REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE

L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHESCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DEBIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biochimie

Option : **Biochimie appliquée**

Thème

Activité anti-biofilm de l'huile essentielle commercialisée de *Salvia sclarée* contre trois souches de *Candida albicans*

Réalisé par

HAMOUCHE Rania

SAIB Souad

Promoteur : Pr. HOUALI Karim

Co- Encadreur : SAOUDI Bilal

Membres du jury

Dr. Iratni Ghenima	Maitre de Conférences A	présidente	UMMTO
Dr. Ouzid Yasmina	Maitre de Conférences A	examinatrice	UMBB

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous voudrions dans un premier temps remercier, monsieur ***HOUALI Karim****, professeur à UMMTO qui nous a fait l'honneur de nous encadrer, pour nous avoir ouvert les portes du Laboratoire de recherche de Biochimie Approfondie et de Biotechnologie,*

Nous tenons à témoigner toute nos reconnaissances aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

Monsieur ***Saoudi Bilal,*** *doctorant à UMMTO qui a partagé ses connaissances et expériences dans ce milieu, ses encouragements, sa présence et sa surveillance durant la réalisation de mémoire.*

Madame ***Iratni Ghenima****, Maitre de Conférences A à UMMTO qui nous a honoré de sa présence comme présidente de jury.*

Nos remerciements les plus distingués à Madame ***OUZID Yasmina****, Maitre de Conférences A à UMBB qui nous a donné de son précieux temps afin d'examiner cette réalisation.*

Dédicace

Ce modeste travail est dédié spécialement

A ma chère maman , ma raison de vivre, en témoignage de ma

reconnaissance pour sa patience, son amour et ses sacrifices.

A mon cher papa pour son amour et son dévouement

«A vous ma famille, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui.Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respect, mes considérations et ma grande admiration pour vous.Puis ce travail vous témoigne mon affection et mon profond amour»

A mes chères soeurs Sylia et Malak RIM pour leur encouragement , à mon frére ANIS mon soutien et mon épaule qui a sacrifier avec moi durant mon cursus.

A vous mes oncles et mes tantes , cousins et cousines , qui je le sais, ma réussite est trés importante à leurs yeux

A ma chatte Nilophére qui me soulage durant mes périodes les plus difficiles

Rania

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à tous ce qui me sont chers,

A ma très chère mère

Je ne pourrai jamais te remercier à la hauteur de ce que tu as fait pour moi, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager depuis toutes ces années, j'espère qu'à la lecture de ce manuscrit, tu seras fière de ce qu'a accomplit ta grande fille.

A mon oncle, qui n'a pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir durant mon cursus.

A mon frère Azouaou et ma petite sœur Amel, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A tous mes amies surtout Tarik, Yacine, Yasmine, Kahina et Dyhia qui m'ont toujours soutenues et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire, en leurs espérant bonne continuation dans leurs travaux.

Un dédicace tout particulier à ma super promotion de Master 2 en Biochimie appliquée. Ces dernières années ont été riches en belles émotions sur beaucoup de plan, j'en garde des souvenirs impérissables.

Et enfin, ma binôme Rania, merci pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de ce projet.

Souad

Table de matière

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux
Résumé
Abstract

Synthèse bibliographique
Chapitre 01 : *Candida albicans*

1.*Candida albicans*....4
1.1. Introduction....4
1.2. Taxonomie....4
1.3. Description morphologique....5
1.4. Structure cellulaire....5
1.4.1. Membrane plasmique....6
1.4.2. La paroi....6
1.5. Reproduction....7
1.5.1. Reproduction asexuée....7
1.5.2. Reproduction parasexuée....7
1.6. Caractères biochimiques et culturaux....7
2.biofilm....8
2.1.Le biofilm chez *Candida albicans*....8
2.2. La composition du biofilm de *Candida albicans*....9
2.2.1. La matrice extracellulaire....9
2.3.Le mécanisme de formation de biofilm chez *Candida albicans*....9
2.3.1. L'adhésion....10
2.3.2. La prolifération....10
2.3.3.La maturation....10
2.3.4.La dispersion....10
- Quorum sensing....11

2.4.Résistance du biofilm de *Candida albicans*....12
2.5.Impacte de biofilm de *C.albicans* sur la santé humaine....12.

Chapitre 02: Huile esssentielle

1. Huile essentielle....15
1.1.Introduction....15
1.2.Composition chimique....15
1.2.1. Les terpènes....15
1.2.2. Les composés aromatiques....17
1.3.Méthodes d'extraction des huiles essentielle....18
1.3.1.Extraction par entraînement à la vapeur d'eau....18
1.3.2.Extraction par hydrodistillation....18
1.3.3.Extraction assisstée par micro-onde....18
1.3.4.Extraction par fluide à l'état supercritique....18
2. La sauge sclarée (*Salvia sclarea)*....19
2.1.Description botanique....19
2.2.Classification botanique....20
2.3.Les différentes dénomination....21
2.4.Air de répartition et utilisation traditionnelle....21
2.5.Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge....21
2.6.Activités biologiques de l'huile essentielle de *Salvia sclarea*....22
2.6.1.Activité anti-inflamatoire....22
2.6.2.Activité cytotoxique....22

Partie expérimentale
Materiels et méthodes

1.Materiels et méthodes....26
1.1.Materiel végétale....26
1.2.Les souches fongiques....27
1.2.1.Isolment des souches....27
- Souche ATCC....27
- Souche *Candida albicans* 07 et 08....27

1.2.2. Identification des souches clinique....27

Table de matière

1.2.2.1. Aspect macroscopique 28
1.2.2.2. Aspect microscopique 28
- Le test de tube germinatif (blastèse) 28
- Coloration de Gram 28

1.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI 29
1.4. Test de formation de biofilm 30
1.5. Détermination de l'activité anti-biofilm 31
1.5.1.Inhibtion du biofilm 31
1.5.2.Eradication du biofilm formé par trois souches 32

Résultats et discussions

1.Test d'identification des souches cliniques 35
1.1. Test macroscopique 35
1.2. Test microscopique 36
2.Détermination des concentrations minimales inhibtrices 37
3.Test de formation de biofilm 37
4.Activité anti-biofilm 38
4.1. Inhibition de la formation du biofilm 38
- La phase d'adhésion 40
- La phase de prolifération 40
- La phase de maturation 40

4.2. Eradication du biofilm préformé 40

Conclusion 43
Réferences bibliographiques
Annexes

Liste des abréviations

Als : agglutinin -like sequence.

ATCC : American Type Culture Collection.

Saps : proteines aspartique sécrétées.

Ywp1p : yeast wall protein 1.

SFE : extraction par fluide supercritique.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

CTT : Chlorure de triphényl tétrazolium.

PBS : phosphate buffer saline.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

Liste des figures

Figure 01 : la morphologie de *Candida albicans*……...5

Figure 02 : structure de la membrane et de la paroi de la cellule de *Candida albicans*……7

Figure 03 : La composition de la matrice extracellulaire de biofilm des *Candida albicans* …9

Figure 04 : Le mécanisme de formation de biofilm chez *Candida albicans*……...11

Figure 05 : structure chimique de certains composés terpénique ……...16

Figure 06 : oxydation des terpénoïdes…….17

Figure 07 : structure chimique des phenylpropanoïdes ……..17

Figure 08 : la sauge sclarée…….20

Figure 09: Isolement et revivification de la souche ATCC 10237…….27

Figure 10 : Isolement et revivification des souches cliniques (*Candida* 7/8)……..27

Figure 11 : Coloration de Gram des souches cliniques (*Candida* 7/8)……29

Figure 12 : schéma de la microplaque utilisée pour la détermination des CMIs…….30

Figure 13 : schéma de la microplaque de formation de biofilm …….31

Figure 14 : schéma de la microplaque d'inhibition de biofilm formé par les trois souches…32

Figure 15 : schéma de la microplaque d'éradication de biofilm formé par les trois souches …… 33

Figure 16 : aspect macroscopique des trois souches de *Candida albicans* sur gélose Sabouraud …….35

Figure 17 : observation microscopique (objectif ×100) des trois souches testées après coloration de Gram ……..36

Figure 18 : observation microscopique (objectif ×100) de tube germinatif formé par les souches testées …….36

Figure 19 : les résultats des CMIs des trois souches testées ……...37

Figure 20 : les pourcentages d'inhibition et d'éradication du biofilm des différentes souches testées …….39

Liste des tableaux

Tableau I : aspect des colonies de *Candida albicans* ……8

Tableau II : molécules de quorum sensing…….12

Tableau III : les molécules responsables des activités biologiques chez *Salvia sclarea*…….23

Tableau IV : aspect des colonies des trois souches testées……..35

Tableau V : la formation de biofilm chez les souches testées……..38

Résumé

Les biofilms sont le monde de vie majoritaire pour la plupart des micro-organismes. Ils représentent un sérieux problème pour la santé publique et leur éradication devient de plus en plus compliquée à cause de leurs résistances au traitements antifongiques. Le but de notre étude est de tester l'effet de l'huile essentielle commercialisée de *Salvia sclarea* sur trois souches de *Candida albicans* dont deux sont cliniques.

Tout d'abord, les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) ont été évaluées par la méthode de micro-dilution, puis, l'activité anti-biofilm a été déterminée par la méthode du Cristal violet. Les résultats ont révélés une CMI de 7,18 mg/ml pour les deux souches cliniques (*Candida* 7/8) et de 9,57 mg/ml pour la souche *Candida albicans* ATCC 10237. Enfin, l'évaluation de l'activité d'inhibition et d'éradication du biofilm a révélé que la souche clinique *Candida* 07 présentait le pourcentage d'inhibition (26,79 %) le plus élevé, tandis que la seconde souche clinique *Candida* 08 présentait le pourcentage d'éradication (16,16 %) le plus élevé.

L'huile essentielle de *Salvia sclarea* exerce un effet curatif et préventif sur le mécanisme de formation du biofilm.

Mots clés : Activité anti-biofilm, *Candida albicans*, Biofilm, *Salvia sclarea*, huile essentielle, molécules bioactives.

Abstract

Biofilms are the main mode of life for most microorganisms. It represents a serious health problem public and their eradication become more and more complicated because of their resistance to antifungal treatments. The aim of our study is to test the effect of commercial Salvia sclerae essential oil on three strains of *Candida albicans* of which two are clinicals.

First of all, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were evaluated by microdilution method. Then, anti-biofilm activity was determined by Crisal violet method. The results revealed a value of 7.18 mg/ml for the two clinical strains and 9.57 mg/ml for the ATCC strain. Finally, the evaluation of biofilm inhibition and eradication activity revealed that the clinical strain 07 (26,97%) showed the highest inhibition percentage, while the second clinical strain Candida 08 (16,16%) showed the highest eradication percentage the highest.

Salvia sclarea essential oil exerts a curative and preventive effect on the biofilm formation mechanism.

Keywords : Anti-biofilm activity, *Candida albicans,* Biofilm, essential oil, *Salvia sclarea*,bioactif molecule

Introduction générale

La formation des biofilms est une caractéristique commune pour la majorité des micro-organismes (Ponde *et al*., 2021) . Parmi les souches de levures formatrices du biofilms, *Candida albicans* représente un cas d'étude assez complexe en raison de sa capacité d'exprimer plusieurs facteurs de virulence, tel que la transition morphologique pour donner naissance à des structures filamenteuses, qui sont souvent impliquées dans des pathologies (Chen *et al.*, 2020).

Les infections liées aux biofilms de *Candida albicans*, est une préoccupation majeure en raison de la multiplication de nombre de patients fragiles (multi-opérés, immunodéprimés), des problèmes de résistance aux médicaments classiques et de la cytotoxicité des antifongiques (Atriwal *et al.*, 2021 ; Lopes et Lionakis, 2022 ; Kim *et al*., 2023). Par conséquent, la recherche de nouveaux antifongiques naturels s'est avérée nécessaire et s'est orientée vers les molécules bioactives présente dans les plantes médicinales (Iseppi *et al*., 2020).

La « sauge sclarée » est l'une des plantes médicinales les plus connues. Elle est utilisée depuis la nuit des temps en cosmétologie, en pharmacologie et en médecine traditionnelle. Les différents constituants de l'huile essentielle de *salvia sclarea* lui confèrent plusieurs activités biologiques tel que l'activité anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne et anti-biofilm (Zhumaliyeva *et al*., 2023).

Afin de contribuer à la valorisation des vertus thérapeutiques de cette plante , nous nous sommes intéressés dans le présent travail, à l'étude de l'activité anti-biofilm de l'huile essentielle de *Salvia sclarea* (sauge). Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), au sein de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, département de Biochimie-Microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Les objectifs visés sont les suivants :

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle commercialisée de *Salvia sclarea.*

- Evaluation *in vitro* de l'activité anti-biofilm de l'huile essentielle de *Salvia sclarea* sur les biofilms formés par les souches de *Candida albicans* (la souche de référence et les deux souches cliniques).

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :

Candida albicans

1.1. Introduction

La découverte de *Candida albicans* n'est pas récente. En effet, Hippocrate avait signalé leur présence en tant que des agents causals du muguet aux 400 ans avant J.C, et leur premier isolement était en 1839 (Barnett, 2008). Ces organismes sont des levures ubiquitaires qui peuvent se retrouver dans l'environnement (air, sol, légumes, céréales…), ou également, vivre en commensales dans de nombreux sites, comme, le tube digestif, les vois génito-urinaires, les vois aériennes supérieures ou au niveau du revêtement cutané. De plus, ces microorganismes peuvent devenir des pathogènes opportunistes, et induire des infections aiguës (Candidoses) chez les personnes porteuses de dispositifs médicaux ou fatales chez les personnes immunodéprimés (Nobile et Johnson, 2015). Le terme *Candida* est utilisé pour décrire les robes blanches portées par les candidats au Sénat dans l'empire romain et « *albicans* » veut dire « blanchir » en latin (Mishra *et al*., 2021).

1.2. Taxonomie

Suite au développement de la biologie moléculaire, de nouvelles classifications au sein du règne fongique sont apparues. Parmi les nouvelles classifications, la naissance d'un sous-groupe appelé « clade CTG ».

Le clade CTG est caractérisé par une traduction inhabituelle de codant CTG en serine au lieu d'une leucine. Ce qui entraine une différence de polarité (sérine est hydrophile et la leucine est hydrophobe) conduit à une diversité de structure primaire et à une altération de la fonction des protéines. Cette traduction atypique affecte la survie des levures (Sugita et Takashima, 2011 ; Takashima et Sugita, 2022).

Selon McManus et Coleman, (2014), la classification des *Candida albicans* est :

Super-royaume : Eucaryota

Royaume : Champignon

Phylum : Ascomycota

Classe : saccharomycete

Ordre : Saccharomycetale

Famille : Sacchromyceae

Genre : *Candida*

Espèce : *Candida albicans*

1.3. Description morphologique

Candida albicans est un mycète qui peut exister en culture unicellulaire, en biofilm, et parfois en microcolonies. C'est un organisme polymorphe, qui peut se retrouver sous plusieurs états morphologiques (figure 01) de façon à ce qu'il s'adapte aux conditions nutritives et environnementales tel que les acides aminés, la N-acétylglucosamine, la température et le pH (Chow *et al*., 2021).

L'état courant de ces organismes est une levure unicellulaire de forme ronde à ovale, qui se divise d'une manière asexuée (Talapko *et al*., 2021). Elle peut se développer aussi sous forme filamenteuse, soit en hyphes ou en pseudohyphes (Kadosh et Mundodi, 2020) . Les hyphes sont des structures ramifiées, caractérisées par un assemblage de cellules pour former le filament mycélien. Par ailleurs, le pseudohyphe est un aspect filamenteux plus ramifié, composé de cellules allongées de forme elliptique qui possèdent des constrictions aux jonctions cellulaires (Jacobsen et Hube, 2017). Les *Candida albicans* peuvent se retrouvés également, sous la forme de cellules rondes et volumineuses, entourées d'une paroi épaisse. Cette morphologie est appelée « chlamydospores » (Cottier et Hall, 2020).

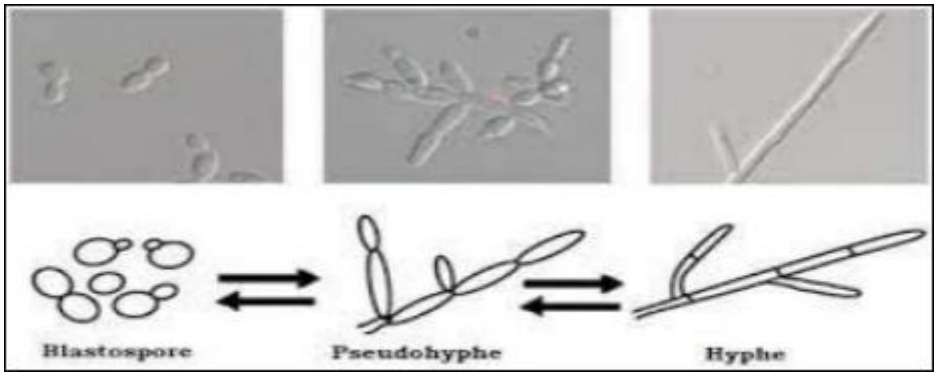


Figure 01 : la morphologie des *Candida albicans* (Thompson *et al*., 2011).

1.4. Structure cellulaire

Candida albicans est une cellule eucaryote (pourvue d'un noyau entouré d'une membrane nucléaire), le cytoplasme contient des organites telles que, le réticulum endoplasmique, appareil de golgi, mitochondrie et ribosome. C'est une levure non pigmentée (dépourvue de chlorophylle) et non capsulée (Prasad, 1993).

1.4.1. Membrane plasmique

La membrane plasmique des *Candida* est composée d'une bicouche de phospholipides riche en protéines liées et en stérols (Garcia-Rubio *et al*., 2020) . Chez *Candida albicans* le stérol majeur est l'ergostérol (un homologue du cholestérol), qui est synthétisé par lanostérol 14 α-déméthylase localisée au niveau du réticulum endoplasmique, et qui joue un rôle dans le maintien de l'intégrité, la rigidité et la fluidité de la membrane (Lv *et al.*, 2016).

1.4.2. La paroi

La cellule de *Candida*, comme toute cellule fongique, se caractérise par une forme et une stabilité mécanique, assurée par la présence d'une paroi qui entoure la membrane plasmique (figure 02) (Prasad, 1993). A la différence des cellules des mammifères, cette paroi est composée de 80-90% de polysaccharides tels que le glucane, la chitine, le chitozane et le mannane. Elle contient aussi des protéines, généralement, associées à ces polysaccharides (mannoprotéines). Elle apparait au microscope électronique sous forme d'une structure complexe multilamellaire composée (Garcia-Rubio *et al.*, 2020) :

- **une couche externe** : riche en protéine mannosylées formatrice d'un réseau de fibrille nommé fimbriae qui permettent l'adhésion aux glycosphingolipides des cellules épithéliales.
- **une couche interne:** contenant aussi, des mannoprotéines liés au complexe glucane-chitine et des mannanes qui sont moins rigides que le β- glucane, dont le rôle est la dissimulation des β-glucans à la détection immunitaire de l'hôte.
- **une zone centrale:** riche en β-(1,3) et β-(1,6) glucanes liés de manière covalente à la chitine pour permettre la liaison des couches .

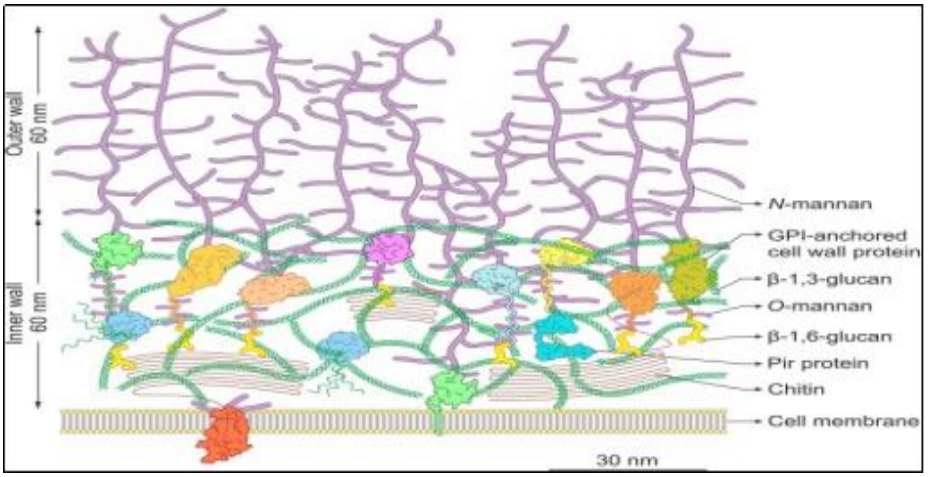


Figure 02 : Structure de la membrane et la paroi de la cellule des *Candida albicans* (Lenardon *et al*., 2020).

1.5. Reproduction

1.5.1. Reproduction asexuée

Candida albicans a été considéré pendant très longtemps comme un organisme diploïde (2N) asexuée par le phénomène de bourgeonnement, où chaque cellule mère (blastospore) donne naissance après division du noyau par simple mitose à une cellule fille identique (blastoconidie) (Talapko *et al.*, 2021) . Cette reproduction est dite clonale, car le matériel génétique n'est pas modifié d'une génération à l'autre (Sitterlé *et al*., 2019).

1.5.2. Reproduction parasexuée

La reproduction parasexuée des *Candida albicans* se déroule en deux étapes (figure 4), le « mating » qui est le contacte physique de deux cellules diploïdes entrainant la fusion des noyaux (caryogamie) pour donner naissance à un zygote (4N), et la réduction du concentré chromosomique contenu dans la cellule tétraploïde sans brassage génétique, mais, par simple perte aléatoire de chromosomes afin de revenir à l'état initial (2N) (Defosse *et al*., 2018).

1.6. Caractères biochimiques et culturaux

Comme tous les Ascomycètes, les *Candida albicans* sont dépourvues d'activité uréase, incapable d'assimiler l'inositol, mais capable d'assimiler la xylose, maltose et le galactose, ainsi que, de fermenter le glucose et le maltose. Ces levures se multiplient entre 20 à 40°C et a pH compris entre 3 et 8 (St-Germain,. 2021).

Le milieu standard le plus adapté à la culture de ce type des champignons est le milieu Sabouraud, rendu sélectif, par des antibiotiques (gentamicine/ chloramphénicol). Les colonies de *Candida albicans* se caractérisent par un aspect blanchâtre, crémeux, lisse et brillant et

d'un diamètre de 1-3 mm, après l'incubation de 24h à 37°C (Pihet et Marot, 2013). Le tableau I résume l'aspect des colonies de *Candida albicans* sur les différents milieux.

Tableau I : Aspect des colonies de *Candida albicans*

Le milieu de culture	Aspect des colonies	Référence bibliographique
Sabouraud	Blanches, crémeuses, lisses et brillantes	(Pihet et Marot, 2013)
Chromogénique	Vertes et pigmentées	(Scharmann *et al*., 2020)
Fluorogénique	Émettent une fluorescence blutée	(Pihet et Marot, 2013)

2. Biofilm

Le biofilm est un assemblage de micro-organismes et de cellules sessiles d'une morphologie différente, formant des petites colonies (agrégat) suite à une division cellulaire (Mishra *et al*., 2021). Ces amas de cellules formés, sont enrobés d'une matrice extracellulaire, qui s'adhère sur les surfaces biotiques (les tissus animaux et végétaux) ou abiotique (les cathéters, prothèses et valves) (Macias-Paz e*t al*., 2023 ; Malinovská *et al.,* 2023). Cette structure tridimensionnelle, confère ainsi, une protection contre les agents antimicrobiens, les cellules immunitaires et les conditions environnementales hostiles (Bonhomme et d'Enfert, 2013).

2.1. Les biofilms chez *Candida albicans*

Les *Candida albicans* sont considérés comme des levures pathogènes qui se caractérisent par plusieurs facteurs de virulence telle que la transition morphologique, sécrétion des enzymes hydrolytiques et aussi la capacité à former un biofilm (Talapko *et al.*, 2021).

Les mycètes type *Candida albicans* existent naturellement sous forme hétérozygote (a/α), cette configuration permet d'avoir un biofilm pathogène ou conventionnel imperméable, impénétrable aux cellules immunitaires et aussi aux anti- fongiques. Ce biofilm pathogène peut être monomicrobien c'est-à-dire qu'il contient un seul type d'espèce ou polymicrobien dans le cas où il comprend des espèces mixtes par exemple ; *Candida albicans* avec *Staphylococcus aureus* (Lohse *et al*., 2018 ; Rodriguez *et al*., 2020). Le développement du premier modèle de la formation de biofilm de *Candida albicans in vitro* a été établit par Hawser et Douglas en 1994. Cet évènement a ouvert la voie à une meilleure compréhension de la formation de biofilm chez ces levures (Soll et Daniels, 2016).

2.2. La composition de biofilm des *Candida albicans*

Le biofilm est représenté comme une architecture complexe tridimensionnelle, composée des cellules de levures, pseudohyphes et hyphes englobés dans une matrice extracellulaire (Lohse et Johnson, 2009).

2.2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est une barrière sélective qui sépare les cellules contenant dans le biofilm et le compartiment externe, sa composition (figure 03) est variable en fonction des changements des conditions de croissance (pH, la température) et la localisation de biofilm chez l'hôte (Wijaya *et al*., 2023).

Les constituants majoritaires sont les glycoprotéines et les glucides, cependant les polysaccharides dominants sont les mannanes α-1,2 ramifié et α-1,6 qui s'associent au β-1,6 glucane linéaire et à une petite quantité de β-1,3 glucane, le principal polysaccharide de la paroi cellulaire qui confère la résistance aux antifongiques. Elle possède aussi des molécules lipidiques et des acides nucléiques extracellulaire (Atriwal *et al*., 2021).

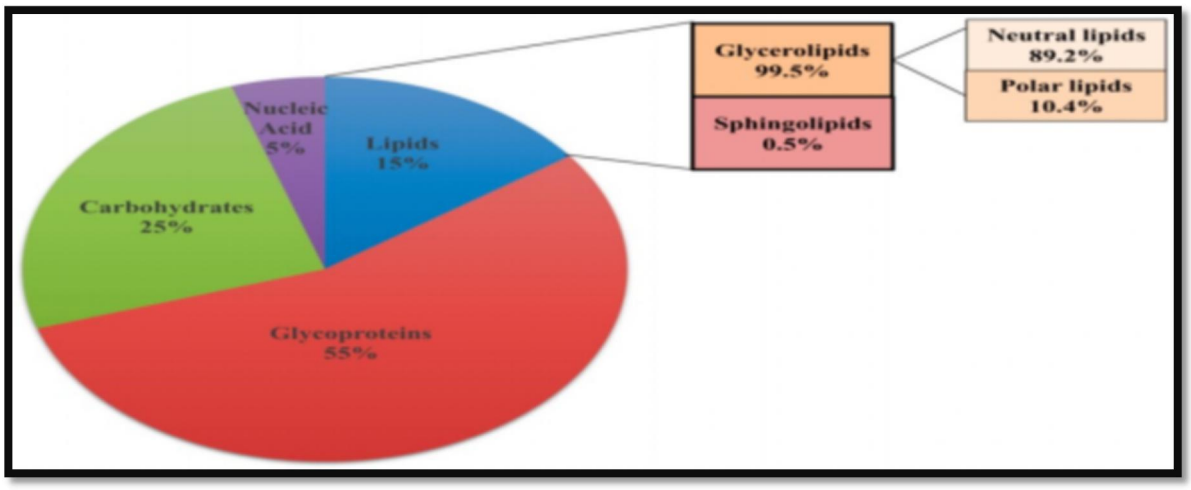


Figure 03 : la composition de la matrice extracellulaire de biofilm des *Candida albicans* (Alim *et al*., 2018).

2.3. Mécanisme de formation de biofilm chez *Candida albicans*

Le phénomène de la formation des biofilms chez les *Candida albicans* est complexe, composé de quatre étapes essentielles représentées dans la figure 04 (Rapala-Kozik *et al.*, 2019).

2.3.1. L'adhésion

Les cellules de levure flottantes se fixent à des surfaces vivantes (muqueuses, vaisseaux sanguin, organe) ou non vivantes (les dispositifs médicaux). Cette phase est médiée par les adhésines tels que la famille des séquences de type agglutinine (Als), qui sont des glycoprotéines de la paroi cellulaire (Ponde *et al.*, 2021). Les protéines les plus impliquées sont les Als 1, Als 3 et Als 5 qui assurent les interactions entre les cellules (agglomération, filamentation) ce qui aboutit à la formation d'un agrégat cellulaire fixé sur la surface. Sachant que les protéines Als 1 et Als 3 adhèrent aux cellules endothéliales et épithéliales de l'hôte, tandis que les Als 5 sont liées aux protéines de la matrice extracellulaire (Xu *et al*., 2022).

2.3.2. La prolifération

Cette étape est caractérisée par la croissance et l'augmentation du nombre de cellules de levure. Il s'agit de la phase d'initiation, au cours de laquelle les cellules de levure se propagent pour former la structure filamenteuse hyphale. Durant ce processus plusieurs enzymes de la famille hydrolase sont libérées par les *Candida albicans* notamment les protéinases aspartiques sécrétées (Saps), une famille composée de 10 gènes dont Sap 5 et Sap 6 sont spécifiques à l'hyphe permettant aux cellules de biofilm de s'agréger et de se communiquer entre elles (Rapala-Kozik *et al*., 2019).

2.3.3. Maturation

La maturation aboutit une structure tridimensionnelle formée par un réseau complexe de plusieurs couches de cellules polymorphes notamment des cellules hyphales (chaine de cellules cylindrique), des cellules pseudo-hyphales (cellules ellipsoïdales relies bout à bout) et des cellules levures rondes englobées dans une matrice extracellulaire, au cours de cette organisation de nombreux pores et canaux d'eau se forment afin d'assurer la circulation des molécules de quorum sensing qui permettent la communication entre le biofilm et son environnement (Ponde *et al.*, 2021;Malinovská *et al.*, 2023).

2.3.4. Dispersion

Cette étape décrit le processus par lequel les cellules non adhérentes se détachent pour coloniser un autre environnement favorable et former un nouveau biofilm . Ce processus est assuré par la protéine de la paroi fongique « yeast wall protein » (Ywp1) qui est une glycoprotéine de la paroi cellulaire. Elle est caractérisée par des propriétés antiadhésives.

Les cellules dispersées présentent plusieurs caractéristiques par rapport aux cellules planctoniques telle que la capacité à former des filaments, une adhésion améliorée, une sensibilité réduite aux antifongiques et aussi, une capacité accrue à endommager les cellules endothéliales (Alim *et al*., 2018 ; Ponde *et al.*, 2021 ; Malinovská *et al*., 2023).

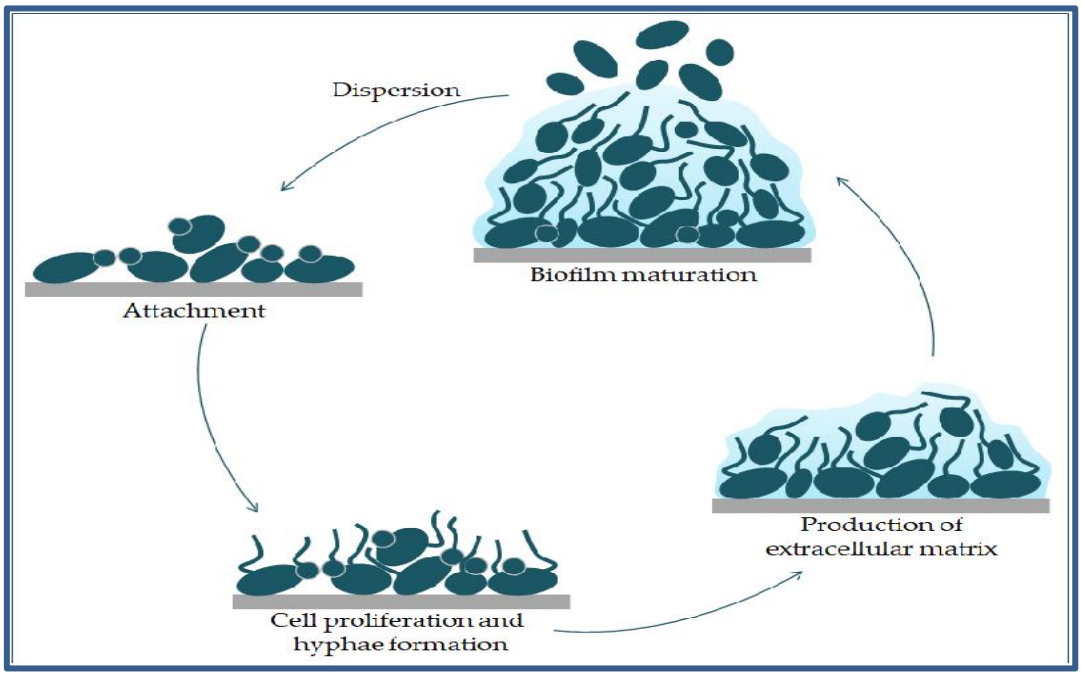
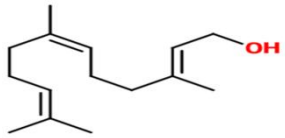
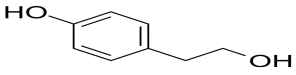


Figure 04 : Le mécanisme de formation de biofilm chez *Candida albicans* (Talapko *et al*., 2021).

- **Quorum sensing**

Le processus de formation de biofilm est régulé et contrôlé par un système appelé « quorum sensing ». Connu initialement chez les biofilms bactériens, par la suite chez le champignon (*Candida albicans*), après la découverte de farnésol (la molécule sécrétée par ce micromycète). C'est un système de communication intercellulaire, basé sur la densité cellulaire et l'environnement externe. En effet il repose sur la sécrétion de molécules de faibles poids moléculaire dont la concentration est corrélée à la densité cellulaire, et qui diffusent dans le milieu extérieur. Lorsque cette concentration dépasse le seuil critique, elle déclenche ou réprime l'activation de certains gènes de virulence (Rodrigues et Černáková, 2020). Le tableau ci-dessous résume les molécules impliquées chez les *Candida albicans.*

Tableau II : Molécules de quorum sensing

Molécule	Structure chimique	Rôle	Références
Farnésol	$C_{15}H_{26}O$ 	- Inhibe la transformation de *C. albicans* de la forme levure à la forme hyphe - Stabilise le gène Nrg 1 : gène régulateur du processus de dispersion).	(Kovács et Majoros, 2020 ; Dühring et Schuster, 2024)
Tyrosol	$C_8H_{10}O_2$ 	- Régule le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN chez les *Candida albicans.* - Exerce l'effet inverse de celui de farnésol, basé sur la transition morphologique des levures de *Candida albicans*	(Kovács et Majoros, 2020) (Xu *et al.*, 2022)

2.4. Résistance du biofilm de *Candida albicans*

La résistance majeure du biofilm est attribuée à une population spécifique de cellules, nommées « les cellules persistantes », il s'agit des variantes dormantes, détectées seulement en présence d'antifongique, qui se trouvent au profond d'un biofilm (Vila et Rozental, 2016). Ces cellules activent une réponse aux stress oxydatif par la surexpression des superoxydes dismutases (SOD) qui permettent la protection des cellules. Elles expriment aussi une enzyme corrélée à la survie prolongée après l'exposition à l'amphotéricine B appelée : alkyl hydroxyde réductase (Wuyts *et al.*, 2018).

2.5. Impact du biofilm de *Candida albicans* sur la santé humaine

La formation de biofilm par les *Candida albicans* constitue une sérieuse contrainte impliquée dans plusieurs secteurs ; environnemental, en industrie agro-alimentaire et notamment dans les établissements hospitaliers (Rodriguez *et al.*, 2020). Ces biofilms peuvent se former directement sur les tissus biologiques ou sur les matériaux médicaux (Gulati et Nobile, 2016), ce qui provoque des infections chroniques tel que :

- **Le muguet** : caractérisée par son aspect blanchâtre et crémeux sur les surfaces de muqueuse, elle affecte beaucoup plus les immunodéprimés (Fanou *et al.,* 2022).
- **La candidose vulvovaginale** : une affection de la voie génitale, présente chez les femmes (Fanou *et al.*, 2022).

- **La candidémie** : une affection très grave qui se développe sur les cathéters intravasculaires et vineux, caractérisée par sa forte capacité d'endommager les tissus humains via la voie hématogène (Akbari et Kjellerup, 2015).
- **La stomatite dentair**e : inflammation locale ou générale des muqueuses des patients

Chapitre 02:
Huile essentielle

1. Huile essentielle

1.1. Introduction

Depuis longtemps, les chercheurs s'intéressent à la phytothérapie, dans le but d'identifier des molécules bioactives susceptibles d'être exploitées. En effet, les plantes se distinguent par leur capacité à produire des métabolites secondaires, dotées de plusieurs propriétés biologies (Aćimović *et al*., 2018).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques volatils produits par les plantes aromatiques (Valdivieso-Ugarte *et al.,* 2019). Ils sont synthétisés par tous les organes végétaux, notamment les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les branches, les graines, les fruits, les racines, le bois et l'écorce. Ils sont liquides, volatils, clairs et rarement colorés, stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des conduits, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Chouhan *et al*., 2017 ; Nazzaro *et al.*, 2017).

1.2. Composition chimique

La composition chimique d'huile essentielle varie en fonction de plusieurs facteurs tels que la composition du sol, les conditions climatiques, le stade de développement des plantes, les organes prélevés, le moment et la source géographique de récolte (Nehme *et al*., 2021).

Les huiles essentielles sont des mélanges de 20 à 60 composés dont deux ou trois composants sont majoritaires avec des concentrations élevées (20 à 70 %), par rapport, aux autres présents à l'état de traces (les composants mineurs). En général, ces composés dominants déterminent les propriétés biologiques d'une huile essentielle (Bakkali *et al.*, 2008).

La composition chimique des huiles essentielles est principalement représentée par deux groupes différents (de Sousa *et al.*, 2023) :

- Le groupe des terpénoïdes (plus courant)
- Le groupe des composés aromatiques (plus rare)

1.2.1. Les terpènes

Le terpène est un groupe d'hydrocarbures très important. Il comprend principalement les monoterpènes (C 10) et les sesquiterpènes (C 15) (figure 05), mais des structures plus complexes comme, les diterpènes (C 20) et les triterpènes (C 30) etc., peuvent aussi exister (Chávez-González *et al*., 2016) . Ils sont produits à partir de la combinaison de plusieurs molécules basiques à 5 carbones appelé « isoprène » (C_5H_8) (Bakkali *et al.*, 2008) . La biosynthèse des terpènes se fait par deux voies biochimiques différentes qui sont l'acide

Mévalonique (MVA) et 2 C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP). La première voie se déroule dans le cytoplasme de toutes les plantes eucaryotes. Elle synthétise vers la fin, les sesquiterpènes, stérols et triterpènes. Par contre, la voie MEP concerne seulement les algues et les plantes supérieurs. Elle se localise dans le tissu plastidique et elle produit les monoterpènes, diterpènes et tétraterpènes (Sadgrove *et al*., 2022).

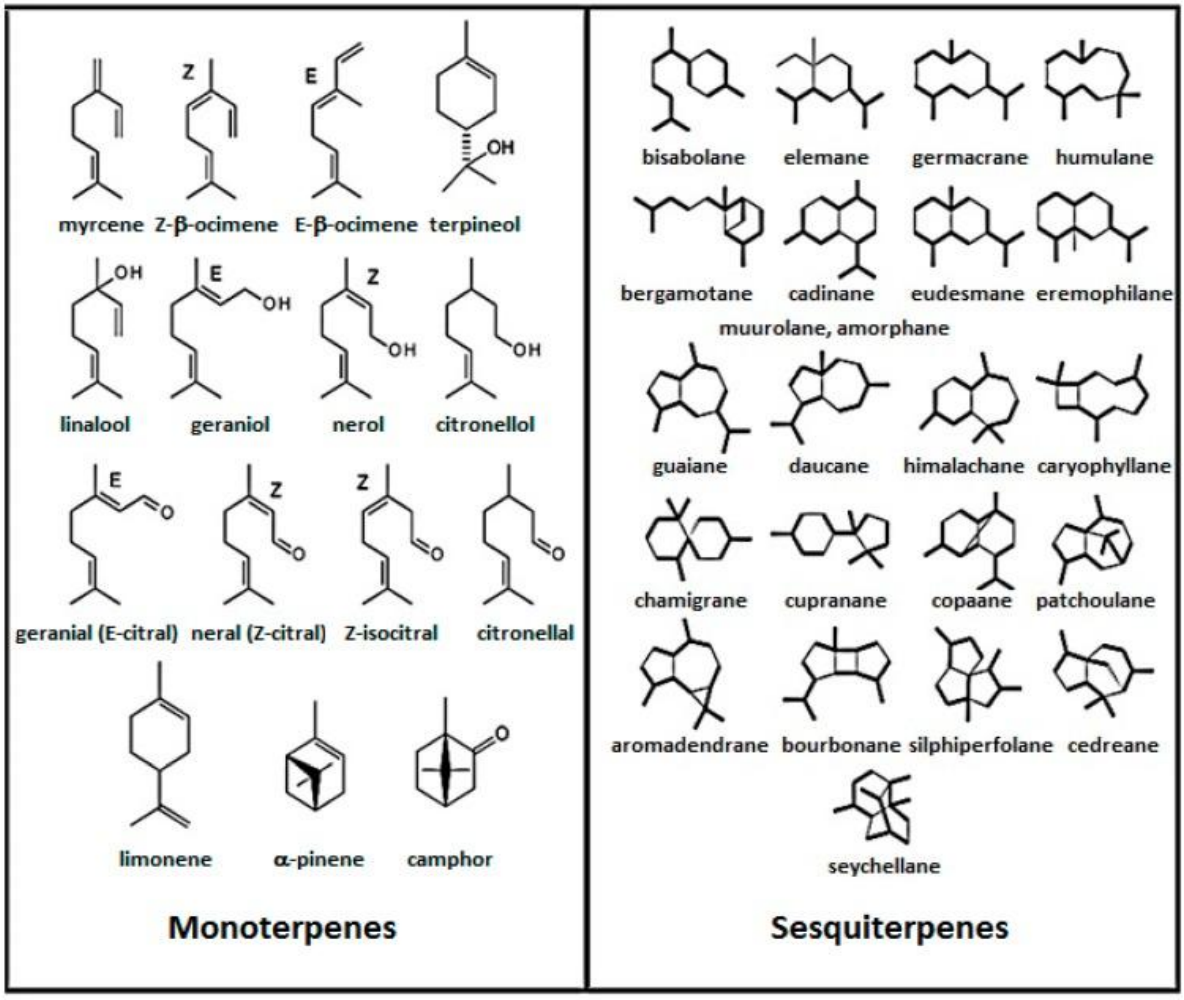


Figure 05 : structures chimiques de certains composés terpénique (Dhifi *et al*., 2016).

Les modifications enzymatiques des terpènes qui ajoutent des molécules d'oxygènes et déplacent ou éliminent des groupement méthyle conduisent à la formation des terpénoides (Chouhan *et al.*, 2017). Ces derniers peuvent être oxydés sous l'effet de la lumière en formant des nouveaux composés (le p-Cymène, les alcools, les cétones) (figure 06) (Nehme et al., 2021).

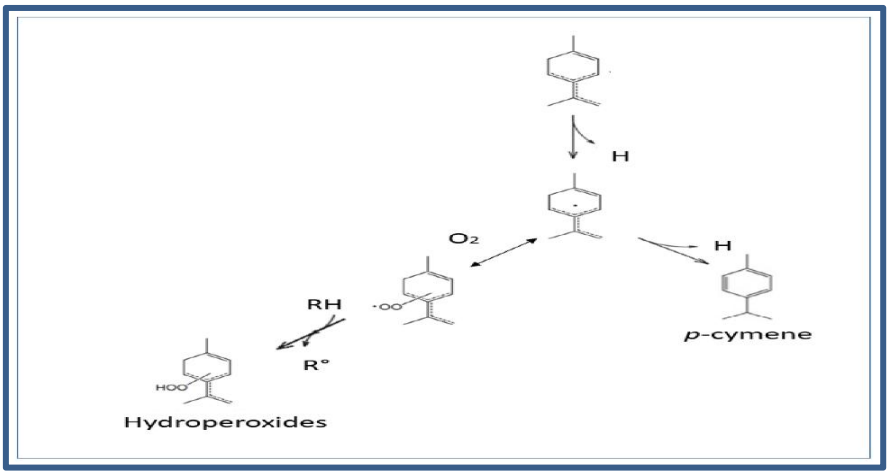


Figure 06 : oxydation des terpénoides (Turek et Stintzing, 2013).

1.2.2. Les composés aromatiques

Les phénylpropanes sont des produits organiques issus des plantes, ils se forment à partir de l'acide aminé phénylalanine par la voie shikimate (figure 07). Leur noyau est constitué d'un cycle phényle associé à un fragment propane (C 3). Une teneur relativement faible d'huiles essentielles est composée de phénylpropanes, et les plus courants sont le safrole, l'eugénol, l'isoeugénol, la vinilline et le cinnamaldéhyde (Chouhan *et al.,* 2017).

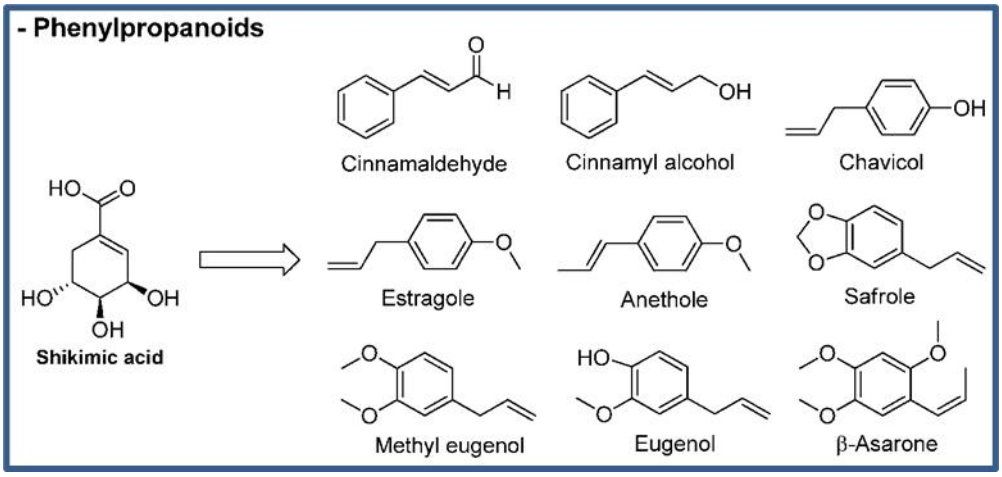


Figure 07 : structures chimiques des phenylpropanoides (de Sousa *et al*., 2023).

1.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'exploitation du potentiel chimique de ces plantes à parfum nécessite l'extraction de composés aromatiques. Ces composés sont présents dans ces espèces en quantités infimes, comme c'est le cas des huiles essentielles. Il existe des techniques soit traditionnelles, soit innovantes, qui permettent d'extraire ces constituants aromatiques dans leurs concentrations

maximales dans un état chimique aussi proche que possible de leur état natif (Manion et Widder, 2017) . Parmi ces méthodes on distingue :

1.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, la matière végétale est soumise à un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs sont condensées et décantées dans l'essencer, avant d'être séparées en une phase aqueuse et une phase organique. Habituellement, une demi-heure suffit pour récolter 95% des molécules volatiles, ce qui est suffisant pour l'industrie et la parfumerie. Pour l'aromathérapie, il faut poursuivre l'opération aussi longtemps que nécessaire pour récupérer tous les composants aromatiques volatils (Stratakos et Koidis, 2015 ; Mohamed Nadjib et al., 2019).

1.3.2. Extraction par L'hydrodistillation

Le processus consiste à immerger la matière première dans un bain-marie et à la faire bouillir. La chaudière est généralement réglée à la pression atmosphérique. Ce procédé présente des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau bouillante. Certains organes végétaux, notamment les fleurs, sont trop fragiles pour supporter les traitements par entraînement de vapeur d'eau et par hydrodistillation (Stratakos et Koidis, 2015 ; Mohamed Nadjib et al., 2019).

1.3.3. Extraction assistée par micro-ondes

L'extration par micro-onde sans solvant (Solvent-Free Microwave Extraction (SFME)) est une combinaison de techniques de chauffage originales, à savoir les micro-ondes et la distillation sèche. Le processus commence par le placement du matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four à micro-ondes, sans ajout d'eau ni de solvant. L'échauffement interne de l'eau contenue dans la plante permet à ses cellules de se dilater, ce qui entraîne la rupture des glandes et des récipients oléifères. L'huile essentielle libérée est ensuite évaporée avec l'eau de la plante (Stratakos et Koidis, 2015 ; Mohamed Nadjib *et al.*, 2019).

1.3.4. Extraction par fluide à l'état supercritique

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, appelée SFE, réside dans l'utilisation de solvants dans leur état supercritique. Il s'agit d'une condition de températures et de pressions où le solvant existe dans un état intermédiaire entre les phases liquide et gazeuse, présentant des propriétés physico-chimiques distinctes, notamment un pouvoir de solvatation

accru. Le SFE est une technique dite « verte », utilisant peu ou pas de solvants organiques, et offre l'avantage d'être considérablement plus rapide que les méthodes traditionnelles (Stratakos et Koidis, 2015 ; Mohamed Nadjib *et al*., 2019).

2. La sauge sclarée (*Salvia sclarea)*

2.1. Description botanique

La sauge sclarée (*Salvia sclarea* L.) (figure 08) est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Lamiacées. Elle est hermaphrodite et pollinisée par des insectes comme l'abeille charpentière (Zhumaliyeva *et al.*, 2023).

Selon Kačániová *et al*., (2023) elle est caractérisée par :

- **Les tiges :** généralement, elles peuvent attendre une hauteur de 90 à 120 cm, présentant un modèle de croissance dressé et robuste et une couverture dense de poils glandulaires.
- **Les feuilles** : elles sont largement ovales et rugueuses. La forte densité des poils glandulaires leur donne un aspect gris.
- **Les fleurs** : elles vont du blanc au violet clair et sont disposées en verticilles serrés portés par des tiges épaisses. Le calice mesure 5 mm de long, pubescent, avec 5 dents épineuses distinctement séparées en un bloc supérieur de 3 et un bloc inférieur de 2. La corolle mesure 15-25 mm de long, comporte deux lèvres, la lèvre supérieure incurvée cachant l'étamine et la plupart des dents. Fait partie du style, le sommet de la lèvre inférieure étant trilobé et généralement moins coloré que celui de la lèvre supérieure. Les fleurs nectarifères produisent finalement des fruits sous forme d'akène.

Figure 08 : la sauge sclarée (Photo personnelle,2024).

2.2. Classification botanique de *Salvia sclarea*

La *Salvia sclarea* est une plante aromatique communément appelée « sauge sclarée », fait partie de la famille des *Lamiacées*. C'est l'une des plus grandes familles végétales, avec 236 genres et plus de 7 000 espèces. Le nom de famille original est *Labiatae*, dérivé du mot latin signifiant « lèvre », faisant référence aux fleurs, qui ont généralement des pétales fusionnés en une lèvre supérieure et une lèvre inférieure.

Selon Abdelaty *et al.*, (2021), la sauge sclarée est classe comme suit :

Royaume : Plantae

Superdivision : spermatophytes

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia sclarea*

2.3. Les différentes dénominations

- **Synonyme** : Herbe sacrée, thé d'Europe, thé de Grèce, thé de France, thé de provence, grande sauge, sauge musquée (Karayel, 2020).
- **Nom scientifique** : *Salvia sclarée* (le terme « *Salvia »* est dérivé du mot latin « salvare » qui fait référence à la guérison et au traitement (Demirpolat, 2023).
- **Nom arabe** : Souaqennebi, Salma, kheyatdjouhate.
- **Nom targui / berbère** : Tazzourt, Agourim, Imeksaouen.
- **Nom anglais** : Common sage, Garden sage, carly sage.

2.4. Aire de répartition et utilisation traditionnelle

Salvia sclarée est largement distribuée dans tout le monde, elle se trouve dans les régions chaudes (sud d'Europe, Afrique de Nord, Russie et en Asie) (Karayel, 2020) . Cette plante aromatique est utilisée dans la production industrielle : fabrication de colorants, produits pharmaceutiques et les parfums (Luca *et al.*, 2023) . Elle a une importance majeure dans le traitement de maladies tel que : l'asthme, les problèmes menstruels, le stress, la gingivite, la stomatite, les brulures et les ulcères (Tuttolomondo *et al*., 2020 ; Zhumaliyeva *et al.*, 2023).

2.5. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge

Salvia sclarea est une plante aromatique qui se distingue par la production des 'huiles essentielles dont la teneur varie de 0,01 à 0,40 %. L'huile de sauge sclarée est un liquide avec une odeur caractéristique et peut être incolore, jaune brunâtre ou jaune pâle. Cette huile se distingue par un certain nombre de paramètres, dont une densité relative de 0,890 à 0,908 et un indice de réfraction de 1,456 à 1,466. La rotation optique est comprise entre -26° et -10°, tandis que l'indice d'acide est au maximum de 1,0 (Aćimović *et al.,* 2018).

L'huile essentielle de *Salvia sclarée* contient essentiellement des alcools et des esters monoterpéniques tels que le linalol, l'acétate de linalyle, l'acétate de geranyle, α-pinène, β-caryophyllène, oxyde de caryophyllène, p-cymène, α-terpineol, α-limonene, pyran, spathulenol, β- ocimene, germacrène D, α-copaene, formate de geranyle, β- elemene et le sclaréol (Karpiński, 2020; Kačániová *et al*., 2023 ; Kim *et al*., 2023).

2.6. Activités biologiques de l'huile essentielle de *Salvia sclarée*

2.6.1. Activité anti-inflammatoire

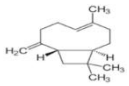
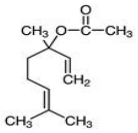
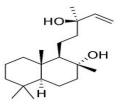
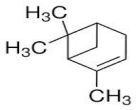
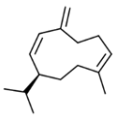
L'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Salvia sclarée* semble être en rapport avec le taux de l'acétate de linalyle et linalol qui représentent les composants principaux de cette l'huile (Ben Akacha *et al.*, 2023). Une étude *in vitro* ayant pour objectif de déterminer l'effet de ce produit sur trois espèces staphylococciques isolés chez les personnes présentant des infections des plaies dont *Staphylococcus aureus* a montré une forte activité anti-inflammatoire (Sienkiewicz *et al*., 2015).

2.6.2. Activité cytotoxique

Une étude comparative entre deux huiles essentielles issues des plantes de *salvia sclarée* différentes (in vitro / in vivo) a montré que ce produit chimique possède une activité cytotoxique contre les cellules leucémiques. Cette propriété est liée à la teneur de composant bioactif « germacrène D » (Kuzma *et al*., 2009).

Le tableau III résume quelques activités biologiques de l'huile essentielle de la sauge sclarée :

Tableau III : Les molécules responsables des activités biologiques chez *Salvia sclarea.*

Activité biologique	Composés	Parties	Références s
Activité hypoglycémiante	Linalol	Fleurs	(Aćimović *et al*., 2018)
Activité anti-microbienne	ß-caryophyllène 	Feuilles	(Kačániová *et al*., 2023)
Activité anti-inflammatoire	Acétate de linalyle 	Fleurs	(Sienkiewicz *et al.,* 2015)
Activité Anti- tumorale	Sclaréol 	Fleurs	(Zanotti *et al.*, 2023)
Activité anti-oxydante	Pinène 	Feuilles	(Zhumaliyeva *et al.,* 2023)
Activité cytotoxique	Germacrène D 	Fleurs et feuilles	(Kuzma *et al*., 2009)

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), au sein de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle commerciale de *Salvia sclarée* avant et après la formation des biofilms par trois souches de *Candida albicans* au stade de développement. Pour ce faire, nous avons :

- Testé la capacité de ces trois souches de *Candida albicans* à former des biofilms.
- Déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle commerciale de *Salvia sclarea.*
- Evalué l'activité anti-biofilm de l'huile essentielle de *Salvia sclarea.*

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériel végétale

Il s'agit de l'huile essentielle de *Salvia sclarea* (commercialisée), issu de laboratoire « Amezir » de la région de M'kira qui se situe au sud -oust de wilaya de Tizi-ouzou à 50 Km à la frontière avec la wilaya de Boumerdés.

1.2. Les souches fongiques

1.2.1. Isolement des souches

Trois souches ont été sélectionnées : *Candida albicans* ATCC 10237 appartenant à la collection du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) et deux souches cliniques (*Candida albicans* 07 et *Candida albicans* 08*)* issues de l'hôpital Chahids Mahmoudi à partir des prélèvements vaginaux.

- **Souche ATCC**

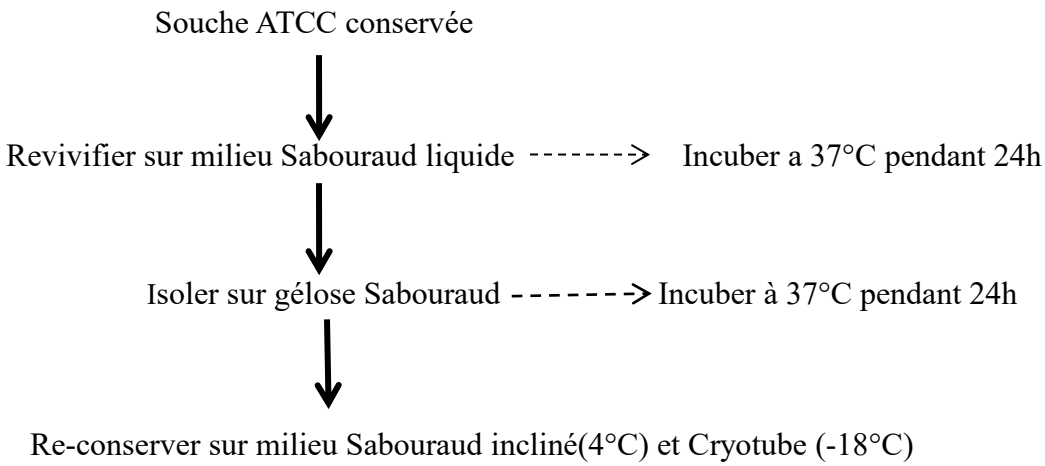


Figure 9 : Isolement et revivification de la souche *Candida albicans* ATCC.

- **Souches *Candida albicans* 07 et 08**

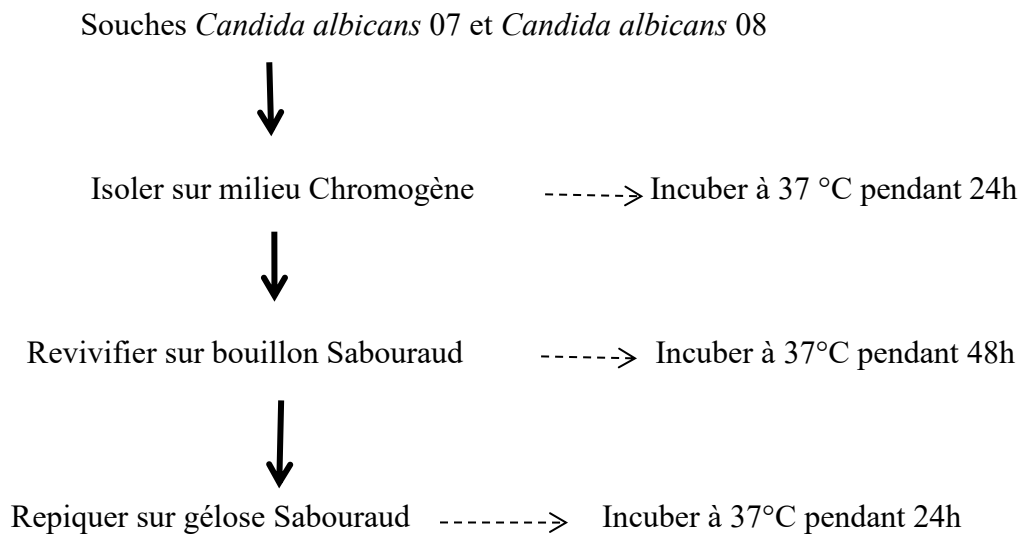


Figure 10 : Isolement et revivification des souches cliniques (*Candida albicans* 07 et *Candida albicans* 08).

1.2.2. Identification des souches clinique

L'identification des levures du genre *Candida*, en général, n'est pas facile car il existe des similitudes entre ses espèces. Cependant, il existe certains aspects phénotypiques, qui nous permettent de caractériser cette espèce, comme, l'aspect des colonies, la forme microscopique des cellules et le tube germinatif. Par conséquent, dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur quelques tests phénotypiques, afin d'identifier les souches cliniques, tout en utilisant la souche de *Candida albicans* ATCC 10237, comme référence.

1.2.2.1. Aspect macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique a pour but de visualiser l'aspect des colonies formées par *Candida albicans*, sur milieu solide. Pour cela, les trois souches ont été isolées par la technique des 4 cadrant, afin d'avoir des colonies bien séparées, sur gélose Sabouraud. Après une incubation de 24h à 37°C, les colonies ont été observées sous une loupe binoculaire.

1.2.2.2. Aspect microscopique

- **Le test de tube germinatif (blastèse)**

C'est un test très simple, spécifique au *Candida albicans* qui sont capable de former les tubes germinatifs (filaments courts en cours d'élongation à partir de la forme levure) dans le sang frais. A cet effet, quelques colonies de *Candida albicans* ont été isolées à partir des souches de 72 h et transférées dans le sérum frais pour une incubation à 37°C pendant 3h. Ensuite, 20 ul de ce mélange a été déposé sur la lame avec une petite quantité de bleu de méthylène afin de visualiser la structure formée sur le microscope optique (Byadarahally Raju et Rajappa, 2011).

- **Coloration de Gram**

C'est une méthode d'identification qui permet la différenciation entre les bactéries àGram positif et celle de gram négatif. Ce test est effectué en suivant ces étapes(figure 11):

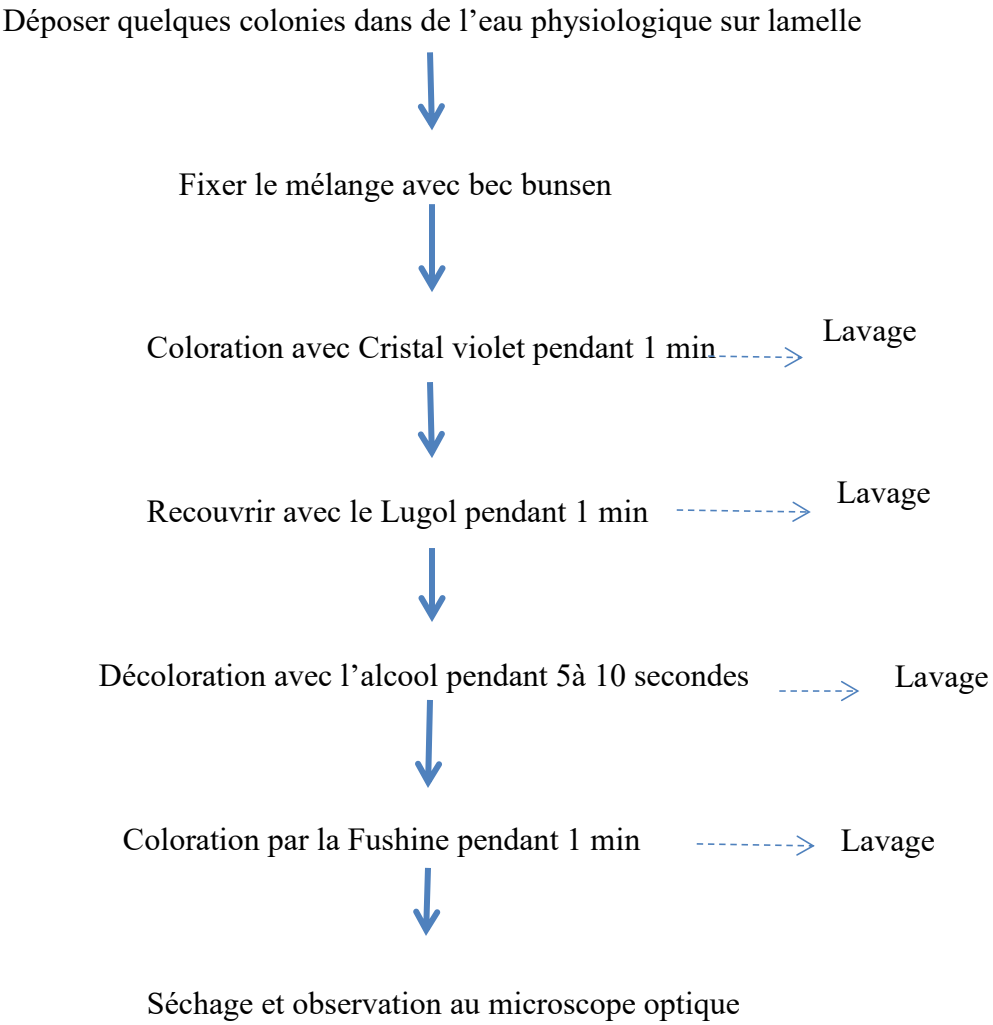


Figure 11 : La coloration de Gram des souches cliniques (*Candida albicans* 7/8)

Après l'identification, les souches cliniques (*Candida albicans* 07 et *Candida albicans* 08) ont été conservées comme la souche de référence *Candida albicans* ATCC 10237.

1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Salvia sclarea* commerciale est déterminée par la méthode de la micro-dilution sur une microplaque à 96 puits (figure 12) en suivant le protocole de Proškovcová *et al.*, (2021) . 100 µl de milieu sabouraud additionné de Tween 80 à 1% (1v :1v) ont été distribué du deuxième puit au onzième puit. Le premier puit a été remplié par 200µl d'une solution d'huile essentielle commerciale de *Salvia sclarea* et à partir de ce puit jusqu'au dixième, une série de dilution 1/2 ont été réalisées. Après la standardisation des inoculums des trois souches testées en suivant le protocole de Rodriguez-Tudela, (2008) . La suspension a été diluée dans le Sabouraud puis 50µl ont été ajouté au puits (1-12) pour avoir une concentration finale de 2.5

10^5 ufc/ml (Costa *et al*., 2011). A la fin, le volume des puits (1-11) a été ajusté jusqu'à 200µl par le milieu Sabouraud additionné de Tween 80 pour obtenir une gamme de concentration de l'huile essentielle allant de [230mg/ml à 45mg/ml]. Le onzième et le douzième puits ont servit de témoins de croissance en présence et en absence du Tween 80. Tous les tests ont été réalisée en effectuant trois essaies indépendants. La microplaque a été incubée à 37°C pendent 24h. Pour visualiser la croissance et déterminer la valeur de la CMI, 30µl de Chlorure de triphényl- tétrazolium (CTT) à 1% ont été ajouté pour tous les puits et la microplaque, a été incubé 2h à 37°C. Le CTT (transparent) subit une réduction irréversible en formazan (composé insoluble coloré en rouge), sous l'effet des enzymes déshydrogénases, dans les tissus métaboliquement actifs (Yadav et Rao, 2024). La CMI correspond donc, à la plus petite concentration d'huile essentielle, où le CTT n'a pas viré en rouge (l'absence du virage de couleur indique l'absence de la croissance).

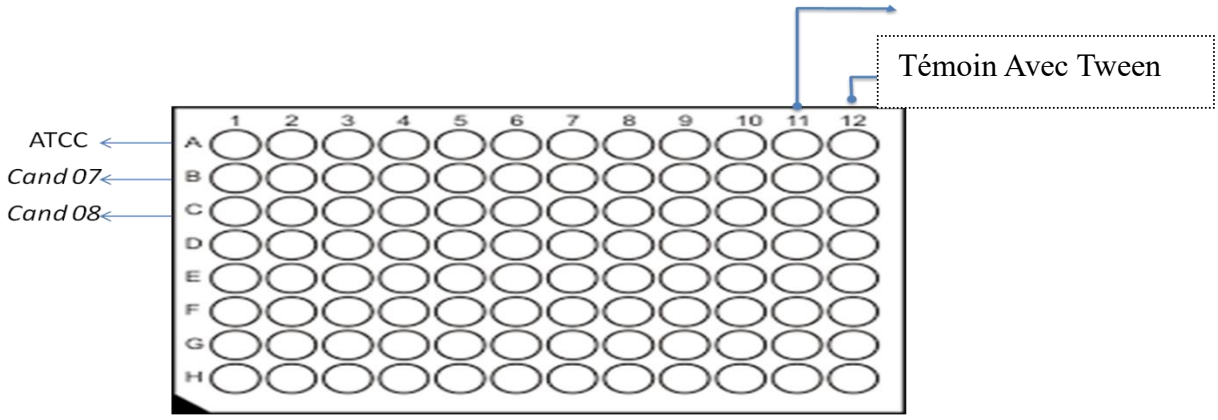


Figure 12 : Schéma de la microplaque utilisée pour la détermination des CMI

1.4. Test de formation de biofilm

La formation de biofilm a été effectuée sur une microplaque à 96 puits (figure 13), sur laquelle 100µl de milieu Sabouraud ont été ajouté pour toute la microplaque, puis 50µl des suspensions standardisées (2.5 10^7ufc/ml) des souches testées ont été ajoutée en triplette (3 puits pour chaque souche), puis le volume finale a été ajusté à 200µl. Quatre puits ont été remplit avec 200µl de milieu seul utilisé comme un témoin négatif. La microplaque a été incubée à 37°C pendent 48h. Après l'incubation, le contenu de la microplaque a été aspiré et lavé trois fois avec 250µl de phosphate buffer saline (PBS). Le biofilm restant a été fixé par séchage à 60°C pendent 45min, puis coloré avec 110µl de Cristal violet pendent 45 min. L'excès du colorant a été aspiré, puis la plaque a été lavée avec de l'eau distillé. A la fin, la

solubilisation du biofilm a été faite avec 110µl d'éthanol 96 % pendent 45 min, avant d'effectuer la lecture des densités optiques à 630 nm (Proškovcová *et al.*, 2021) . Quatre catégories de densité du biofilm ont été utilisées pour classer les biofilms sur la base de valeurs seuils établies. La $DO_{CUT-OFF}$ est calculée par la DO moyenne de témoin négatif +(3.écartype de témoin négatif), les catégories de densité de biofilm utilisées sont les suivantes (Stepanovic *et al.*, 2007) :

- $DO \leq DO_C$ = non formatrice de biofilm
- $DO_C < DO \leq 2DO_C$ = faiblement formatrice de biofilm
- $2DO_C < DO \leq 4DO_C$ = modérément formatrice de biofilm
- $4DO_C \leq DO$ = fortement formatrice de biofilm

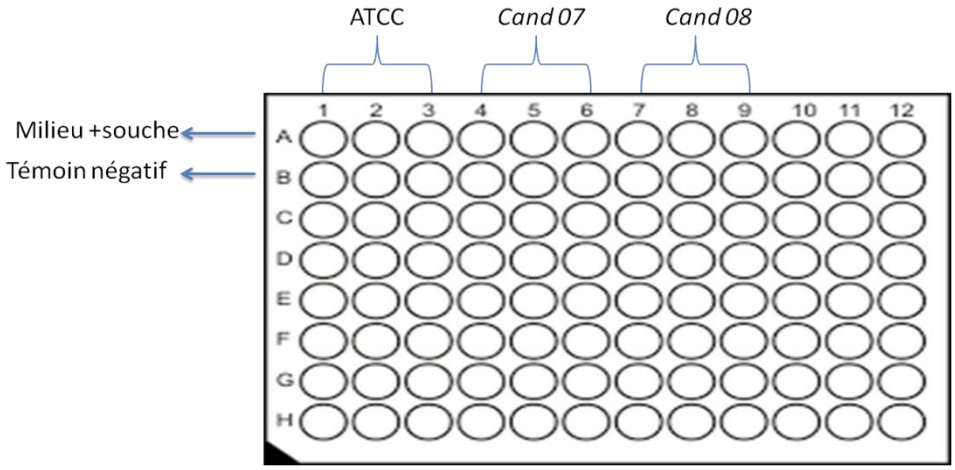


Figure 13 : Schéma d'une microplaque lors de la formation de biofilm.

1.5. Détermination de l'activité anti-biofilm

1.5.1. Inhibition de biofilm

Ce test a été réalisé sur la microplaque de 96 puits (figure 14). La microplaque a été remplit par 100µL d'huile essentielle commerciale de *Salvia sclarea* ont été distribuées dans les puits. Ensuit, 50µl de la suspension fungique ont été ajoutées, avant d'ajuster le volume final à 200µL avec le bouillon Sabouraud, afin d'obtenir des concentrations équivalentes au CMIs. Le Témoin positif, contenait 150µl de milieu Sabouraud et 50µl de la suspension. Tandis que, le témoin négatif, contenait seulement 200µl de milieu Sabouraud. Après l'incubation à 37 ° C pendent 24h, la microplaque a subit les mêmes étapes décrivent précédemment (test de formation), et le pourcentage d'inhibition est déterminé par la formule suivante (Proškovcová *et al*., 2021) :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = =[(\frac{\text{DO de la souche non traitée} - \text{DO de souche traitée}}{\text{DO de la souche non traitée}})] \times 100$$

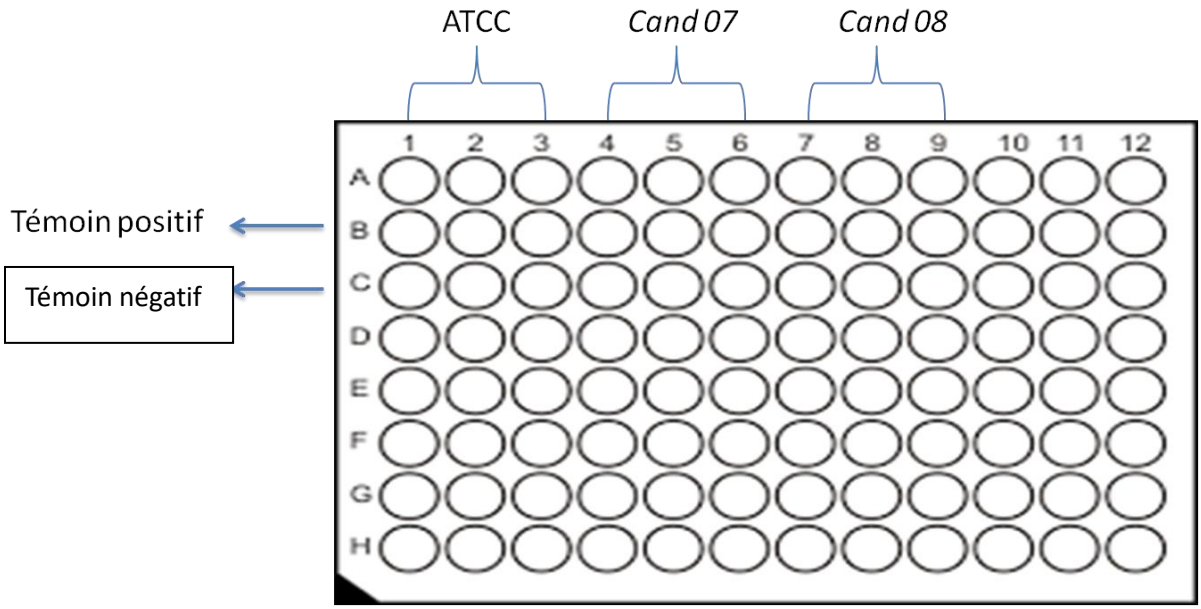


Figure 14 : Schéma de microplaque d'inhibition de biofilm formé par les trois souches.

1.5.2. Éradication de biofilm formé par les souches testées

Ce test est réalisé aussi dans la microplaque à 96 puits (figure 15). Après une incubation à 37°c pendent 48h, un lavage a été réalisé avec 250µl de PBS, puis 100µl d'huile essentielle commerciale de *Salvia sclarea* est ajouté aux cellules adhérentes et 100µl de milieu Sabouraud pour avoir des concentrations équivalentes aux CMIs. Pour le témoin positif, contenait 100µl de milieu Sabouraud et 100µl de l'eau distillé. Après une incubation de 24h à 37°C, la quantification de biofilm a été réalisé avec le cristal violet selon le protocole décrit précédemment et le pourcentage d'éradication est déterminé par la formule suivante (Proškovcová *et al*., 2021) :

$$\text{Pourcentage d'éradication} = =[(\frac{\text{DO de la souche non traitée} - \text{DO de souche traitée}}{\text{DO de la souche non traitée}})] \times 100$$

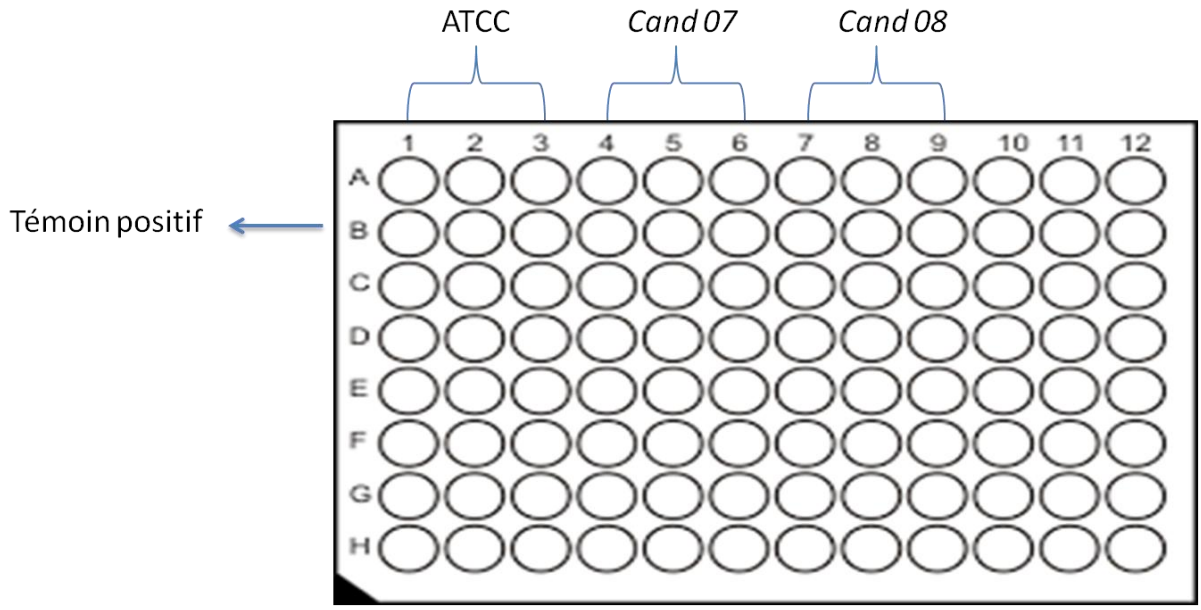


Figure 15 : Schéma de microplaque d'éradication de biofilm formé par les trois souches.

Résultats
et
Discussion

1. Test d'identification des *Candida albicans*

1.1. Test macroscopique

Ce test permet de décrire l'aspect des colonies des trois souches obtenues sur gélose Sabouraud (figure 16) à pH égale à 5.6 après l'incubation à 37°C pendent 24h. L'ensemble des observations ont permis de les comparer les deux souches cliniques (*Candida 07/08)* a la souche *Candida* ATCC 10237 et aux critères cités dans les travaux de Kayhan *et al.*, (2011). Nous avons constaté que nos souches sont des colonies de *Candida albicans*. Le tableau ci-dessus montre l'aspect des souches fongiques.

Tableau IV: L'aspect des colonies des trois souches testées

Critère / Souche	Forme	Relief	Contour	Taille	Surface	Opacité	Couleur	Consistance
Candida albicans ATCC 10237	Ronde	Bombée	Régulier	1à3mm	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
Candida albicans 07	Ronde	Bombée	Régulier	1à3mm	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
Candida albicans 08	Ronde	Bombée	Régulier	1à3mm	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse

Figure 16 : Aspect macroscopique des trois souches *Candida albicans* sur gélose Sabouraud

(a) *Candida albicans* ATCC 10237, **(b)** *Candida albicans* 07, **(c)** *Candida albicans* 08

1.2. Test microscopique

L'examen microscopique des souches testées après la coloration de Gram a révélé que nos souches sont Gram positif et qui se présentent sous forme de blastopore c'est-à-dire des cellules ovalaires mesurant de 2 à 4 µm (figure 17). Cette coloration peut être expliquée par le faite que les *Candida albicans* comme toutes les levures présentent une paroi cellulaire épaisse (Aslam *et al.*, 2015 ; Zhang *et al*., 2018).

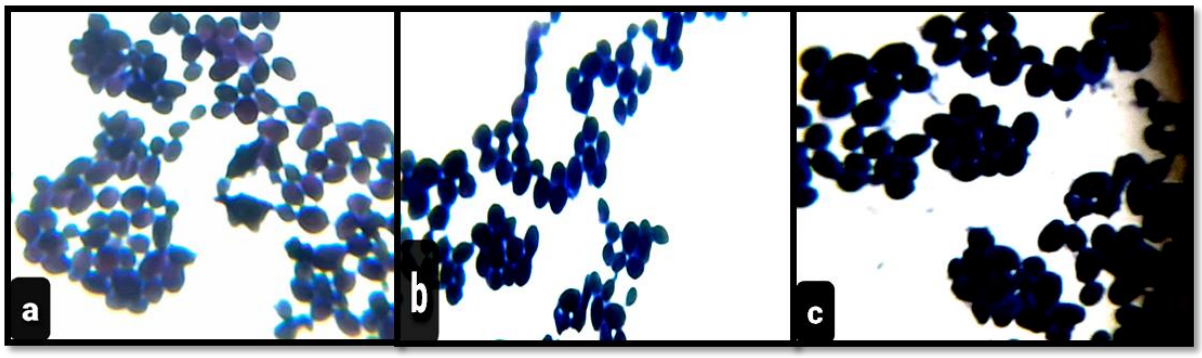


Figure 17 : Observation microscopiques (Objectif ×100) des trois souches testées après la coloration de Gram

(a) *Candida albicans* ATCC 10237, **(b)** *Candida albicans* 07, **(c)** *Candida albicans* 08

Dans le test en tube germinatif, les trois souches de *Candida albicans* étaient circulaires, avec des hyphes minces (figure 18). La production de tubes germinatifs était considérée comme une caractéristique typique des isolats de C*andida albicans*, couramment utilisée pour l'identification de cette espèce.

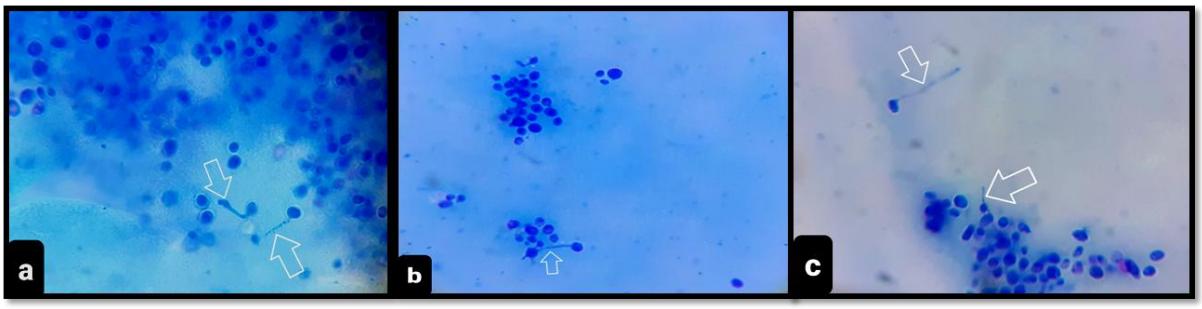


Figure 18 : Observation microscopique (objectif ×100) de tube germinatif formé par les souches testées.

(a) *Candida albicans* ATCC 10237, **(b)** *Candida albicans* 07**, (c)** *Candida albicans* 08

2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La CMI correspond à la concentration en huile essentielle dans les puits où le Chlorure de triphényl-tétrazolium (CTT) n'a pas viré du la couleur transparente en rouge, tel qu'on l'observe au niveau du sixième puit dans les trois microplaques pour les deux souches de *Candida albicans* cliniques (07 et 08). Par ailleurs, la CMI de la souche de référence de *Candida albicans* ATCC 10237 était dans le sixième puit dans les deux microplaques et dans le septième puit dans la troisième microplaque (figure 19). Les valeurs de CMI de l'huile essentielle étaient donc, de 7,18 mg/ml pour les deux souches de *Candida albicans* vaginales (*Candida* 07 et *Candida* 08) et de 9,57 mg/ml pour la souche de référence (ATCC 10237).

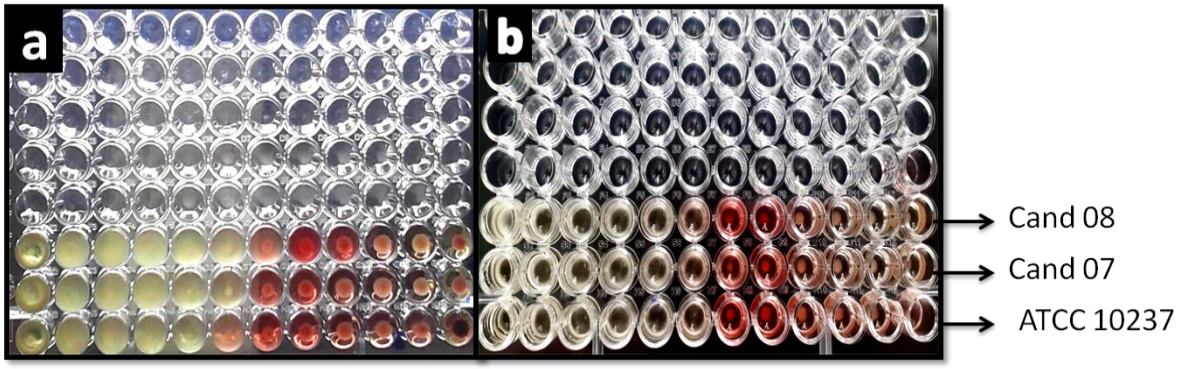


Figure 19: les résultats de la détermination des valeurs CMIs des trois souches testées.

Nos CMIs sont ainsi, considérablement supérieures à celles des travaux de Jirovetz *et al.*, (2007) ; Aćimović *et al.,* (2018) et Karpiński, (2020) qui ont obtenus respectivement des CMIs de 10 µg/ml contre des souches vaginales, 210 µg/ml et 1250 µg/ml. En revanche, l'étude réalisée par Sookto *et al*., (2013) a montré que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* n'été efficace qu'avec une concentration de 2,78 g/l, contre les *Candida albicans*.

La variabilité des concentrations actives de cette huile essentielles, pourrait être expliquée d'une part par, la différence entre les souches fongiques utilisées et d'autre part par la composition chimique de l'huile, qui diffère en fonction de l'espèce, la température, l'organe prélevé, la matière de sol, la saisonnalité et les méthodes d'extractions (Raveau *et al*., 2020).

L'huile essentielle de la sauge est réputée pour son activité inhibitrice contre un large spectre de micro-organismes (Cui *et al.*, 2015). Son activité antifongique peut être attribuée au fait qu'elle perturbe la stabilité de la membrane cellulaire, et à l'augmentation de sa fluidité. Elle pourrait également altérer la paroi fongique et perturber les fonctions cellulaires (la

production d'ATP et le transport membranaire) (Chuhan *et al*,2017). Il a été démontré que les monoterpènes seraient parmi les constituants responsables de l'activité antifongique de l'huile essentielle de la sauge (Swamy *et al*., 2016).

3. Test de formation de biofilm

Dans ce test, la capacité à former un biofilm a été évaluer la mesure de la densité optique (DO) a été réalisé par le lecteur Elisa à 630 nm (tableau V). En comparant les DO des trois souches testées (ATCC=0.305, Candida 07 = 0.249, Candida 08 = 0.177) avec la DO $_{CUT-OFF}$ (0.083), on a pu déduire que toutes les souches testées étaient modérément formatrices du biofilm. Nos résultats rejoignent ceux de travaux de Proškovcová et al., (2021). La capacité à former des biofilms est associée à la pathogénicité des micro-organismes.

Tableau V : La formation de biofilm chez les souches testées

Souche	DO (630 nm)	Interpretation
Candida albicans ATCC 10237	0,305 ± 0.064	**Modérément formatrice**
Candida albicans 07	0,249 ± 0.073	**Modérément formatrice**
Candida albicans 08	0,177 ± 0.047	**Modérément formatrice**

3. Inhibition de la formation du biofilm

L'étude anti-biofilm utilisant l'huile essentielle commercialisée de *Salvia Sclarea* a donné des pourcentages d'inhibition et d'éradication représentés par des histogrammes dans la figure 20. Les concentrations équivalentes aux CMIs de l'huile essentielle, ont montré que les pourcentages d'inhibition varient de 7,44 % (*Candida albicans* ATCC 10237) à 26,97% (*Candida albicans* 07), et les pourcentages d'éradication vont de 2,55 % (*Candida albicans* ATCC 10237) à 16,16% (*Candida albicans* 08).

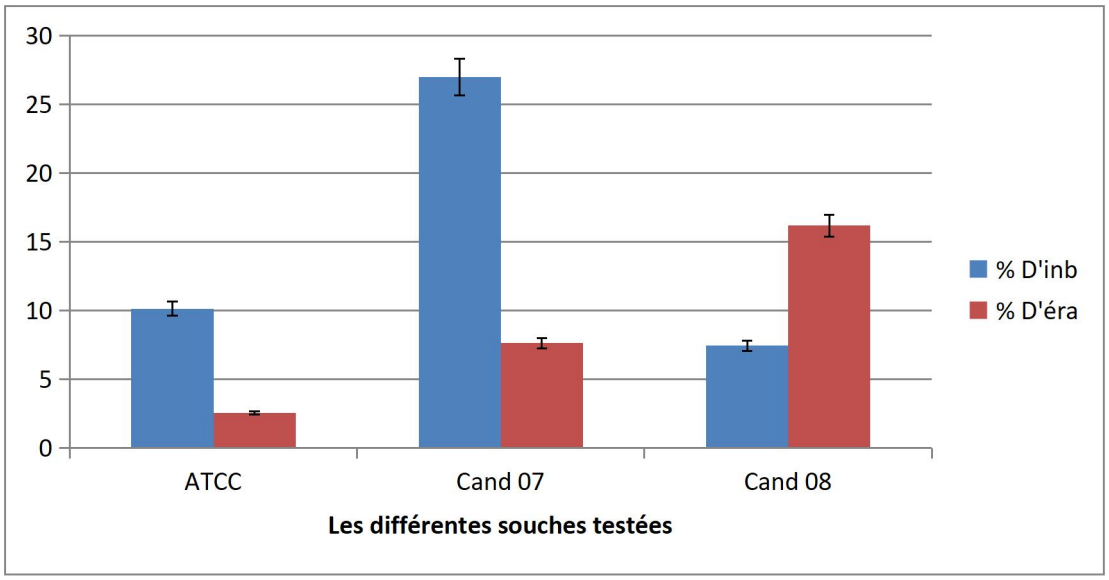


Figure 20 : Le pourcentage d'inhibition et d'éradication du biofilm des différentes souches testées.

ATCC: *Candida albicans* ATCC 10237, ***Cand* 07:** Candida *albicans* 07, ***Cand* 08:** *Candida albicans* 08.

% D' inb: pourcentage d'inhibition du biofilm ; % D'éra: pourcentage d'éradication du biofilm formé.

En comparaison avec les résultats mentionnés dans l'étude de Karpiński *et al.*, (2023), les pourcentages obtenus avec l'huile essentielle commerciale de *Salvia sclarea* sont inférieures à ceux obtenus avec l'huile essentielle de *Salvia officinalis* (60%).

L'analyse de la composition des huiles essentielles, a révélé une similarité, mais une différence de concentration des molécules bioactives d'une espèce à l'autre (Ben Akacha *et al.*, 2023) . Cette similarité dans la composition chimique est remarquable aussi avec d'autres plantes de la famille des *Lamiaceae* telles que *Lavandula stoechas*, *Mentha*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia militiorrhiza* , *salvia officinalis* ce qui leur confères des activitées biologiques similaires dues à ces métabolites secondires communes à l'origine de l'activité antibiofilm comme ; α - terpinene, β- terpinene, γ -terpinene , ρ- cymene, β- pinene, linalool, geraniol ,carvacole, β-caryophyllene (Minooeianhaghighi *et al.*, 2017 ; Benzaid *et al.*, 2019 ; Iseppi *et al.*, 2020).

Comme il a été précédemment signalé, la formation de biofilm chez *Candida albicans* passe par quatre étapes primordiales. Par conséquent, le mode d'action des molécules bioactives est multidirectionnel où chaque molécule inhibe une étape bien précise.

- **La phase d'adhésion**

Elle est perturbée par 1.8-cineol, α - terpinene, β- terpinene, γ -terpinene et linalol entraînent un déséquilibre de la paroi cellulaire et de la membrane cellulaire, en pénétrant entre les chaînes des acides gras de la bicouche lipidique, ce qui entraine la modification de la perméabilité et l'altération de la synthèse des polysaccharides et des protéines de la paroi cellulaire ; telle que les ALS 3 (agglutinine like-sequence) qui joue un rôle important dans l'adhésion de la cellule de *Candida* (Minooeianhaghighi *et al*., 2017 ; Shariati *et al*., 2022).

- **La phase de prolifération**

Le géraniol possède une activité anti-biofilm durant les phases de prolifération et de maturation en inhibant les gènes liés à la biosynthèse d'ergostérol (Cerebellar Degeneration Related 1 (CDR 1) et Early growth response 1 (ERG 4). Et affecte aussi les constituants de la paroi cellulaire des *C. albicans* (bêta -glucane et la chitine) (Shariati *et al*., 2022) . Un autre composé phénolique « camphre » ($C_{10}H_{16}O$) qui possède un effet anti-biofilm. Il pourrait probablement dû à l'interaction des groupes hydroxyles avec les substances polymères extracellulaires (EPS). De plus, il réduit la production des hyphes en inhibant les gènes liés à ce processus (Manoharan *et al*., 2017).

- **La phase de maturation**

L'inhibition de cette phase est liée au composant de l'huile essentielle qui est le sclaréol ($C_{20}H_{36}O_2$). Ce diterpène exerce un effet significatif sur la matrice extracellulaire. Et réduit sa production en réprimant l'expression des gènes responsables de la production de la matrice extracellulaire (Kim *et al*., 2023).

4.2. Eradication du biofilm préformé

L'éradication de biofilm, fait référence à la capacité de l'huile essentielle à éliminer le biofilm après sa formation. A ce stade, le biofilm est considéré comme résistant par rapport aux cellules planctoniques. Dans notre étude, les deux souches cliniques ont le pourcentage d'éradication plus élevé (*Candida* 07=7.63%, *Candida* 08=16.17%) que la souche caractéristique ATCC (2.56%), ce que signifie que le biofilm de l'ATCC est plus résistant que celui des souches cliniques. Cette différence pourrait être expliquée par le faite que les souches de *Candida* 07 et 08 sont issus d'un prélèvement vaginal, donc elles pourraient être influencées par l'ensembles des hormones sexuelles et aussi affaiblis par des traitements

antifongiques utilisés. En effet selon les travaux de Gonçalves, Azevedo, *et al.*, (2020) et Gonçalves, Bernardo, *et al*., (2020), la présence de progestérone à des grandes concentrations comme le cas des femmes enceintes influence sur la formation de biofilm en réduisant le nombre de cellules de *Candida albicans* formants le biofilm et en induisant une production discontinue de la matrice extracellulaire. La production de la matrice extracellulaire par le biofilm, le rend plus résistant aux facteurs environnementaux telle que ; les antifongiques, les cellules immunitaires. A cet effet, pour éliminer le biofilm, il faut d'abord déstabiliser la matrice. Parmi les molécules bioactives connues par cette caractéristique, on trouve, le géraniol, le camphene et la β- terpinene. Le géraniol est un monoterpène acyclique qui intervient dans l'éradication du biofilm en dégradant sa structure et en réduisant la teneur en glucides ainsi que l'activation des enzymes hydrolytiques dans la matrice.

Conclusion

Conclusion

Le biofilm formé par *Candida albicans* est connu par sa forte résistance, il est difficile à éliminer malgré la disponibilité de plusieurs classes des médicaments. C'est pourquoi, les études doivent s'orientées vers l'exploitation des inhibiteurs naturels.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité anti-biofilm de l'huile essentielle de *Salvia sclarée* (commerciale) sur les micro-organismes pathogènes (*C. albicans*). Cette plante aromatique est largement utilisée en médecine traditionnelle à travers le monde.

Trois souches fongiques dont deux souches cliniques (*Candida albicans* ATCC 10237, *C. albicans* 07 et *Candida albicans* 08) ont été évalué pour leur capacité à former des biofilms sur la microplaque de 96 puits. L'ensemble de différentes souches sont modérément formatrices de biofilm.

L'huile essentielle de *Salvia* sclarea a révélé une activité anti-biofilm. Même si, les pourcentage inhibition sont inférieure à 30% et les pourcentages d'éradication sont inférieures à 20%, mais cette huile a des molécules bioactives intéressantes comme toutes les plantes de la famille des *Lamiaceae* qui peuvent être exploité dans des fin thérapeutiques.

A la lumière des résultats obtenus, il semble que l'utilisation du l'huile essentielle de *Salvia sclarea* est prometteuse, pour cela il est recommandé de réaliser des caractérisations des molécules bioactives avec l'utilisation des méthodes analytiques d'haute performance comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et spectrophotométrie de masse. Et d'isoler les molécules responsables d'activité anti-biofilm afin de les exploiter dans divers secteurs (médical, industriel et environnemental).

Références bibliographiques

A

Abdelaty, N. A., Attia, E. Z., Hamed, A. N. E., and Desoukey, S. Y. (2021). A review on various classes of secondary metabolites and biological activities of Lamiaceae (Labiatae) (2002-2018). In *J. Adv. Biomed. & Pharm. Sci. J. Adv. Biomed. & Pharm. Sci* (4).

Aćimović, M., Kiprovski, B., Rat, M., Sikora, V., Popović, V., Koren, A., and Brdar-Jokanović, M. (2018). Salvia sclarea: CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY. In *Technology and Engineering Management* (1).

Akbari, F., and Kjellerup, B. V. (2015). Elimination of bloodstream infections associated with candida albicans biofilm in intravascular catheters. In *Pathogens* (4) : 457–469p. MDPI AG.

Alim, D., Sircaik, S., and Panwar, S. L. (2018). The significance of lipids to biofilm formation in Candida albicans: An emerging perspective. In *Journal of Fungi* (4). MDPI AG.

Anonyme ;2024,(www.google maps .com)

Aslam, A., Akhtar, N., Hasan, F., and Shah, A. A. (2015). Prevalence and in vitro Antifungal Susceptibility Pattern of Candida species in a Tertiary Care Hospital, Rawalpindi, Pakistan. In *Pakistan J. Zool* (47).

Atriwal, T., Azeem, K., Husain, F. M., Hussain, A., Khan, M. N., Alajmi, M. F., and Abid, M. (2021). Mechanistic Understanding of Candida albicans Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. In *Frontiers in Microbiology* (12). Frontiers Media S.A.

B

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. In *Food and Chemical Toxicology* (46) : 446–475 p.

Ben Akacha, B., Ben Hsouna, A., Generalić Mekinić, I., Ben Belgacem, A., Ben Saad, R., Mnif, W., Kačániová, M., and Garzoli, S. (2023). Salvia officinalis L. and Salvia sclarea Essential

Oils: Chemical Composition, Biological Activities and Preservative Effects against Listeria monocytogenes Inoculated into Minced Beef Meat. *Plants*, *12*(19).

Benzaid, C., Belmadani, A., Djeribi, R., and 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).

Bonhomme, J., and d'Enfert, C. (2013). Candida albicans biofilms: Building a heterogeneous, drug-tolerant environment. In *Current Opinion in Microbiology* (16).

Byadarahally Raju, S., and Rajappa, S. (2011). Isolation and Identification of Candida from the Oral Cavity. *ISRN Dentistry*, *2011*, 1–7.

C

Chávez-González, M. L., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. (2016). Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. In *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* (pp. 227–237).

Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in Candida albicans. In *Virulence* (11).

Chouhan, S., Sharma, K., and Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, *4*(3), 58.

Chow, E. W. L., Pang, L. M., and Wang, Y. (2021). From jekyll to hyde: The yeast–hyphal transition of Candida albicans. In *Pathogens* (10).

Costa, A. C. B. P., De Campos Rasteiro, V. M., Pereira, C. A., Da Silva Hashimoto, E. S. H., Beltrame, M., Junqueira, J. C., and Jorge, A. O. C. (2011). Susceptibility of Candida albicans and Candida dubliniensis to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Archives of Oral Biology*, *56*(11), 1299–1305.

Cottier, F., and Hall, R. A. (2020). Face/Off: The Interchangeable Side of Candida Albicans. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (9).

Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C., and Lin, L. (2015). Antimicrobial activity and mechanisms of Salvia sclarea essential oil. *Botanical Studies*, *56*.

D

Defosse, T. A., Le Govic, Y., Courdavault, V., Clastre, M., Vandeputte, P., Chabasse, D., Bouchara, J. P., Giglioli-Guivarc'h, N., and Papon, N. (2018). Yeasts from the CTG clade (Candida clade): Biology, impact in human health, and biotechnological applications. In *Journal de Mycologie Medicale* (28) 257–268 p.

Demirpolat, A. (2023). Essential Oil Composition Analysis, Antimicrobial Activities, and Biosystematic Studies on Six Species of Salvia. *Life*, *13*(3).

de Sousa, D. P., Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., and Lima, T. C. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. In *Biomolecules* (13).

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., and Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, *3*(4), 25.

Dühring, S., and Schuster, S. (2024). Studying mixed-species biofilms of Candida albicans and Staphylococcus aureus using evolutionary game theory.

F

Fanou, B. A., Klotoe, J.-R., Dougnon, V., Monteiro, A., Koudokpon, C. H., and Loko, F. (2022). [{Prevalence} and factors associated with vulvovaginal candidiasis in women admitted to the {Zone} {Hospital} of {Mènontin} ({Bénin})]. *The Pan African Medical Journal*, *42*.

G

Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., and Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. In *Frontiers in Microbiology* (10).

Gonçalves, B., Azevedo, N. M., Henriques, M., and Silva, S. (2020). Hormones modulate Candida vaginal isolates biofilm formation and decrease their susceptibility to azoles and hydrogen peroxide. *Medical Mycology*, *58*(3), 341–350.

Gonçalves, B., Bernardo, R., Wang, C., Schröder, M. S., Pedro, N. A., Butler, G., Azeredo, J., Henriques, M., Pereira Mira, N., and Silva, S. (2020). Effect of progesterone on Candida albicans biofilm formation under acidic conditions: A transcriptomic analysis. *International Journal of Medical Microbiology*, *310*(3), 151414.

Gulati, M., and Nobile, C. J. (2016). Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. In *Microbes and Infection* (18).

I

Iseppi, R., Tardugno, R., Brighenti, V., Benvenuti, S., Sabia, C., Pellati, F., and Messi, P. (2020). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial activity of essential oils from the lamiaceae family against streptococcus agalactiae and candida albicans biofilms. *Antibiotics*, *9*(9), 1–16.

J

Jacobsen, I. D., and Hube, B. (2017). Candida albicans morphology: still in focus. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (15).

Jirovetz, L., Wlcek, K., Buchbauer, G., Gochev, V., Girova, T., Stoyanova, A., Schmidt, E., and Geissler, M. (2007). Antifungal activities of essential oils of salvia lavandulifolia, salvia officinalis and salvia sclarea against various pathogenic candida species. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *10*(5), 430–439.

K

Kačániová, M., Vukovic, N. L., Čmiková, N., Galovičová, L., Schwarzová, M., Šimora, V., Kowalczewski, P. Ł., Kluz, M. I., Puchalski, C., Bakay, L., and Vukic, M. D. (2023). Salvia sclarea Essential Oil Chemical Composition and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6).

Kadosh, D., and Mundodi, V. (2020). A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in Candida species. In *Journal of Fungi* (6).

Karayel, H. B. (2020). Effect of natural boron mineral use on the essential oil ratio and components of musk sage (salvia sclarea l.). *Open Chemistry*, *18*(1), 732–739.

Karpiński, T. M. (2020). Essential oils of lamiaceae family plants as antifungals. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG.

Karpiński, T. M., OŻarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., and Wolski, H. (2023). Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, *28*(2).

Kayhan, T. Ç., Bllaç, C., Bllaç, D. B., Ecemls, T., and Ermertcan, A. T. (2011). Annular plaques on the tongue: What is your diagnosis? *Annals of Dermatology*, *23*(4), 548–550.

Kim, C., Kim, J. G., & Kim, K. Y. (2023). Anti-Candida Potential of Sclareol in Inhibiting Growth, Biofilm Formation, and Yeast–Hyphal Transition. *Journal of Fungi*, *9*(1).

Kovács, R., and Majoros, L. (2020). Fungal quorum-sensing molecules: A review of their antifungal effect against Candida biofilms. In *Journal of Fungi* (6, pp. 1–13). MDPI AG.

Kuzma, Ł., Kalemba, D., Rózalski, M., Rózalska, B., Marzena, W. S., Krajewska, U., and Wysokinska, H. (2009). Chemical composition and biological activities of essential oil from salvia sclarea plants regenerated in vitro. *Molecules*, *14*(4), 1438–1447.

Lenardon, M. D., Sood, P., Dorfmueller, H. C., Brown, A. J. P., and Gow, N. A. R. (2020). Scalar nanostructure of the Candida albicans cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. *The Cell Surface*, *6*. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2020.100047

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., and Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species Candida albicans biofilms. In *Nature Reviews Microbiology* (16) 19–31p. Nature Publishing Group.

Lohse, M. B., and Johnson, A. D. (2009). White-opaque switching in Candida albicans. In *Current Opinion in Microbiology* (12).

Lopes, J. P., and Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of Candida albicans. In *Virulence* (13).

Luca, S. V., Skalicka-Woźniak, K., Mihai, C. T., Gradinaru, A. C., Mandici, A., Ciocarlan, N., Miron, A., and Aprotosoaie, A. C. (2023). Chemical Profile and Bioactivity Evaluation of Salvia Species from Eastern Europe. *Antioxidants*, *12*(8).

Lv, Q. Z., Yan, L., & Jiang, Y. Y. (2016). The synthesis, regulation, and functions of sterols in Candida albicans: Well-known but still lots to learn. In *Virulence* (7) 649–659p. Taylor and Francis Inc.

M

Macias-Paz, I. U., Pérez-Hernández, S., Tavera-Tapia, A., Luna-Arias, J. P., Guerra-Cárdenas, J. E., and Reyna-Beltrán, E. (2023). Candida albicans the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiologia*, *55*(2), 189–198.

Malinovská, Z., Čonková, E., & Váczi, P. (2023). Biofilm Formation in Medically Important Candida Species. In *Journal of Fungi* (9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

Manion, C. R., and Widder, R. M. (2017). Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *74*(9), e153–e162.

Manoharan, R. K., Lee, J. H., Kim, Y. G., Kim, S. Il, and Lee, J. (2017). Inhibitory effects of the essential oils α-longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of Candida albicans. *Biofouling*, *33*(2), 143–155.

McManus, B. A., and Coleman, D. C. (2014). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Candida albicans. In *Infection, Genetics and Evolution* (21).

Minooeianhaghighi, M. H., Sepehrian, L., and Shokri, H. (2017). Antifungal effects of Lavandula binaludensis and Cuminum cyminum essential oils against Candida albicans strains isolated from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale*, *27*(1), 65–71.

Mishra, A., Forche, A., and Anderson, M. Z. (2021). Parasexuality of Candida Species. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (11).

Mohamed Nadjib, B., Amine, F., and Abdelkrim, K. (2019). MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE DISTILLATION DES HUILES ESSENTIELLES : REVUE DE LITTÉRATURE EXTRACTION METHODS OF ESSENTIAL OILS FROM MEDICINAL PLANTS: A COMPREHENSIVE REVIEW. In *BOUKHATEM et al. Revue Agrobiologia* (9).

N

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., and De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. In *Pharmaceuticals* (10). MDPI AG.

Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R. B., Jemaa, M. Ben, Bouhallab, S., Ceciliani, F., López, S., Rahali, F. Z., Ksouri, R., Pereira, D. M., and Abdennebi-najar, L. (2021). Essential oils in livestock: From health to food quality. In *Antioxidants* (10) : 1–42p. MDPI.

Nobile, C. J., and Johnson, A. D. (2015). Candida albicans Biofilms and Human Disease. In *Annual Review of Microbiology* (69).

P

Pihet, M., and Marot, A. (2013). Diagnostic biologique des candidoses. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2013*(450).

Ponde, N. O., Lortal, L., Ramage, G., Naglik, J. R., and Richardson, J. P. (2021). Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions. In *Critical Reviews in Microbiology* (47) : 91–111p. Taylor and Francis Ltd.

PRASAD, R. (1993). Candida albicans: cellular and molecular biology. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *35*(4).

Proškovcová, M., Čonková, E., Váczi, P., Harčárová, M., and Malinovská, Z. (2021). Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the lamiaceae family against candida albicans clinical isolates. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *28*(2), 260–266.

R

Rapala-Kozik, M., Zawrotniak, M., Gogol, M., Bartnicka, D., Satala, D., Smolarz, M., Karkowska- Kuleta, J., and Kozik, A. (2019). Interactions of Candida albicans Cells with Aerobic and Anaerobic Bacteria during Formation of Mixed Biofilms in the Oral Cavity. In *Candida Albicans*. IntechOpen.

Raveau, R., Fontaine, J., and Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. In *Foods* (9) MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Rodrigues, C. F., and Černáková, L. (2020). Farnesol and tyrosol: Secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in candida biofilm development. In *Genes* (11). MDPI AG.

Rodriguez, D. L., Quail, M. M., Hernday, A. D., and Nobile, C. J. (2020). Transcriptional Circuits Regulating Developmental Processes in Candida albicans. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (10).

Rodriguez-Tudela, J. L. (2008). EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(4), 398–405.

S

Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F., and Phumthum, M. (2022). Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. In *Plants* (11). MDPI.

Scharmann, U., Kirchhoff, L., Chapot, V. le S., Dziobaka, J., Verhasselt, H. L., Stauf, R., Buer, J., Steinmann, J., and Rath, P. M. (2020). Comparison of four commercially available chromogenic media to identify Candida albicans and other medically relevant Candida species. *Mycoses*, *63*(8).

Shariati, A., Didehdar, M., Razavi, S., Heidary, M., Soroush, F., and Chegini, Z. (2022). Natural Compounds: A Hopeful Promise as an Antibiofilm Agent Against Candida Species. In *Frontiers in Pharmacology* (13). Frontiers Media S.A.

Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Poznańska-Kurowska, K., Kaszuba, A., Urbaniak, A., and Kowalczyk, E. (2015). The effect of clary sage oil on staphylococci responsible for wound infections. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, *32*(1), 21–26.

Sitterlé, E., Maufrais, C., Sertour, N., Palayret, M., d'Enfert, C., and Bougnoux, M. E. (2019). Within-Host Genomic Diversity of Candida albicans in Healthy Carriers. *Scientific Reports*, *9*(1).

Soll, D. R., and Daniels, K. J. (2016). Plasticity of Candida albicans Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(3), 565–595.

Sookto, T., Srithavaj, T., Thaweboon, S., Thaweboon, B., and Shrestha, B. (2013). In vitro effects of Salvia officinalis L. essential oil on Candida albicans. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *3*(5), 376–380.

The Authors Printed in Denmark. *All Rights Reserved Journal Compilation C*, *115*, 891–900.

St-Germain, G. (2021). *Identification des champignons d'importance médicale Stage de laboratoire Philippe Dufresne mars 2021*.

Stratakos, A. C., and Koidis, A. (2015). Methods for Extracting Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 31–38). Elsevier.

Sugita, T., and Takashima, M. (2011). Yeasts, A Taxonomic Study. *Medical Mycology Journal*, *52*(2).

Swamy, M. K., Akhtar, M. S., and Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (2016). Hindawi Publishing Corporation.

T

Takashima, M., and Sugita, T. (2022). Taxonomy of Pathogenic Yeasts Candida, Cryptococcus, Malassezia, and Trichosporon. *Medical Mycology Journal*, *63*(4).

Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., and Škrlec, I. (2021). Candida albicans-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, *7*(2), 1–19.

Thompson, D. S., Carlisle, P. L., and Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in Candida species. In *Eukaryotic Cell* (10).

Tsui, C., Kong, E. F., and Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of Candida albicans biofilm. In *Pathogens and disease* (74) p. ftw018.

Turek, C., and Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (12) : 40–53p.

Tuttolomondo, T., Iapichino, G., Licata, M., Virga, G., Leto, C., and La Bella, S. (2020). Agronomic evaluation and chemical characterization of sicilian salvia sclarea L. accessions. *Agronomy*, *10*(8).

V

Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., and Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. In *Nutrients* (11). MDPI AG.

Vila, T. V. M., and Rozental, S. (2016). Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In *Fungal Pathogenicity*. InTech.

W

Wijaya, M., Halleyantoro, R., and Kalumpiu, J. F. (2023). Biofilm: The invisible culprit in catheter-induced candidemia. In *AIMS Microbiology* (9): 467–485p. AIMS Press.

Wuyts, J., Van Dijck, P., and Holtappels, M. (2018). Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? In *PLoS Pathogens* (14). Public Library of Science.

X

Xu, Z., Huang, T., Min, D., Soteyome, T., Lan, H., Hong, W., Peng, F., Fu, X., Peng, G., Liu, J., and Kjellerup, B. V. (2022). Regulatory network controls microbial biofilm development, with Candida albicans as a representative: from adhesion to dispersal. In *Bioengineered* (13). 253–267p. Taylor and Francis Ltd.

Y

Yadav, S., and Rao, D. (2024). *Principles and Methods of Seed Viability Testing*.

Z

Zanotti, A., Baldino, L., Scognamiglio, M., and Reverchon, E. (2023). Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil and Sclareol from a Clary Sage Concrete. *Molecules*, *28*(9).

Zhang, Q. W., Lin, L. G., and Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. In *Chinese Medicine (United Kingdom)* (13). BioMed Central Ltd.

Références

Zhumaliyeva, G., Zhussupova, A., Zhusupova, G. E., Błońska-Sikora, E., Cerreto, A., Omirbekova, N., Zhunusbayeva, Z., Gemejiyeva, N., Ramazanova, M., Wrzosek, M., and Ross, S. A. (2023). Natural Compounds of Salvia L. Genus and Molecular Mechanism of Their Biological Activity. In *Biomedicines* (11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

Annexes

Annexe 01 : préparation des solutions utilisées

Solution	Mode de préparation
Préparation de PBS à 0.1%	-Peser 8.89g de phosphate dibasique et le dissoudre dans 500ml d'eau distillé -Peser 4.13g de phosphate monobasique et le dissoudre dans 300 ml d'eau distillé -Mélanger les deux solutions jusqu'à avoir un pH=7.2
Préparation d'eau physiologique0.85%	-Dissoudre 85g de NaCl dans 1L d'eau physiologique
Préparation de milieu Sabouraud 1% de glucose	-Dans 200 ml d'eau distillé on dissout ; -1g de peptone de viande -1g de peptone de caséine -5.8g de glucose -Ajuste le pH avec HCL jusqu'à pH=5,6
Préparation de gélose Sabouraud	-Dissoudre 65g de poudre de gélose déshydraté dans 1L d'eau distillé -Faire bouille le mélange pour 1 min -Stériliser le mélange à l'autoclave à121°c pendant 15 min
Préparation de Cristal violet 1%	- Dissoudre 1 g de Cristal violet dans 100 ml d'eau distillé
Préparation de diluant d'huile essentielle	-Mélanger 200ml de milieu Sabouraud avec 200µl de Tween 80
La Solution mère d'huile essentielle à460mg/ml	- Détermine d'abord la densité d'huile (la concentration de l'huile essentielle pure), on mesure la masse de flacon vide et la masse d'un flacon avec 1 ml d'huile. -Prélever 1 ml de l'huile essentielle pure et l'ajoute à 1 ml de diluant (milieu Sabouraud et Tween 80)
La solution d'huile essentielle utilisée pour l'ATCC (19.14 mg /ml)	-Prélever 40µl d'huile essentielle à 460mg/ml. -Ajouter 960µl de milieu Sabouraud
La solution d'huile essentielle utilisé pour la *Candida* 07 et *Candida* 08 (14.37 mg/ml)	- Prélever 50µl d'huile essentielle à 460mg/ml - Ajouté 1550µl de milieu Sabouraud