatin-Containing Mouth Rinse for Terminally Ill Patients in Palliative Care. *Journal of Palliative Care*, 19(2), 95-99.
31. Cappelletty, D., & Eiselstein-McKittrick, K. (2007). The echinocandins. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 27(3), 369-388.
32. Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in medicine*, 5, 28.
33. Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553-559.
34. Chaturvedi, V., Ramani, R., Andes, D., Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Ghannoum, M. A., Knapp, C., Lockhart, S. R., Ostrosky-Zeichner, L., & Walsh, T. J. (2011). Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(4), 1543-1548.
35. Chatrath, A., Gangwar, R., Kumari, P., & Prasad, R. (2019). In vitro anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. *Journal of Fungi*, 5(1), 13.
36. Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B., & Wang, Y. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology*, 62(8), 1175-1183.

37. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. Document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; USA
38. Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., Lindemann, M. J., Ho, A. W., Hai, J. H., Yu, J. J., & Jung, J. W. (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(2), 299-311.
39. Costerton, J. W., Cheng, K., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 435–464.
40. Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J. C., & Ruiz-Baca, E. (2012). *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiology*, 7(6), 755-771.
41. Cuenca-León, K., Pacheco-Quito, E.-M., Granda-Granda, Y., Vélez-León, E., & Zarzuelo-Castañeda, A. (2022). Phytotherapy: A Solution to Decrease Antifungal Resistance in the Dental Field. *Biomolecules*, 12(6), 789.
42. Da Nóbrega Alves, D., Monteiro, A. F. M., Andrade, P. N., Lazarini, J. G., Abílio, G. M. F., Guerra, F. Q. S., Scotti, M. T., Scotti, L., Rosalen, P. L., & Castro, R. D. d. (2020). Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. *Molecules*, 25(24), 5969.
43. Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.
44. De Castro, R. D., De Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., De Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-7.

45. De Groot, P. W., Bader, O., De Boer, A. D., Weig, M., & Chauhan, N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell*, 12(4), 470-481.
46. De-La-Torre, J., Ortiz-Samperio, M. E., Marcos-Arias, C., Marichalar-Mendía, X., Eraso, E., Echebarria-Goicouria, M. Á., & Aguirre-Urizar, J. M. (2017). In Vitro Antifungal Susceptibility of Oral *Candida* Isolates from Patients Suffering from Caries and Chronic Periodontitis. *Mycopathologia*, 182(5–6), 471–485.
47. Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
48. Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1), 30-36.
49. Dos Santos Abrantes, P. M., McArthur, C. P., & Africa, C. W. J. (2014). Multi-drug resistant oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(2), 222-227.
50. Dumitru, R., Hornby, J. M., & Nickerson, K. W. (2004). Defined Anaerobic Growth Medium for Studying *Candida albicans* Basic Biology and Resistance to Eight Antifungal Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2350–2354.
51. El-Tarabily, K. A., El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Elwan, H. A., Elnesr, S. S., & Abd El-Hack, M. E. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5145-5156.
52. El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., & Renaud, F. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
53. Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5), 990-1004.

54. Fanello, S., Bouchara, J., Sauteron, M., Delbos, V., Parot, E., Marot-Leblond, A., Moalic, E., Flohic, A. M. L., & Brangerd, B. (2006). Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *Journal of Medical Microbiology*, 55(2), 223–228.
55. Fang, J., Huang, B., & Ding, Z. (2021). Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 125(2), 257–265.
56. Ferreira, E. d. S., Rosalen, P. L., Benso, B., de Cassia Orlandi Sardi, J., Denny, C., Alves de Sousa, S., Queiroga Sarmiento Guerra, F., de Oliveira Lima, E., Almeida Freires, I., & Dias de Castro, R. (2021). The use of essential oils and their isolated compounds for the treatment of oral candidiasis: a literature review. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2021, 1–16.
57. Fikry, S., Khalil, N., & Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*, 9(1), 1-10.
58. Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
59. Furletti, V., Teixeira, I., Obando-Pereda, G., Mardegan, R., Sartoratto, A., Figueira, G., Duarte, R., Rehder, V., Duarte, M., & Höfling, J. (2011). Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–9.
60. Gao, S., Liu, G., Li, J., Chen, J., Li, L., Li, Z., Zhang, X., Zhang, S., Thorne, R. F., & Zhang, S. (2020). Antimicrobial activity of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and its active component citral against dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 603858.
61. Garcia-Cuesta, C., Sarrion-Pérez, M.-G., & Bagán, J. V. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of Clinical and Experimental dentistry*, 6(5), e576.

62. Gheorghe, D. C., Niculescu, A.-G., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Biomaterials for the prevention of oral candidiasis development. *Pharmaceutics*, 13(6), 803.
63. Gil-Alonso, S., Jauregizar, N., Eraso, E., & Quindós, G. (2015). Postantifungal effect of micafungin against the species complexes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *PLoS one*, 10(7), e0132730.
64. Gil-Alonso, S., Jauregizar, N., Eraso, E., & Quindós, G. (2016). Postantifungal effect of caspofungin against the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* clades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(2), 172-177.
65. González, G. M., Elizondo, M., & Ayala, J. (2008). Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *Journal of clinical microbiology*, 46(9), 2902-2905.
66. Guignard, J. (1996). *Abrégés en botanique*. 10^e éd, Masson, Paris. 278 p
67. Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310-321.
68. Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73, 919-934.
69. Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2016). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352–358.
70. Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 3914-3922.
71. Hawser, S. P., & Douglas, L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9), 2128-2131.

72. Hellfritzschi, M., Pottgård, A., Pedersen, A. J. T., Burghle, A., Mouaanaki, F., Hallas, J., Grove, E. L., & Damkier, P. (2017). Topical antimycotics for oral candidiasis in warfarin users. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120(4), 368-372.
73. Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15(8), 639-652.
74. Heredero-Bermejo, I., Gómez-Casanova, N., Quintana, S., Soliveri, J., De La Mata, F. J., & Copa-Patiño, J. L. (2020). In vitro activity of carbosilane cationic dendritic molecules on prevention and treatment of *Candida albicans* biofilms. *Pharmaceutics*, 12(10), 918.
75. Hu, L., He, C., Zhao, C., Chen, X., Hua, H., & Zhang, Y. (2019). Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103575.
76. Hsu, C. H., Lai, W., Chuang, K., Lee, M., & Tsai, Y. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 51(5), 473-482.
77. Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A. and Meiller T.F. (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 14-19.
78. İşcan, G., İşcan, A., & Demirci, F. (2016). Anticandidal effects of thymoquinone: Mode of action determined by transmission electron microscopy (TEM). *Natural Product Communications*, 11(7), 1934578X1601100726.
79. Jafri, H., & Ahmad, I. (2020). *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de mycologie Medicale*, 30(1), 100911.
80. Jayatilake, J., Samaranayake, Y., Cheung, L., & Samaranayake, L. (2006). Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *Journal of oral pathology & medicine*, 35(8), 484-491.

81. Khan, M. S. A., Malik, A., & Ahmad, I. (2012). Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 50(1), 33-42.
82. König, W. A., Joulain, D., & Hochmuth, D. H. (2004). Terpenoids and related constituents of essential oils. *Library of MassFinder*, 2.
83. Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Zhanel, G. G., & Goldstein, B. P. (2006). In vitro interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. *International journal of antimicrobial agents*, 27(2), 174-177.
84. Katiraei, F., Khosravi, A. R., Khalaj, V., Hajiabdolbaghi, M., Khaksar, A. A., Rasoulinejad, M., & Nejad, M. S. Y. (2010). Oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected individuals in Iran. *Tehran University Medical Journal*, 68(1).
85. Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(19), 5678-5698.
86. Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlaisavljevic, S., & Trivic, S. (2011). Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*, 16(9), 7401-7414.
87. Karpinski, T. M., Ozarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Wolski, H., & Adamczak, A. (2021). plant preparations and compounds with activities against biofilms formed by *Candida* spp. *Journal of Fungi*, 7(5), 360.
88. Kean, R., Rajendran, R., Haggarty, J., Townsend, E. M., Short, B., Burgess, K. E., Lang, S., Millington, O., Mackay, W. G., & Williams, C. (2017). *Candida albicans* mycofilms support *Staphylococcus aureus* colonization and enhances miconazole resistance in dual-species interactions. *Frontiers in microbiology*, 8, 258.
89. Khan, A., Ahmad, A., Khan, L. A., Padoa, C. J., Van Vuuren, S., & Manzoor, N. (2015). Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. *Microbial pathogenesis*, 80, 50-56.

90. Kucharíková, S., Tourneu, H., Lagrou, K., Van Dijck, P., & Bujdáková, H. (2011). Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *Journal of Medical Microbiology*, 60(9), 1261–1269.
91. Kuriyama, T., Williams, D. W., & Lewis, M. A. O. (2003). In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral microbiology and immunology*, 18(6), 405-407.
92. LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., & Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3839-3846.
93. Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94.
94. Laniado-Laborín, R., & Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 223-227.
95. Laouer, H., Akkal, S., Debarnot, C., Canard, B., Meierhenrich, U. J., & Baldovini, N. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. *Natural Product Communications*, 1(8), 1934578X0600100809.
96. Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual review of microbiology*, 64(1), 357–372.
97. Li, L., Redding, S., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2007). *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of dental research*, 86(3), 204-215.
98. Ličina, B. Z., Stefanović, O. D., Vasić, S. M., Radojević, I. D., Dekić, M. S., & Čomić, L. R. (2013). Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food control*, 33(2), 498-504.
99. Liguori, G., Di Onofrio, V., Lucariello, A., Gallé, F., Signoriello, G., Colella, G., D'amora, M., & Rossano, F. (2009). Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral microbiology and immunology*, 24(1), 76-78.

- 100.**Lombardi, A., & Ouanounou, A. (2020). Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *130*(5), 533-546.
- 101.**Lombrea, A., Antal, D., Ardelean, F., Avram, S., Pavel, I. Z., Vlaia, L., Mut, A., Diaconeasa, Z., Dehelean, C., Soica, C., & Danciu, C. (2020). A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9653.
- 102.**Maheronnaghsh, M., Fatahinia, M., Dehghan, P., & Teimoori, A. (2020). Identification of *Candida* Species and Antifungal Susceptibility in Cancer Patients with Oral Lesions in Ahvaz, Southern West of Iran. *Advanced Biomedical Research*, *9*(1), 50.
- 103.**Mardani, M., Abolghasemi, S., Darvishnia, D., Lotfali, E., Ghasemi, R., Rabiei, M. M., & Fattahi, A. (2020). Oral candidiasis in hematological malignancy patients: identification and antifungal susceptibility patterns of isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *13*(8).
- 104.**Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(10), 1745-1749.
- 105.**Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*, *34*(4), 487-494.
- 106.**Modrzewska, B., & Kurnatowski, P. (2015). Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Annals of parasitology*, *61*(1).
- 107.**Monsen, R. E., Kristoffersen, A. K., Gay, C., Herlofson, B. B., Fjeld, K. G., Hove, L. H., Nordgarden, H., Tollisen, A., Lerdal, A., & Enersen, M. (2023). Identification and susceptibility testing of oral candidiasis in advanced cancer patients. *BMC Oral Health*, *23*(1).
- 108.**Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus*

globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061–1066.

109. Nabti, L. Z., Sahli, F., Laouar, H., Olowo-Okere, A., Wandjou, J. G. N., & Maggi, F. (2020). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics*, 9(1), 29.
110. Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and infection*, 13(12-13), 963-976.
111. Nasri, E., Vaezi, A., Falahatinejad, M., Rizi, M. H., Sharifi, M., Sadeghi, S., Ataei, B., Mirhendi, H. and Fakhim, H. (2023). Species distribution and susceptibility profiles of oral candidiasis in hematological malignancy and solid tumor patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 143-149.
112. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
113. Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B., & Cannon, R. (2006). Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1148-1155.
114. Nobile, C. J., Andes, D. R., Nett, J. E., Smith, F. J., Yue, F., Phan, Q.-T., Edwards, J. E., Filler, S. G., & Mitchell, A. P. (2006). Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS pathogens*, 2(7), e63.
115. Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272-279.
116. Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., & Kong, L. (2000). Discovery of novel antifungal (1, 3)- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(2), 368-377.

117. O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47: e2437.
118. Palmeira-de-Oliveira, A., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira, R., Silva-Dias, A., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Pina-Vaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., Queiroz, J., & Rodrigues, A. (2012). The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: effect upon pre-formed biofilm. *Journal of ethnopharmacology*, 140(2), 379-383.
119. Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., Pina-Vaz, C., Queiroz, J. A., & Rodrigues, A. G. (2009). Anti-*Candida* activity of essential oils. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(11), 1292-1305.
120. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., & Walsh, T. J. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1-e50.
121. Perumal, P., Mekala, S., & Chaffin, W. L. (2007). Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2454-2463.
122. Perea JR, A. (2018). Pharmacological profile of isavuconazole. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 35(4), 186-191.
123. Pereira-Cenci, T., Deng, D., Kraneveld, E. A., Manders, E. M. M., Del Bel Cury, A. A., Cate, J. T., & Crielaard, W. (2008). The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Archives of Oral Biology*, 53(8), 755–764
124. Pese, S., Angkananuwat, C., Tancharoensukjit, S., Muanmai, S., Sirivan, P., Bubphawas, M., & Tanarerkchai, N. (2016). *In vitro* activity of Caspofungin combined with Fluconazole on mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilm. *Medical Mycology*, 54(4), 384–393.

125. Pharmacopoeia, E. (2008). Determination of essential oils in herbal drugs, Council of Europe Strasbourg Cedex, France: 251-256.
126. Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A., Wormley, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols*, 3(9), 1494–1500.
127. Pirofski, L.A., & Casadevall, A. (2009). Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(2), 269-273.
128. Peixoto, L. R., Rosalen, P. L., Ferreira, G. L. S., Freires, I. A., De Carvalho, F. G., Castellano, L. R. C., & De Castro, R. D. (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, 73, 179–185.
129. Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore d'Algerie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, p. 672.
130. Quindós, G., Villar-Vidal, M., & Eraso, E. (2009). Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(1), 49-55.
131. Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., & Eraso, E. (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 24(2), e172.
132. Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5459-5463.
133. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International journal of microbiology*, 2012, 1–14.
134. Ruan, S., & Hsueh, P. (2009). Invasive Candidiasis: An Overview from Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*, 108(6), 443–451.

135. Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M., & Mohan Karuppaiyl, S. (2013). Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1), 87-96.
136. Ruberto, G., Baratta, M. T., Sari, M., & Kaâbeche, M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and fragrance journal*, 17(4), 251-254.
137. Saad, A., Fadli, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N., & Hassani, L. (2010). Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine*, 17(13), 1057–1060.
138. Saharkhiz, M. J., Motamedi, M., Zomorodian, K., Pakshir, K., Miri, R., & Hemyari, K. (2012). Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–6.
139. Samaranayake, L. P., Leung, W. K., & Jin, L. (2009). Oral mucosal fungal infections. *Periodontology 2000*, 49(1), 39-59.
140. Sav, H., Altınbaş, R., & Dursun, Z. B. (2020). Fungal profile and antifungal susceptibility pattern in patients with oral candidiasis. *Le Infezioni in Medicina*, 28(3), 392–396.
141. Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., Saija, A., Daquino, C., & Ruberto, G. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and fragrance journal*, 21(6), 890-898.
142. Shala, A., Singh, S., Hameed, S., & Khurana, S. P. (2022). Essential oils as alternative promising anti-candidal agents: Progress and prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 28(1), 58-70.
143. Sheehan, D. J., Brown, S. D., Pfaller, M. A., Warnock, D. W., Rex, J. H., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum M. A., Moore L. S. and Odds F. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Pennsylvania, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A2.

144. Schelenz, S., Abdallah, S., Gray, G., Stubbings, H., Gow, I., Baker, P., & Hunter, P. R. (2010). Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 40(1), 83–89.
145. Seddiki, S., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Kunkel, D. (2015). Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida* sp. Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 130-135.
146. Seneviratne, C., Jin, L., & Samaranayake, L. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases*, 14(7), 582-590.
147. Seneviratne, C. J., Silva, W. J., Jin, L., Samaranayake, Y., & Samaranayake, L. (2009). Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of oral biology*, 54(11), 1052-1060.
148. Senouci, H., Benyelles, N. G., Dib, M. E., Costa, J., & Muselli, A. (2020a). Chemical composition and combinatory antifungal activities of *Ammoides verticillata*, *Allium sativum* and *Curcuma longa* essential oils against four fungi responsible for tomato diseases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 23(3), 196-204.
149. Senouci, H., Benyelles, N. G., Dib, M. E., Costa, J., & Muselli, A. (2020b). *Ammoides verticillata* essential oil as biocontrol agent of selected fungi and pest of olive tree. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(2), 182-188.
150. Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Akram, M., Abbaass, W., Semwal, P., Painuli, S., Konovalov, D. A., Alfred, M. A., & Kumar, N. V. A. (2021). Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the *Melissa officinalis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-20.
151. Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), 201-222.

152. Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 47(7), 681-689.
153. Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonca, D. I., & Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19(1), 42-47.
154. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in microbiology*, 19(5), 241-247.
155. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
156. Silva, S., Pires, P., Monteiro, D. R., Negri, M., Gorup, L. F., Camargo, E. R., Barbosa, D. B., Oliveira, R., Williams, D. W., & Henriques, M. (2013). The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Medical mycology*, 51(2), 178-184.
157. Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *Journal of Fungi*, 3(1), 8.
158. Singh, I., Kaur, P., Kaushal, U., Kaur, V., & Shekhar, N. (2022). Essential oils in treatment and management of dental diseases. *Biointerf. Res. Appl. Chem*, 12, 7267-7286.
159. Southern, P., Horbul, J., Maher, D., & Davis, D. A. (2008). *C. albicans* colonization of human mucosal surfaces. *PloS one*, 3(4), e2067.
160. Staniszewska, M., Bondaryk, M., Siennicka, K., Pilat, J., Schaller, M., & Kurzatkowski, W. (2012). Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. *Postępy Mikrobiologii*, 51(2).

161. Stenderup, A., & Pedersen, G.T. (1962). Yeasts of human origin. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 54(4), 462-472.
162. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.
163. Stringaro, A., Vavala, E., Colone, M., Pepi, F., Mignogna, G., Garzoli, S., Cecchetti, S., Ragno, R., & Angiolella, L. (2014). Effects of *Mentha suaveolens* essential oil alone or in combination with other drugs in *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–9.
164. Sucher, A. J., Chahine, E. B., & Balcer, H. E. (2009). Echinocandins: the newest class of antifungals. *Annals of Pharmacotherapy*, 43(10), 1647-1657.
165. Sultan, A. S., Kong, E. F., Rizk, A. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2018). The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLoS pathogens*, 14(1), e1006719.
166. Stringaro, A., Colone, M., & Angiolella, L. (2018). Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. *Medicines*, 5(4), 112.
167. Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–21.
168. Tangarife-Castaño, V., Correa-Royero, J., Zapata-Londoño, B., Durán, C., Stanshenko, E., & Mesa-Arango, A. C. (2011). Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio*, 15(3), 160-167.
169. Tati, S., Davidow, P., McCall, A., Hwang-Wong, E., Rojas, I. G., Cormack, B., & Edgerton, M. (2016). *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal candidiasis. *PLOS pathogens*, 12(3), e1005522.

170. Tefiani, C., Riazi, A., Youcefi, F., Aazza, S., Gago, C., Faleiro, M. L., Pedro, L., Barroso, J., Figueiredo, A. C., & Megías, C. (2015). *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Research*, 27(2), 131-139.
171. Thompson, G. R., Cadena, J., & Patterson, T. F. (2009). Overview of antifungal agents. *Clinics in chest medicine*, 30(2), 203-215.
172. Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
173. Vazquez, J. A. (1999). Options for the management of mucosal candidiasis in patients with AIDS and HIV infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 19(1), 76-87.
174. Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology*, 60(1), 5-15.
175. Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*, 6(1), 15.
176. Vitale, R. G., Afeltra, J., & Dannaoui, E. (2005). Antifungal combinations. *Antifungal agents: Methods and protocols*, 143-152.
177. Watanabe, T., Takano, M., Murakami, M., Tanaka, H., Matsuhisa, A., Nakao, N., Mikami, T., Suzuki, M., & Matsumoto, T. (1999). Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology*, 145(3), 689-694.
178. Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7.
179. White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., & Bosso, J. A. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(8), 1914-1918.

- 180.**Wiederhold, N. P. (2018). The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 333–339.
- 181.**Williams, D., Silva, S. C., Malic, S., Kuriyama, T., & Lewis, M. A. (2012). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1), 250–265.
- 182.**Wu, X., Cheng, A., Sun, L., & Lou, H. (2008). Effect of pligiochin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1478-1485.
- 183.**Zhang, L. W., Fu, J. Y., Hua, H., & Yan, Z. M. (2016). Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral diseases*, 22(3), 185-195
- 184.**Zhou L., Tong Z.C., Wu G.F., Feng Z.H., Bai S.Z., Dong Y., Ni L.X., and Zhao Y.M. (2010) Parylene coating hinders *Candida albicans* adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. *Archives of Oral biology*; 55 : 401-409.

Annexes

Annexe 01

Tableau 6: Répartition par âge et par sexe des patients

	<21	21–30	31–40	41–50	51–65	>65
Femme	1(3,70%)	0 (0, 00%)	0 (0, 00%)	3 (11, 11%)	5 (18, 52%)	6 (22, 22%)
Homme	2 (7, 41%)	1(3, 70%)	0 (0, 00%)	1 (3, 70%)	5 (18, 52%)	3 (11, 11%)
Total	3 (11, 11%)	1(3,70%)	0 (0, 00%)	4 (14, 81%)	10 (37, 04%)	9 (33, 33%)

Tableau 7: Capacité des souches *C. albicans* et *C. glabrata* à former des biofilms

Souche	Formation du biofilm (DO à 630 nm)	
<i>C. albicans</i>	A1	0,294± 0,00
	A7	0,294± 0,03
	A9	0,296± 0,02
	A12	0,255± 0,01
	A15	0,275± 0,01
	A16	0,232± 0,01
	A17	0,260± 0,01
	A19	0,263± 0,01
	A23	0,317± 0,02
	A25	0,296± 0,01
	A26	0,355± 0,01
	A27	0,324± 0,01
	A28	0,250± 0,00
	A4	0,315± 0,00
	A6	0,286± 0,00
	A8	0,307± 0,02
	A21	0,329± 0,00
	A22	0,364± 0,00
	A30	0,301± 0,02
A31	0,303± 0,02	
ATCC10231	0,250± 0,01	
<i>C. glabrata</i>	G2	0,192± 0,01
	G3	0,203± 0,00
	G5	0,209± 0,00
	G10	0,201± 0,01
	G13	0,181± 0,01
	G20	0,263± 0,00
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	A22+ G20	0,375± 0,00

Annexe 02

Tableau 8: Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles sur *C. albicans* et *C. glabrata* par diffusion sur disque.

Strain	Inhibition zone diameter (mm)			
	Huile essentielle (3µL/Disc)			
	<i>O. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>S. saturoioides</i>	
<i>C. albicans</i> FLC-R	A1	29 ±1,00	35 ±1,00	22 ±1,00
	A7	31 ±1,00	28 ±1,00	21 ±1,00
	A9	29 ±1,00	27 ±0,00	13 ±1,00
	A12	30 ±1,53	25 ±1,00	22 ±1,00
	A15	28 ±1,00	31 ±0,58	24 ±0,58
	A16	33 ±0,58	27 ±1,00	20 ±1,00
	A17	29 ±1,00	26 ±1,00	23 ±1,00
	A19	33 ±1,00	26 ±1,00	15 ±0,58
	A23	34 ±1,00	36 ±1,00	23 ±1,00
	A25	31 ±0,58	34 ±1,00	12 ±1,00
	A26	34 ±1,00	36 ±0,58	25 ±1,00
	A27	34 ±1,00	32 ±1,15	24 ±1,00
	A28	35 ±1,00	36 ±1,00	25 ±1,00
	<i>C. albicans</i> FLC-S	A4	30 ±1,00	29 ±1,00
A6		29 ±1,00	18 ±0,58	11 ±1,00
A8		35 ±1,53	30 ±0,00	18 ±1,00
A21		35 ±1,00	31 ±1,00	24 ±0,58
A22		34 ±1,00	35 ±1,53	16 ±1,00
A30		36 ±0,58	33 ±1,00	16 ±1,00
A31		35 ±1,00	32 ±1,00	17 ±1,15
ATCC10231		37 ±0,58	35 ±1,00	18 ±1,00
<i>C. glabrata</i> FLC-S	G2	34 ±1,00	22 ±1,00	22 ±1,00
	G3	35 ±0,00	23 ±1,00	21 ±0,00
	G5	29 ±1,00	18 ±0,00	15 ±0,58
	G10	29 ±1,00	17 ±1,00	15 ±1,00
	G13	21 ±1,00	24 ±0,58	14 ±1,00
	G20	35 ±1,00	14 ±1,00	14 ±1,15

Publications



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio



Efficacy of endemic Algerian essential oils against single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*

Mohammed Yassine Benziane^a, Mourad Bendahou^a, Fethi Benbelaïd^{a,b,*},
Abdelmounaim Khadir^{a,c}, Hanane Belhadef^d, Asma Benaïssa^a, Saida Ouslimani^a,
Fatma Mahdi^a, Alain Muselli^e

^a Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical, and Environment (LAMAARE), Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth, and Universe, Abou Bakr Belkaid University of Tlemcen, Algeria

^b Department of Biology, Faculty of Exact Sciences and Natural Life Sciences, Mohamed Khider University, Biskra, Algeria

^c Department of Biology, Oran University, 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria

^d Department of Hematology, University Hospital, University of Tlemcen, Algeria

^e Laboratory of Natural Products Chemistry, University of Corsica, UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Candidiasis
Biofilms
Candida albicans
Candida glabrata
Oils
Volatile

ABSTRACT

Objectives: This study investigated the *in vitro* effect of *Origanum glandulosum*, *Annoisoides verticillium*, and *Saccocoryx sanaretioides* essential oils against planktonic cells and biofilms formed by single and mixed species of *Candida albicans* and *Candida glabrata* oral isolates. The effect of the essential oils in combination with amphotericin B on planktonic cells was also studied.

Design: The antifungal susceptibility of planktonic cells was evaluated by disc diffusion and broth microdilution methods. Resazurin assay and scanning electron microscopy (SEM) were employed to determine the antibiofilm activity. The combinatory effect was evaluated by the checkerboard method. Essential oils were characterized by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).

Results: The minimal inhibitory concentrations (MICs) and the minimum fungicidal concentrations (MFCs) of the studied essential oils were ranged between 250 and 2000 µg/mL. Biofilms were inhibited and eradicated by the essential oils at sub-inhibitory concentrations of 500 and 1000 µg/mL, respectively. SEM studies revealed a reduction in the preformed biofilm as a result of *Origanum glandulosum* essential oil treatment for single and mixed biofilms. Synergistic activity was found when *Origanum glandulosum* essential oil was combined with amphotericin B against *Candida albicans*. GC-MS analysis revealed that thymol was the major compound in *Origanum glandulosum* (38.36 %) and *Annoisoides verticillium* (48.99 %) essential oils, while *Saccocoryx sanaretioides* essential oil was dominated by borneol (27.36 %).

Conclusions: The studied essential oils showed significant antifungal and antibiofilm activities, which support their effectiveness as promising candidates for the management of oral *Candida* infections.

1. Introduction

Oral candidiasis are fungal infections affecting the human oral cavity caused by *Candida* species. High-risk patients with oral candidiasis experience symptoms such as local discomfort, dysphagia, altered taste sensation, and importantly they may develop life-threatening invasive candidiasis when the pathogen reaches the bloodstream and cause

candidemia (Akpan, 2002; Gheorghe et al., 2021). *Candida albicans* (*C. albicans*) is considered as the primary causative agent responsible for up to 95 % of cases of oral candidiasis. However, other *Candida* species are being increasingly encountered in the last years. Indeed, *Candida glabrata* (*C. glabrata*) has recently emerged as the second cause of oral candidiasis, especially in immunocompromised patients and is frequently co-isolated with *C. albicans* (Li et al., 2007; Tati et al., 2016).

* Correspondence to: Department of Biology, Faculty of Exact Sciences and Natural Life Sciences, Mohamed Khider University, PO Box 145 RP, 07000 Biskra, Algeria.

E-mail address: fethi.benbelaïd@univ-biskra.dz (F. Benbelaïd).

¹ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4024-4846>

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105584>

Received 24 June 2022; Received in revised form 5 November 2022; Accepted 9 November 2022

Available online 11 November 2022

0003-9969/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Mixed-species infections with both species are found to be more severe and difficult to treat not only due to their combined pathogenic effects, but also these species are intrinsically resistant to the commonly employed azole drugs, especially *C. glabrata* (Silva F, 2011; Silva S, 2011).

Biofilm formation is recognized as an important virulence factor in *Candida* species. Biofilms are communities of single or multi-species microorganisms attached to a surface and encased in a self-produced matrix (Costerton et al., 1996; Flemming et al., 2016). Microbial cells residing inside the biofilm exhibit lower growth rates and are less susceptible to antimicrobial treatment (Cavalheiro & Teixeira, 2018). It is estimated that over 80% of *Candida* infections are associated with biofilm formation (Mayer et al., 2013). Despite the significant burden of biofilms on public health, the number of available therapeutic treatments is limited. In addition, the clinical use of the current drugs, such as amphotericin B and fluconazole has been compromised due to the potential side effects, high toxicity, and emergence of resistant strains. Thus, the search for alternative strategies to overcome these drawbacks is urgently needed.

In the last decade, a renewed interest has been given to the use of medicinal plants as a source of new drugs. Plant secondary metabolites, particularly essential oils, have gained considerable attention within the scientific community thanks to their diverse biological properties (Nazzaro et al., 2017; Serra et al., 2018). Essential oils are generally recognized as safe and are more widely accepted by consumers than synthetic agents (Edris, 2007). They are also considered as the most profitable natural products available for treating fungal infections (El-Tarabily et al., 2021). The antimicrobial or antifungal activity of essential oils could be attributed to the properties of terpenes/terpenoids, which are capable of disrupting the cell membrane and leading to cell death, owing to their lipophilic character and low molecular weight (Nazzaro et al., 2017). Previous studies have reported that the antimicrobial activity of an essential oil depends on its major compounds as well as their interaction with other compounds including minority compounds present in the oil (Hyldgaard et al., 2012).

Phytotherapy is an integral part of Algerian culture, in which the local population use aromatic plants to treat several diseases (Bouasla & Bouasla, 2017). Among them, *Origanum glandulosum*, *Anmoides verticillata*, and *Saccocalyx saharensis* are widely employed against oral infections such as periodontitis and candidiasis, and these species are endemic plants in Algeria (Quézel & Santa, 1963). These plants are characterized by their high content of essential oils with biologically active substances such as thymol that exhibit antimicrobial properties (Benyoucef, 2020; Laouer et al., 2006; Zakaria Nabti et al., 2020).

The objectives of this study were to investigate the *in vitro* activities of essential oils obtained from three Algerian endemic medicinal plants alone and in combination with amphotericin B against planktonic cells of *C. albicans* and *C. glabrata* oral isolates, and assess their effects on single and mixed biofilms formed by these species.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The plant species used in this study were chosen according to their use by the Algerian population in the treatment of oral pathologies including candidiasis. The plants were collected from two different regions of Algeria: *Origanum glandulosum* (*O. glandulosum*) and *Anmoides verticillata* (*A. verticillata*) were collected from Tlemcen province (north-western Algeria) and *Saccocalyx saharensis* (*S. saharensis*) from Naâma province (western Algeria). The taxonomic identification was performed at the Department of Ecology and Environment, University of Tlemcen, Algeria.

2.2. Essential oils extraction

The aerial parts of the studied plants were washed and dried in shade until a constant weight is obtained (average of twenty to thirty days). Then, the dried plant material was subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 3 h for each species according to European Pharmacopoeia (European Pharmacopoeia 6.0, 2008). The obtained essential oils were dehydrated over anhydrous sodium sulfate and then stored in amber glass at 4 °C to protect them from light and heat until use.

2.3. Chromatographic analyses of essential oils

Gas chromatography analysis was performed using a Perkin Elmer Autosystem GC-type chromatograph, equipped with dual flame ionization detectors, a single injector, and two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm) with different stationary phases: polyethylene glycol (polar) and polydimethylsiloxane (nonpolar). The operating conditions were: Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Injector and detector temperatures were held at 280 °C. The temperature was planned to increase from 60° to 230 °C at 2 °C/min and then held isothermal at 230 °C for 30 min. The injection was done by split mode with a split ratio of 1/80. The amount of essential oil injected was 0.1 µL. The Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis was performed on a Perkin Elmer Autosystem XL chromatograph equipped with fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), polyethylene glycol and polydimethylsiloxane, coupled with a Perkin Elmer TurboMass mass detector. The mass spectra were recorded at 70 eV in the mass range of 35–350 Da with a scan interval of 1 s. The transfer line was heated at 250 °C. Other chromatographic conditions were the same as those for Gas Chromatography. The essential oils components were identified via comparison of their recorded mass spectra with those in the mass spectra library (NIST), as well as by comparing their GC retention indices on nonpolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of *n*-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data (Adams, 2009; König et al., 2004).

2.4. Fungal isolates

Twenty clinical isolates of *C. albicans* (13 resistant and 07 susceptible to fluconazole) and 06 clinical isolates of *C. glabrata* (Susceptible to fluconazole) were used in this study. These isolates were recovered from patients with oral candidiasis and were identified by using germ tube test, CHROMagar *Candida* medium (CHROMagar®, France) and confirmed by API 20 C AUX system (bioMérieux, France). Fluconazole susceptibility was detected by the standard methodology M27-A2 as per the CLSI guidelines (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). *C. albicans* ATCC 10231 was employed as a control strain.

2.5. Antifungal susceptibility test

2.5.1. Disk diffusion method

For initial screening, the disk diffusion technique was applied as described in CLSI M44-A2 protocol (Sheehan et al., 2004). Briefly, a suspension with half McFarland turbidity was prepared and inoculated on the surface of Mueller-Hinton agar supplemented with glucose and methylene blue medium by swabbing in three directions. Then, a 6-mm filter paper disk impregnated with 3 µL of the tested essential oil was placed on the surface of the inoculated agar and incubated for 48 h at 37 °C. The antifungal activity was evaluated by measuring the inhibition zone around the disk. Each essential oil was tested independently.

2.5.2. Broth microdilution method

The inhibitory effect of the essential oils on *Candida* growth was examined using the CLSI broth microdilution methodology (Clinical

Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). RPMI 1640 supplemented with L-glutamine and buffered with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS, Sigma-Aldrich) was employed as the test medium. Briefly, stock essential oil solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and diluted with RPMI 1640 medium to obtain 2-fold of the final concentrations. A 100 μ L of each dilution was dispensed into wells of the 96-well microplate. The final concentrations ranged from 7.8 to 4000 μ g/mL. Amphotericin B (Sigma-Aldrich) with a final concentration from 0.031 to 16 μ g/mL was used as a positive control. Final DMSO concentration never exceeded 1%. Subsequently, 100 μ L of yeast suspension (2.5×10^3 CFU/mL) was added to each well and plates were incubated at 37 °C for 24 h. The MIC values were visually determined as the lowest concentration of test compounds (essential oils and amphotericin B) showing complete inhibition of *Candida* growth.

2.5.3. Minimum fungicidal concentration (MFC) determination

For MFC determination, 10 μ L from each well showing growth inhibition was subcultured on Sabouraud's agar plates for 48 h at 37 °C. The MFC was defined as the lowest concentration yielding negative growth. The MFC/MIC ratio was calculated to determine if the tested compound had fungicidal (MFC/MIC ratio < 4) or fungistatic effect (MFC/MIC ratio \geq 4) (Peixoto et al., 2017).

2.6. Biofilm formation

Candida isolates were assessed for their biofilm-forming ability using the microtiter plate- method (Pierce et al., 2008). Briefly, fresh colonies grown on Sabouraud agar were incubated in Sabouraud broth at 30 °C for 18 h at 120 rpm on an orbital shaking incubator. Cultures were harvested and washed 2x with sterile phosphate buffered saline (PBS), and then resuspended in RPMI 1640 medium to a final cell density of 1×10^6 cells/mL. Single biofilms were formed by pipetting 100 μ L of the standardized inoculum into the microtiter plate wells and incubated for 24 h at 37 °C. Afterwards, biofilms were washed with PBS then quantified by the crystal violet assay (see below) (O'Toole, 2011). One strain from each species with high biofilm formation ability were selected and used for the next experiments.

For mixed biofilm formation, standardized suspensions were prepared in RPMI 1640 medium as described above. Then, 50 μ L of standardized suspensions of each species (1×10^6 cells/mL) were seeded into each well and incubated for 24 h at 37 °C. Biofilm biomass quantification was carried out similarly to that used for single biofilms.

2.6.1. Biofilm biomass quantification

Biofilm was stained with 125 μ L of 0.1 % crystal violet for 15 min. Subsequently, the excess stain was discarded and wells were rinsed with PBS. Biofilm-bound crystal violet was dissolved by adding 125 μ L of 30 % acetic acid and absorbance was recorded at 630 nm by an ELx 808™ microplate reader. Each strain was tested in triplicate. The strains were classified as weak, moderate, and strong biofilm producers following the criteria established by Stepanović et al. (2000).

2.6.2. Effect of essential oils on single and mixed biofilm development

Biofilms were formed in the presence of different concentrations of test compounds (Pesece et al., 2016). Briefly, 100 μ L of standardized suspension (1×10^6 cells/mL in RPMI1640) for mono- species biofilms or 50 μ L of each species (1:1 ratio) for dual-species biofilm were pipetted into wells of the microtiter plate. Then, 100 μ L of essential oils dilutions (1/2MIC, MIC, 2 MIC and 4 MIC) or amphotericin B (128 μ g/mL to 0.125 μ g/mL) were added and incubated for 24 h at 37 °C. Test compound-free wells served as growth control, whereas biofilm-free wells served as sterility controls. Then, the medium was discarded followed by rinsing with PBS to remove unbound cells. Biofilm viability was assessed using resazurin staining assay, as described previously by Heredero-Bermejo et al. (2020). A mixture of 100 μ L of medium and 20 μ L of 0.01% (w/v) resazurin solution was added to each well of the

microplates and then covered with aluminium foil. After incubation of 24 h at 37 °C, visual reading was performed to determine the minimum biofilm inhibition concentration (MBIC), which is defined as the lowest concentration of test compounds that prevent the reduction of the blue resazurin to pink resorufin.

2.6.3. Effect of essential oils on preformed biofilms

Biofilms were allowed to form for 24 h in the absence of test compounds. After incubation, the medium was withdrawn and wells were washed with PBS. Next, 100 μ L of essential oils at concentrations of 1/2MIC, MIC, 2 MIC and 4 MIC or amphotericin B from 128 μ g/mL to 0.125 μ g/mL were added to the wells and incubated at 37 °C for 24 h. Test compound-free wells and biofilm-free wells served as growth and sterility controls, respectively. Biofilm viability was monitored by the resazurin assay in the same manner as described above to determine the minimum biofilm eradication concentration (MBEC).

2.7. Checkerboard assay and FIC Index determination

Combinatory effect between the essential oils and amphotericin B was evaluated against *Candida* strains planktonic cells using the checkerboard microtiter plate method described by Vitale et al. (2005). Briefly, two-fold serial dilutions of the test compounds at concentrations ranging from MIC/8 to MIC \times 8 and *Candida* inoculums were prepared similarly to the MIC determination test. Then, 50 μ L of each dilution of amphotericin B was added vertically to the wells of 96-well microplate followed by 50 μ L of each dilution of the essential oil to be tested horizontally. Subsequently, 100 μ L of *C. albicans* A22 or *C. glabrata* G20 inoculum was added to the plates and incubated for 24 h at 37 °C.

The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated using the formula: $FICI = \frac{\sum FIC}{FIC_{Essential\ oil} + FIC_{Amphotericin\ B}}$, where $FIC_{Essential\ oil} = \frac{MIC_{Essential\ oil\ in\ combination}}{MIC_{Essential\ oil\ alone}}$ and $FIC_{Amphotericin\ B} = \frac{MIC_{Amphotericin\ B\ in\ combination}}{MIC_{Amphotericin\ B\ alone}}$.

The results were interpreted as follow: Synergism: FICI \leq 0.5; Additive: FICI 0.5 \leq 1; Indifferent: FICI > 1–4; Antagonism FICIs \geq 4 (Mulyaningih et al., 2010).

2.8. SEM analysis

Effect of *O. glandulosum* essential oil on preformed single and mixed biofilms was observed by SEM. The selection of *O. glandulosum* essential oil was based on its strong activity compared with the other essential oils. Briefly, 500 μ L of standardized cell suspension (1×10^6 cells/mL) for single biofilms or 250 μ L of each isolate for mixed biofilm were dispersed on a sterile glass coverslip and incubated for 24 h at 37 °C. Then, biofilms were rinsed with PBS and incubated with 1x MIC concentration of *O. glandulosum* essential oil for a further 24 h. Untreated biofilms served as a control. After incubation, biofilms were washed and fixed with 2.5% glutaraldehyde. Following fixation, a dehydration step was performed in a series of ethanol solutions and then biofilms were allowed to air-dry. The biofilms were examined using a Hitachi TM-1000 SEM (Hitachi, Japan).

2.9. Statistical analysis

Each assay was performed in triplicate and repeated two times independently. Data were analyzed using SPSS Statistics V 26 software. Normality has been checked by Shapiro-Wilk test. Kruskal-Wallis H test was used to compare between inhibition zones diameter. Biofilm formation was assessed by one-way ANOVA test. A p-value less than 0.05 was considered as significant.

3. Results

3.1. Essential oils analysis

The chemical composition of *O. glandulosum*, *A. verticillata*, and *S. saturoioides* essential oils are listed in Table 1. All the three essential oils were characterized by high amounts of oxygenated and hydrocarbon monoterpenes, while sesquiterpenes were detected in low percentage. The main compounds found in *O. glandulosum* essential oil were thymol, γ -terpinene and *p*-cymene (38.36%, 24.36%, and 18.33%, respectively). Analysis of *A. verticillata* essential oil has also shown its richness in thymol (48.99%) followed by the presence of *p*-cymene (15.94 %) and limonene (15.41 %). Regarding *S. saturoioides* essential oil, borneol (27.36%) was the predominant compound followed by thymol and α -terpineol (20.01 % and 19.38 % respectively).

3.2. Antifungal susceptibility test

The antifungal activity results of the studied essential oils and amphotericin B on the clinical isolates and reference strain are listed in Table 2 and Table 3. The data for the inhibition zone diameter was subjected to the Shapiro-Wilk normality test and revealed that data was not normally distributed ($p < 0.05$). Therefore, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. The significance level was ($p < 0.05$). All the studied isolates were susceptible to the three essential oils and amphotericin B. There is no significant difference between groups ($p > 0.05$). The inhibition zones of all the essential oils were ≥ 11 mm. The MIC values of *A. verticillata* and *O. glandulosum* essential oils were in the range of 250–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while of *S. saturoioides* essential oil were within the limits of 500–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The MICs values of amphotericin B were between 0.25 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Results of the MPC/MIC ratio demonstrate that the three essential oils exhibited fungicidal effect against all the tested strains.

3.3. Biofilm formation ability

Results of biofilm biomass measurements using crystal violet method

Table 1
Chemical composition of the studied essential oils.

#	Component	nRI	pRI	<i>O. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>S. saturoioides</i>	ID
1	alpha-Thujene	922	1023	1.03	0.57	0.56	RI, MS
2	alpha-Pinene	931	1022	0.68	0.89	3.54	RI, MS
3	Camphene	943	1066	1.52	-	8.25	RI, MS
4	Sabinene	964	1120	-	-	1.33	RI, MS
5	beta-Pinene	970	1110	0.32	0.09	0.71	RI, MS
6	Myrcene	979	1159	1.63	0.66	0.96	RI, MS
7	alpha-Terpinene	1008	1178	2.57	0.65	0.55	RI, MS
8	para-Cymene	1011	1268	18.33	15.94	3.78	RI, MS
9	Limonene	1020	1199	0.45	15.41	0.92	RI, MS
10	gamma-Terpinene	1047	1243	24.36	7.01	1.53	RI, MS
11	Linalool	1081	1544	0.96	0.23	2.74	RI, MS
12	Camphor	1123	1517	-	-	0.12	RI, MS
13	Borneol	1148	1698	0.08	-	27.36	RI, MS
14	Terpinen-4-ol	1161	1600	0.26	0.24	0.98	RI, MS
15	alpha-Terpineol	1179	1700	0.27	0.08	19.38	RI, MS
16	Thymol	1266	2189	38.36	48.99	20.01	RI, MS
17	Carvacrol	1278	2219	2.94	4.08	2.01	RI, MS
18	beta-Caryophyllene	1424	1591	0.98	-	0.23	RI, MS
19	alpha-Humulene	1456	1605	0.07	-	0.09	RI, MS
20	beta-Sesquiphellandrene	1516	1765	0.86	-	-	RI, MS
	Total identified			18	13	19	
	Total identified (%)			95.67	94.84	95.05	
	Monoterpene hydrocarbons			50.89	41.22	22.13	
	Oxygenated monoterpenes			42.87	53.62	72.60	
	Sesquiterpene hydrocarbons			1.91	-	0.32	

Results are in percentage (%) of components for essential oils of *O. glandulosum*, *A. verticillata*, and *S. saturoioides*. Percentages and elution order of individual components are given on nonpolar column. Retention indices nRI and pRI are given respectively on nonpolar and polar columns. ID: identification method by comparison of (RI) retention indices and (MS) mass spectra

Table 2

Susceptibility of *C. albicans* and *C. glabrata* to the studied essential oils, as measured by disk diffusion.

Strain		Inhibition zone diameter (mm)			
		<i>O. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>S. saturoioides</i>	
<i>C. albicans</i> FLC-R ^a	A1	29	35	22	
	A7	31	28	21	
	A9	29	27	13	
	A12	30	25	22	
	A15	28	31	24	
	A16	33	27	20	
	A17	29	26	23	
	A19	33	26	15	
	A23	34	36	23	
	A25	31	34	12	
	A26	34	36	25	
	A27	34	32	24	
	A28	35	36	25	
	A29	35	36	25	
<i>C. albicans</i> FLC-S ^b	A4	30	29	13	
	A6	29	18	11	
	A8	35	30	18	
	A21	35	31	24	
	A22	34	35	16	
	A30	36	33	16	
	A31	35	32	17	
	ATCC10231	37	35	18	
	<i>C. glabrata</i> FLC-S	G2	34	22	22
		G3	35	23	21
G5		29	18	15	
G10		29	17	15	
G13		21	24	14	
G20		35	14	14	

A: *C. albicans*.

G: *C. glabrata*.

No significant difference was observed between groups ($p > 0.05$, one-way ANOVA).

^a FLC-R: Fluconazole-resistant.

^b FLC-S: Fluconazole-susceptible.

Table 3
MIC, MPC, and MPC/MIC of the studied essential oils and amphotericin B against *C. albicans* and *C. glabrata*.

Strain		<i>O. glandulosum</i>			<i>A. verticillata</i>			<i>S. saureoides</i>			Amphotericin B			
		MIC	MPC	MPC/MIC	MIC	MPC	MPC/MIC	MIC	MPC	MPC/MIC	MIC	MPC	MPC/MIC	
<i>C. albicans</i> FLC-R ^a	A1	500	500	1	250	250	1	500	1000	2	0.25	0.25	1	
	A7	250	250	1	250	250	1	500	1000	2	0.25	0.25	1	
	A9	250	250	1	250	250	1	1000	1000	1	0.25	0.25	1	
	A12	250	250	1	250	250	1	500	500	1	0.25	0.5	2	
	A15	250	250	1	250	250	1	500	500	1	0.25	0.5	2	
	A16	250	250	1	250	250	1	500	1000	2	0.25	0.25	1	
	A17	250	250	1	250	250	1	500	1000	2	0.25	0.25	1	
	A19	250	250	1	250	250	1	1000	2000	2	0.25	0.5	2	
	A23	250	250	1	250	250	1	500	1000	2	0.25	0.25	1	
	A25	250	250	1	250	250	1	1000	1000	1	0.25	0.25	1	
	A26	250	250	1	250	250	1	500	500	1	0.5	0.5	1	
	A27	250	250	1	250	250	1	500	500	1	1	1	1	
	A28	250	250	1	250	250	1	500	1000	2	0.5	0.5	1	
	<i>C. albicans</i> FLC-S ^b	A4	250	250	1	250	250	1	1000	1000	1	0.5	0.5	1
A6		250	250	1	500	500	1	1000	1000	1	1	1	1	
A8		250	250	1	250	250	1	500	500	1	0.5	0.5	1	
A21		250	250	1	250	500	2	500	1000	2	1	1	1	
A22		250	250	1	250	500	2	500	500	1	0.5	0.5	1	
A30		250	250	1	250	250	1	500	500	1	1	1	1	
A31		250	250	1	250	250	1	500	500	1	0.5	0.5	1	
ATCC		250	250	1	250	250	1	500	500	1	0.5	0.5	1	
<i>C. glabrata</i> FLC-S		G2	250	500	2	500	500	1	500	500	1	0.5	0.5	1
		G3	250	250	1	500	500	1	500	500	1	0.25	0.25	1
	G5	500	500	1	500	500	1	500	1000	2	1	1	1	
	G10	250	500	2	500	500	1	500	500	1	1	1	1	
	G13	500	500	1	250	500	2	500	1000	2	1	1	1	
	G20	250	500	2	500	500	1	500	500	1	0.25	0.25	1	

MIC and MPC values expressed as µg/mL.

A: *C. albicans*.

G: *C. glabrata*.

No significant difference was observed between groups ($p > 0.05$, one-way ANOVA).

^a FLC-R: Fluconazole-resistant.

^b FLC-S: Fluconazole-susceptible.

Table 4
Biofilm forming ability of *C. albicans* and *C. glabrata* strains.

Fungal strains	Biofilm formation (OD at 630 nm)	
<i>C. albicans</i>	A1	0.294 ± 0.00
	A7	0.294 ± 0.03
	A9	0.296 ± 0.02
	A12	0.258 ± 0.01
	A15	0.275 ± 0.01
	A16	0.232 ± 0.01
	A17	0.260 ± 0.01
	A19	0.263 ± 0.01
	A23	0.317 ± 0.02
	A25	0.296 ± 0.01
	A26	0.355 ± 0.01
	A27	0.324 ± 0.01
	A28	0.250 ± 0.00
	A4	0.315 ± 0.00
	A6	0.206 ± 0.00
	A8	0.307 ± 0.02
	A21	0.329 ± 0.00
	A22	0.364 ± 0.00
	A30	0.301 ± 0.02
A31	0.303 ± 0.02	
<i>C. glabrata</i>	ATCC10231	0.250 ± 0.01
	G2	0.192 ± 0.01
	G3	0.203 ± 0.00
	G5	0.209 ± 0.00
	G10	0.201 ± 0.01
	G13	0.181 ± 0.01
	G20	0.263 ± 0.00
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	A22 + G20	0.375 ± 0.00

OD: Optical density.

A: *C. albicans*.

G: *C. glabrata*.

are presented in Table 4. Based on (OD) values and according to the classification established by Stepanović et al. (2000): ($OD \leq OD_c$ non-biofilm producer; $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ weak; $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ moderate; $4 \times OD_c < OD$ strong), it was evident that all the studied strains had the ability to produce biofilm but at different levels. From 21 *C. albicans* strains, 16 (76.19 %) were weak biofilm producer ($OD = 0.232 - 0.315$) and 05 (23.80 %) were moderate biofilm producer ($OD = 0.317 - 0.364$). All of 06 *C. glabrata* strains (100 %) were weak biofilm producer ($OD = 0.181 - 0.263$). Regarding mixed biofilm, *C. albicans* A22 and *C. glabrata* G20 were selected to study their capacity to form mixed biofilm. Mixed culture of both species produce moderate biofilm ($OD = 0.375$). It was noticed also that mixed biofilm of *C. albicans* and *C. glabrata* A22/G20 produce more biofilm biomass ($OD = 0.375$) compared with biofilms formed by *C. albicans* A22 ($OD = 0.364$) and *C. glabrata* G20 ($OD = 0.263$) when grown individually. The data for biofilm formation was exposed to the Shapiro-Wilk normality test and revealed that data was normally distributed ($p = 0.57$). Thus, the data were compared with one-way ANOVA. The significance level was ($p < 0.05$).

ANOVA analysis indicated a significant difference among species in terms of biofilm formation ability ($p < 0.05$).

3.4. Inhibition of biofilm formation

Data from Table 5 reveals that the three essential oils were able to inhibit both single and mixed biofilm development. The MBICs values were 500 µg/mL, except the MBIC value of *S. saureoides* essential oil against mixed biofilm was 1000 µg/mL. The Amphotericin B -MBIC value was 2 and 4 µg/mL for *C. glabrata* and *C. albicans* single biofilms respectively, which is 8-fold higher than their MIC values. For mixed biofilm, Amphotericin B-MBIC value was found to be 4 µg/mL.

Table 5
Effects of the studied essential oils and amphotericin B on single and mixed *C. albicans* and *C. glabrata* biofilms.

		^a A22	^b G20	A22 + G20
^c MBICs	<i>O. glandulosum</i>	500	500	500
	<i>A. verticillata</i>	500	500	500
	<i>S. satereioides</i>	500	500	1000
	Amphotericin B	4	2	4
^d MBECs	<i>O. glandulosum</i>	1000	1000	1000
	<i>A. verticillata</i>	1000	1000	1000
	<i>S. satereioides</i>	1000	1000	1000
	Amphotericin B	4	2	4

MBICs and MBECs values expressed as µg/mL.

^a A22: *C. albicans* strain 22.

^b G20: *C. glabrata* strain 20.

^c MBIC: minimum biofilm inhibition concentrations.

^d MBECs: minimum biofilm eradication concentrations.

3.5. Eradication effect of essential oils on preformed biofilms

As presented in Table 5 all the three essential oils exhibited eradication effects against single and mixed biofilms. The MBECs values of the three essential oils were 1000 µg/mL for both single and mixed biofilms. The Amphotericin B-MBEC values of single and mixed biofilms were similar to their MBIC values.

3.6. Essential oils/amphotericin B interactions

Results of the combinatory effect between essential oils and amphotericin B against *C. albicans* A22 and *C. glabrata* G20 are depicted in Table 6. According to the FICI values, only the combination of *O. glandulosum* essential oil with amphotericin B showed a synergistic effect (FICI=0.50) against *C. albicans*. The additive effect (FICI=0.75) was observed when combined *A. verticillata* essential oil and amphotericin B against *C. albicans* and *C. glabrata*, and between *S. satereioides* essential oil and amphotericin B against *C. albicans*. On the other hand, the essential oils of *O. glandulosum* and *S. satereioides* exhibited indifferent effect with amphotericin B against *C. glabrata*. (FICI=1.248 and FICI=3, respectively).

3.7. SEM analysis

SEM images of single and mixed biofilms before and after treatment with MIC *O. glandulosum* essential oil were presented in Fig. 1. The untreated biofilm of *C. albicans* (A22) revealed the presence of yeast cells, pseudo-hyphae, and hyphae, while the structure of *C. glabrata* untreated biofilm (G20) was entirely composed of yeasts cells. The untreated biofilm of mixed species was highly heterogeneous, composed of

Table 6
Essential oils/amphotericin B interactions.

Essential oils		^a A22	^b G20
<i>O. glandulosum</i>	^c FIC of <i>O. glandulosum</i>	0.25	1
	FIC of Amphotericin B	0.25	0.248
	^d FICI	0.50	1.248
	Interpretation	Synergic	Indifferent
<i>A. verticillata</i>	FIC of <i>A. verticillata</i>	0.50	0.25
	FIC of Amphotericin B	0.25	0.50
	FICI	0.75	0.75
	Interpretation	Additive	Additive
<i>S. satereioides</i>	FIC of <i>S. satereioides</i>	0.25	2
	FIC of Amphotericin B	0.50	1
	FICI	0.75	3
	Interpretation	Additive	Indifferent

^a A22: *C. albicans* strain 22.

^b G20: *C. glabrata* strain 20.

^c FIC: Fractional inhibitory concentration.

^d FICI: Fractional inhibitory concentration index.

yeasts cells, pseudohyphae, and hyphae.

The treatment with *O. glandulosum* essential oil results in a noticeable reduction in the cell density of biofilms.

4. Discussion

Candida albicans is recognized as the main etiological agent of oral candidiasis, however other *Candida* species such as *C. glabrata* are increasingly involved, either alone or in association with *C. albicans* (Tati et al., 2016). Oral Infections with mixed-species are increasing in occurrence and are frequently severe and difficult to treat. In this study, we evaluated the antifungal potential of essential oils obtained from three Algerian endemic medicinal plants to prevent and treat infections and biofilms formed by *C. albicans* and *C. glabrata*. Our finding indicated that the three essential oils tested in the present study had a good antifungal effect against planktonic cells of *C. albicans* and *C. glabrata* with MIC values ranging between 250 µg/mL and 1000 µg/mL. More importantly, the studied essential oils were able to inhibit and eradicate biofilms of both species in mono and mixed species cultures with MBICs ranging from 500 to 1000 µg/mL and MBECs of 1000 µg/mL. In addition, *O. glandulosum* essential oil synergized with amphotericin B against *C. albicans* (FICI= 0.50).

In order to reveal the molecules responsible for the antifungal and antibiofilm activities of the studied essential oils, we carried out GC and GC-MS analyses to characterize the chemical composition of *O. glandulosum*, *A. verticillata*, and *S. satereioides*. The results showed that the studied essential oils are constituted mainly by monoterpenes while other molecules such as sesquiterpenes are present in low amounts. The chromatographic analysis of *O. glandulosum* essential oil revealed that thymol (38.36 %), γ-terpinene (24.36 %), and p-cymene (18.33 %) are the major compounds. Our findings are qualitatively in agreement with those found earlier (Bekhechi, Atik-Bekkara, & Abdelouahid, 2008; Zakaria Nabti et al., 2020). In contrast, carvacrol was reported as the main compound in other Algerian samples (Ruberto, Baratta, Sari, & Kaabeche, 2002; Zakaria Nabti et al., 2020). Another study using *O. glandulosum* essential oils from three Tunisian provenances found p-cymene (36 %, 40 % and 46 %) and thymol (32 %, 39 % and 18 %) as the major components of the essential oils (Mecherghi et al., 2010).

The analysis of *A. verticillata* essential oil reveals the presence of thymol (48.99 %) in high amount followed by p-cymene (15.94 %) and Limonene (15.41 %). These results are consistent with that found by Attou, Davenne, Benmansour, and Lazouni (2017). Senouci, Benyelles, Dib, Costa, and Muselli (2020) were found high concentration of carvacrol (44.3 %), limonene (19.3 %) and p-cymene (19.2 %). In another study, Tefiani et al. (2015) identified Cuminal alcohol (44 %), p-cymene (18 %), and limonene (14 %) as the principal constituents of the oil.

Regarding *S. satereioides* essential oil, borneol (27.36 %) was identified as the main compound followed by thymol (20.01 %) and α-terpineol (19.38 %). This finding is qualitatively similar to that reported in literature (Bendahou et al., 2008). Conversely, α-terpineol was detected as the major constituent in other samples (Biondi et al., 2006). Moreover, Ammar et al. (2020) reported comparable amounts of thymol and α-terpineol (25.6 % and 24.6 %, respectively).

The chemical composition among specimens of the same species may vary according to several factors including geographical origin, climatic conditions, season, and part of the plant (Swamy et al., 2016).

Fluconazole is among the first-line antifungal therapies used for the treatment of oral candidiasis owing to its low toxicity, high efficiency and good tolerance. However, the widespread consumption of this drug has contributed significantly to the emergence of resistant strains (Whaley et al., 2017). Essential oils represent one of the most promising approaches for combating fungal infections (Nazzaro et al., 2017). Numerous researches have reported the antifungal activity of essential oils and their constituents. In this study, the essential oils of *O. glandulosum*, *A. verticillata*, and *S. satereioides* were screened for their

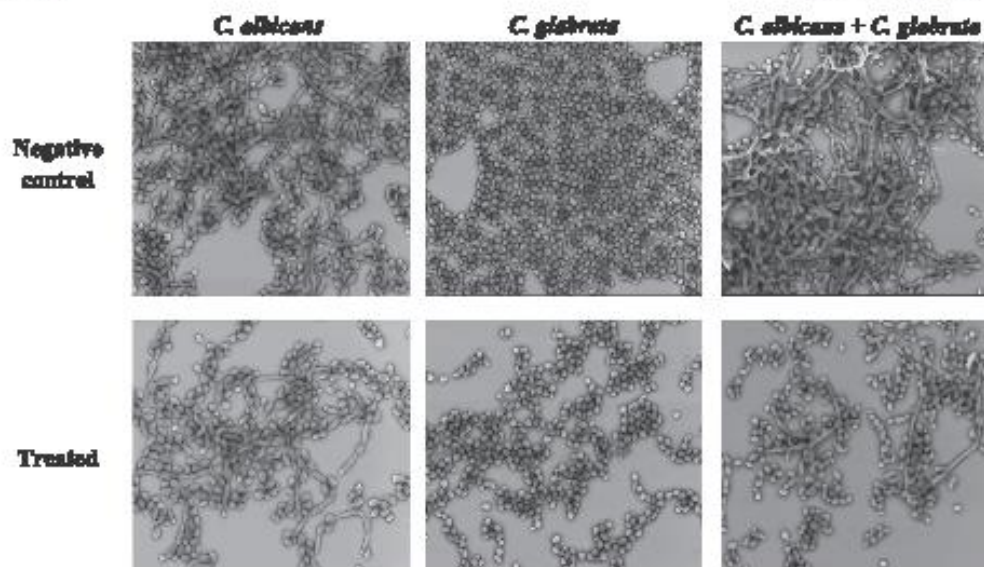


Fig. 1. SEM images showed the effect of *O. glandulosum* essential oil at $1 \times \text{MIC}$ on preformed single and mixed biofilms formed by *C. albicans* and *C. glabrata*.

antifungal efficacy against oral isolates of *C. albicans* and *C. glabrata* planktonic cells. According to [Alijannis et al. \(2001\)](#), an essential oil with MIC value up to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. is considered a strong antimicrobial agent; while values between 600 and 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. moderate agent; and weak agent if MIC values exceed 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Therefore, the studied essential oils are considered of strong antifungal activity. To date, only a few studies have focused on the anticandidal potential of these essential oils. [Bendahou and Maselli \(2008\)](#) investigated the anticandidal activity of *O. glandulosum* essential oil growing in Algeria against the reference strains of *C. albicans* IPP 444 and *C. albicans* 9036 and found a very strong anticandidal activity with MIC values of 36 and 57 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. For *A. verticillium* essential oil, [Attou et al. \(2017\)](#) reported that concentration of 0.78 $\mu\text{L}/\text{mL}$ could inhibit the growth of *C. albicans* ATCC 10231. Regarding *S. saharensis* essential oil, [Bendahou et al. \(2008\)](#) reported a MIC value of 5316 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against a clinical strain of *C. albicans*. The variability in antifungal potency between essential oils of the same plant species could be ascribed to seasonal and geographic factors ([Celik et al., 2007](#)). The comparison between the susceptibility of fluconazole susceptible and resistant *C. albicans* to the studied essential oils showed no significant difference between them. This result allows us to assume that the mechanism of action of the three essential oils is independent of changes associated with resistance to fluconazole.

Candida species are known for their ability to form highly structured biofilms comprising multiple morphological forms including yeasts, pseudohyphae and hyphae ([Bandara et al., 2016](#)). Biofilms are defined as structured microbial communities firmly attached to a surface and embedded in a matrix of exopolymeric material ([Ramage, Saville, Thomas, & Lopez-Ribot, 2005](#)). Biofilms are estimated to be associated with over 80 % of microbial infections ([Davies, 2003](#); [Pierce et al., 2017](#)). The prevention and treatment of such infections are extremely difficult because of the high rate of recalcitrance and the intrinsic resistance of biofilms to antifungals ([Bandara et al., 2016](#)). Hence, the search for alternative molecules to substitute conventional drugs is of great interest. The present study evaluated the ability of the studied essential oils to inhibit and eradicate biofilms formed by *C. albicans* and *C. glabrata*. This is the first study evaluating the antibiofilm effectiveness of the three essential oils against *Candida* species.

The strains used in this work were firstly screened for their capacity

to produce biofilms. Variation in biofilm-forming ability was observed across the strains of the same species and between species. This variation is mainly due to the biological variability between the strains ([Hosida et al., 2018](#)). *C. albicans* biofilms yielded higher total biomass in comparison with *C. glabrata*. Similar results have previously been reported ([Bekkal Brikci Benhabib et al., 2021](#); [Silva et al., 2013](#)). Otherwise, [Pathak, Sharma, and Shrivastva \(2012\)](#) found that *C. albicans* produced less biofilm on acrylic surfaces than *C. glabrata*. Regarding mixed biofilm, synergistic interaction was observed between *C. albicans* and *C. glabrata* when combined. According to [Ramage et al. \(2009\)](#), *C. albicans* plays a key role in the development of this biofilm by providing attachment sites and a stable structure for *C. glabrata* to attach to. Also, [Silva et al. \(2013\)](#) suggested that the differences existing between *C. albicans* and *C. glabrata* including relative cell size, morphology, and biochemistry limit the extent of inter-species competition, allowing the organisms to occupy similar niches.

In the present study, the sub-inhibitory concentrations of the essential oils used were effective in inhibiting single-species biofilm formation of *C. albicans* and *C. glabrata*. Furthermore, at the same concentrations, the essential oils were able to prevent the formation of mixed biofilm, even though some studies have reported that the presence of the two species together within a biofilm enhances their resistance compared to when grown separately ([Silva et al., 2013](#)). These interesting results may be attributed to the richness of the oils on monoterpenes, which are known for their biofilm inhibition potential ([Karpinski et al., 2021](#)). The precise mechanisms underlying terpenoid-mediated biofilm inhibition remain elusive. It is speculated that plant extracts or molecules may act by repressing specific genes such as ALS1, ALS3, and HWP1 that are important for biofilm formation ([Raut et al., 2013](#)). Previous report demonstrated that farnesol, a terpenoid compound produced by *C. albicans* and plants, inhibited the germination of yeast cells into mycelia and biofilm formation. Farnesol suppresses the expression of morphology-specific genes such as HWP1 (hyphal wall protein 1) necessary for the formation of biofilm ([Ramage et al., 2002](#)). Similarly, [Hsu et al. \(2013\)](#) demonstrated that linalool, a terpenic alcohol, block *C. albicans* biofilm formation by interfering with the morphological switch. Furthermore, in a recent study conducted by [Benzaid et al. \(2019\)](#), indicated that the essential oil of *Mentha piperita*

was able to decrease the expression HWP1, which prevent the formation of biofilm by *C. albicans*.

After verifying their effect on biofilm development, we investigated the ability of the three essential oils to eradicate preformed single and mixed-species biofilms. It has been acknowledged that preformed biofilms are notoriously difficult to eradicate by conventional antifungals (Braga et al., 2008). In our study, the studied essential oils were found to be effective in disrupting preformed biofilms. However, the biofilm eradication activity of these oils was less effective than inhibiting biofilm formation. A possible explanation might be attributed to the shielding effect of the extracellular matrix which restricts the entry of antimicrobial agents into the biofilm. This could be primarily because of the absorption or reaction of the antimicrobial agent within extracellular matrix components and to limitation of diffusion due to the 3-dimensional structure of the biofilm matrix, consequently, the antimicrobial agent cannot reach the innermost fungal cells of the biofilm (Chatrath et al., 2019).

Disruption of preformed biofilms by *O. glandulosum* essential oil was also confirmed with microscopic observations. As depicted in Fig. 1, the control *C. albicans* biofilm comprised of yeast cells, pseudohyphae and hyphae. In contrast, the biofilm developed by *C. glabrata* was exclusively composed of yeast cells. Similar findings were reported by Seneviratne et al. (2009). SEM images confirmed also the synergistic interaction between the two species in mixed biofilm. This finding was in accordance with those of Silva et al. (2013) and Pesece et al. (2016). The treatment of preformed biofilms with MIC of *O. glandulosum* essential oil showed a decrease in aggregation of cells of the single and mixed biofilms.

Amphotericin B is considered the drug of choice for the treatment of candidiasis, but its toxicity has limited its clinical application (Zhu et al., 2021). In this regard, combination therapy with essential oils could be an effective strategy to minimize its toxic side effects (Silva F, 2011; Silva S, 2011). Therefore, the potential synergism of the studied essential oils with amphotericin B against *C. albicans* A22 and *C. glabrata* G20 was investigated in this study. To our knowledge, this is the first study investigating the combinatory effect of these essential oils and antifungal drugs. The combination of each essential oils with amphotericin B showed the occurrence of variable interactions including synergism, additive and indifferent, depending on the strain tested. No combination was found to be antagonistic. Only one synergistic effect was observed when amphotericin B and *O. glandulosum* essential oil were combined. The ability of essential oils to enhance antibiotics activity may be ascribed to the hydrophobic nature of essential oil components, which have the capability to interact with the membrane lipids leading to cell structure disruption and increased membrane permeability, allowing antibiotics to easily cross the membrane barrier, resulting in enhanced antimicrobial activity even at lower concentrations (Sand et al., 2010; Sikkeema et al., 1995).

5. Conclusion

The present study highlights the promising value of essential oils as alternative candidates in the treatment of single and mixed biofilms associated with *C. albicans* and *C. glabrata* infections, especially essential oil obtained from *O. glandulosum*, which is an endemic plant in Algeria. We found also that *O. glandulosum* essential oil was not only effective against *Candida* biofilms, but also it showed a synergistic interaction with amphotericin B, which can be exploited to reduce the toxic effect of amphotericin B. Future *in vivo* studies with these essential oils should be conducted to confirm their efficacy.

Ethical Approval

This study did not require ethics committee approval because the strains used were from the University Hospital of Tlemcen.

CRedit authorship contribution statement

Benziane Mohammed Yassine: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Writing the original draft, Final approval of the version to be submitted. Bendahou Mourad: Conception and design of the study, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Fethi Benbelaid: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Abdelmounaim Khadir: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Hanane Belhadef: Acquisition and analysis of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Asma Benaisa: Acquisition of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Saida Ouslimani: Acquisition of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Fatma Mahdi: Acquisition of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted. Alain Muselli: Acquisition and analysis of data, Critical revision of the manuscript, Final approval of the version to be submitted.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This work is supported by the Algerian University research project (PRFU) under grant Number (D01N01UN130120180002) and the General Directorate for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT), Algeria.

References

- Adams, R. P. (2009). *Identification of essential oil compounds by gas chromatography and mass spectrometry* (Fourth ed.). Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- Alkpen, A. (2002). Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, 78(922), 455–459. <https://doi.org/10.1136/pgmj.78.922.455>
- Aljazeera, N., Kalpoutzaki, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>
- Annar, S., Noui, H., Djamel, S., Madani, S., Maggi, F., Bruno, M., & Bendil, G. (2020). Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Arisaema compositifolium*, *Pulicaria arabica*, and *Succowalax austroafricana*) as new botanical insecticides? *Environmental Science and Pollution Research*, 27(21), 26594–26604. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09964-w>
- Aitou, A., Davenne, D., Benmansour, A., & Lazouzi, H. A. (2017). Chemical composition and biological activities of *Artemisia verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytotherapy*. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1108-1>
- Bandaru, H., Matzbars, V. H., & Samarasayake, L. P. (2016). Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 15(3), 299–318. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268530>
- Bekhechi, C., Aïik-Bekkar, F., & Abdelouahid, D. E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytotherapy*, 6(3), 153–159. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0310-6>
- Bekhal Brikci Benhabib, O., Bouchent-Ottmani, Z., Boucherit, K., & Djedjat, C. (2021). Interaction in a dual-species biofilm of *Candida albicans* and *Candida glabrata* co-isolated from intravascular catheter. *Microbial Pathogenesis*, 152, Article 104613. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104613>
- Bendahou, M., Benyoucef, M., Muselli, A., Desjober, J. M., Paolini, J., Bernardini, A. F., & Costa, J. (2008a). Antimicrobial activity and chemical composition of *Succowalax austroafricana* Cass. et Dur. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 287. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9699984>
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjober, J. M., Bernardini, A. F., & Costa, J. (2008b). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.050>
- Benyoucef, F. (2020). Synergistic effects of essential oils of *Artemisia verticillata* and *Satureja candelabrum* against many pathogenic microorganisms. *Anti-Infective Agents*, 18(1), 72–78. <https://doi.org/10.2174/221135320y18010702020>

- Bernold, C., Belmadari, A., Djedjibi, R., & Bouabhis, M. (2019). The effects of *Mentha × piperita* essential oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm formation, and the expression of secreted aspartyl proteinases genes. *Antibiotics*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010010>
- Biondi, D. M., Sari, M., Ghani, Z. A., & Ruberto, G. (2006). Essential oil of Algerian *Saccharomyces cerevisiae* Com. et Durian. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(3), 546–548. <https://doi.org/10.1002/ffj.1661>
- Bouasla, A., & Bouasla, I. (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytotherapy Research*, 36, 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.007>
- Braga, P. C., Colici, M., Alfieri, M., & Dal Sasso, M. (2008). Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(5), 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.013>
- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Colikas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukun, F. V., Ozek, T., & Baser, K. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.011>
- Chaturvedi, A., Gangwar, R., Kumar, P., & Prasad, R. (2019). In vitro anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. *Journal of Fungi*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.3390/jof5010013>
- CLSI. (2002). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard-second edition. CLSI document M27-A2*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.023431>
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Edris, A. E. (2007). Pharmacological and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308–323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
- El-Tarabily, K. A., El-Saadany, M. T., Alagawany, M., Arif, M., Batha, G. E., Khafaga, A. F., ... Abd El-Hack, M. E. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5145–5156. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.033>
- European Pharmacopoeia 6.0 (2008). Determination of essential oils in herbal drugs. Strasbourg: EDQM.
- Fleming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Ghorghe, D. C., Nicolae, A. G., Biric, A. G., & Grumazescu, A. M. (2021). Biomaterials for the Prevention of Oral Candidiasis Development. *Pharmaceutics*, 13(6), 803. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060803>
- Herrero-Bermelo, I., Gómez-Casanova, N., Quintana, S., Soliveri, J., de la Mata, F. J., Pérez-Serrano, J., ... Copa-Patiño, J. L. (2020). In vitro activity of carbosilane cationic dendritic molecules on prevention and treatment of *Candida albicans* biofilms. *Pharmaceutics*, 12(10), 918. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100918>
- Hosida, T. Y., Cavazzana, T. P., Henriques, M., Pessan, J. P., Delbem, A. C. B., & Monteiro, D. R. (2016). Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. *Mycoses*, 61(4), 270–276. <https://doi.org/10.1111/myc.12738>
- Hsu, C. C., Lai, W. L., Chang, K. C., Lee, M. H., & Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linoleal against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 51(5), 473–482. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.743051>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Karpiński, T. M., Otrawski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Wolicki, H., & Adamczak, A. (2021). plant preparations and compounds with activities against biofilms formed by *Candida* spp. *Journal of Fungi*, 7(3), 360. <https://doi.org/10.3390/jof7030360>
- König, W. A., Joulain, D., & Hochmuth, D. H. (2004). *Terpenoids and related constituents of essential oils*. Hamburg, Germany: Library of MassFinder.
- Lacour, H., Akkal, S., Debarnot, C., Carnard, B., Meierhenrich, U. J., & Baldovali, N. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Saccharomyces cerevisiae* Com. et Dur. *Natural Product Communications*, 1(0). <https://doi.org/10.1177/193457800600100809>
- Li, L., Redding, S., & Dongqi-Bagtzoglou, A. (2007). *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, 86(3), 204–215. <https://doi.org/10.1177/154405910708600304>
- Mayer, F. I., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mechargi, K., Godho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhdchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glavdolonum* (Desf.) letourneau from Tunisia: Chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1745–1749. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4011>
- Mulyasingh, S., Sporer, P., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Excoecaria glabrus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytotherapy Research*, 17(13), 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.06.018>
- Nazzaro, F., Pratianni, F., Coppola, R., & Pao, V. D. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceutics*, 10(4), 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, Article e2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Pathak, A. K., Sharma, S., & Srivastava, P. (2012). Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *Journal of Applied Oral Science*, 20(1), 70–75. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000100013>
- Peixoto, L. R., Rosalen, P. L., Ferreira, G. L. S., Freitas, L. A., de Carvalho, F. G., Castellano, L. R., & de Castro, R. D. (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, 73, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.013>
- Pose, S., Aranganamwat, C., Tancharoenkijit, S., Muarmai, S., Sirivan, P., Bulphawan, M., & Tanareerchai, N. (2016). In vitro activity of Caspofungin combined with Fluconazole on mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilm. *Medical Mycology*, 54(4), 384–393. <https://doi.org/10.1093/mmy/nyw188>
- Pierce, C., Uppahri, P., Triatan, A. R., Wornley, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols*, 3(9), 1494–1500. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>
- Pierce, C., Vila, T., Romo, J., Morcillo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., & Lopez-Ribot, J. L. (2017). The *Candida albicans* biofilm matrix composition, structure and function. *Journal of Fungi*, 3(1), 14. <https://doi.org/10.3390/jof3010014>
- Quintol, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 340–355. <https://doi.org/10.3109/104084109032841436>
- Ramage, G., Seville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2005). *Candida* biofilms: An update. *Bacteriologic Cell*, 4(4), 633–638. <https://doi.org/10.1128/BC-4.4.633-638.2005>
- Ramage, G., Seville, S. P., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5459–5463. <https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5459-5463.2002>
- Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M., & Mohan Karuppaiyil, S. (2013). Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1), 87–96. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.749398>
- Ruberto, G., Basatta, M. T., Sari, M., & Kaubiche, M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 251–254. <https://doi.org/10.1002/ffj.1101>
- Saad, A., Fadl, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N. E., & Hassani, L. (2010). Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazole. *Phytotherapy Research*, 17(13), 1057–1060. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.03.020>
- Semerátrine, C. J., Silva, W. J., Jin, L., Samarasayake, Y., & Samarasayake, L. (2009). Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 54(11), 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.06.002>
- Senouci, H., Benyelles, N. G., Dib, M. E., Costa, J., & Mzaidi, A. (2020). Aromatis verticillate essential oil as biocontrol agent of selected fungi and pest of olive tree. *Recent Patents on Food Nutrition & Agriculture*, 11(2), 182–188. <https://doi.org/10.2174/2212798410566190619110251>
- Serra, E., Hidalgo-Bastida, L., Verran, J., Williams, D., & Malic, S. (2018). Antifungal activity of commercial essential oils and biofilms against *Candida albicans*. *Pathogens*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010015>
- Shanahan, D. J., Brown, S. D., Pfaller, M. A., Wernock, D. W., Rex, J. H., Chaturvedi, V., ... Walsh, T. J. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute M44-A2.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201–222. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.201-222.1995>
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D. I., & Domingues, F. C. (2011a). Antifungal activity of *Cortaderia arbuscula* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytotherapy Research*, 19(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.033>
- Silva, S., Henriques, M., Hayes, A., Oliveira, R., Azeredo, J., & Williams, D. W. (2011b). *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 40(5), 421–427. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00981.x>
- Silva, S., Pires, P., Monteiro, D. R., Negri, M., Gorup, L. F., Camargo, E. R., ... Azeredo, J. (2013). The effect of silver nanoparticles and zyxstatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Medical Mycology*, 51(2), 178–184. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.700492>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Svabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Sweeny, M. E., Akhtar, M. S., & Simriah, U. B. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2016/2012462>

- Tati, S., Davidow, P., McCall, A., Hwang-Wong, E., Rojas, I. G., Coenack, B., & Edgerton, M. (2016). *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal candidiasis. *PLoS Pathogens*, 12(3), Article 1005522. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005522>
- Tefiani, C., Bisci, A., Youcef, F., Azza, S., Gago, C., Faleiro, M., ... Miguel, M. (2015). *Arenaria psille* (Apiaceae) and *Thymus maritimus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Research*, 27(2), 131–139. <https://doi.org/10.1069/j0412995.2015.1066739>
- Vitale, R. G., Afedra, J., & Duracoz, E. (2005). Antifungal combinations. In E. J. Ernst, & P. D. Rogers (Eds.), *Antifungal Agents* (pp. 143–152). Humana Press. <https://doi.org/10.1305/j-59259-943-5-143>
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
- Zakaria Nabli, L., Sâhli, F., Lacour, H., Olowo-Obare, A., Nkuimi Wandjio, J. G., & Maggi, F. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from the Algerian endemic *Origanum glandulosum* Desf. against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli* isolates. *Antibiotics*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010029>
- Zhu, C., Liao, B., Ye, X., Zhou, Y., Chen, X., Liao, M., ... Ren, B. (2021). Artemisinin elevates ergosterol levels of *Candida albicans* to synergize with amphotericin B against oral candidiasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(3), Article 106394. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106394>

Communications

Benziane Mohammed Yassine, Bendahou Mourad, Benbelaid Fethi, Khadir Abdelmounaim, Belhadeh Hanane, Benaissa Asma, Ouslimani Saida, Mahdi Fatima. *Origanum glandulosum* essential oil: A promising natural antifungal agent against *Candida albicans*. 1st International Colloquium On ‘Surface Hygiene in Hospital and Agrifood Environment. **2023**, Tlemcen. Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Benbelaid Fethi, Khadir Abdelmounaim, Ouslimani Saida, Benaissa Asma, Mahdi Fatima, Bendahou Mourad. Antifungal activity of *Saccocalyx satureioides* essential oil against clinical isolates of *Candida glabrata*. 1st International Seminar on Green Biotechnology and Food Security. **2022**, Khenchela. Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Khadir Abdelmounaim, Benbelaid Fethi, Bendahou Mourad. Antifungal activity of *Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. essential oil against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. International Online Conference on Valuation of Alternative Plants, Degraded & Marginal Lands. **2022**, El- Oued, Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Khadir Abdelmounaim, Benbelaid Fethi, Ouslimani Saida, Mahdi Fatima et Bendahou Mourad. Antifungal and anti-biofilm activity of *Ammoides verticillata* essential oil against *Candida albicans*. 1ere Journée nationale sur l’Agroalimentaire et Microbiologie de l’Environnement. **2022** , Khemis Miliana. Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Benbelaid Fethi, Khadir Abdelmounaim, Belhadeh Hanane, Ouslimani Saida, Mahdi Fatima, Benaissa Asma, Bendahou Mourad. Species identification and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species isolated from the oral cavity of Algerian patients suffering from leukemias and lymphomas. International Microbiology webinar. **2022**, Bejaia. Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Khadir Abdelmounaim, Benbelaid Fethi, Benaissa Asma, Ouslimani Saida, Mahdi Fatima et Bendahou Mourad. *In vitro* Antifungal activity of *Saccocalyx satureioides* coss. & dur. essential oil against clinical isolates of *Candida* species. The second National Biodiversity Day on the Diversity of local plant resources in arid and semi-arid regions: Application and perspectives. **2022**, Ouargla. Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Belhadeh Hanane, Khadir Abdelmounaim, Mahdi Fatima, Ouslimani Saida, Bendahou Mourad. Frequency of bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies at university hospital of Tlemcen. 1st International Symposium Extremophilic Prokaryotes From Diversity to Biotechnology ISEP-2019, Tlemcen. Algeria.

Benziane Mohammed Yassine, Messaoud Chahrazed. , Khadir Abdelmounaim, Ouslimani Saida, Mahdi Fatima, Chlaghma Widad, Bendahou Mourad. Contribution au diagnostic des infections urinaires à *candida* au CHU de Tlemcen. (Application d'extraits naturels). Workshop national Sur l'Hygiène des Process Agroalimentaires (SAFOOD 2). 2019, Tlemcen. Algérie