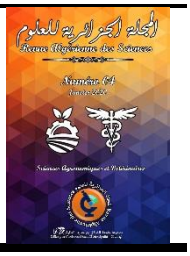
REVUE ALGERIENNE DES SCIENCES -A
Sciences de la Nature et de la Vie
Sciences techniques

ISSN : 2661-7064
http://univ-eltarf.dz/fr/



Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* Labill. Et *Rosmarinus officinalis* L. sur *Candida albicans* isolées des cas d'otomycoses et de vulvo-vaginites

Ksouri Samir[a,*], Djebir Soumia[a], Bouguerra S[a], Nedjaoum A[a], Rouaiguia A[a]

[a] Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences and Earth Sciences and the Universe, University of 8 Mai 1945 Guelma, BP 401 Guelma 24000, Algeria

Informations

Mots clés :

Activité antifongique
Candida albicans
Huiles essentielles
Eucalyptus globulus
Rosmarinus officinalis L

***Correspondance :**
ksourisamir@gmail.com

Reçu le 03/01/2020, Révisé 16/02/2020, Accepté le 01/03/2020.

Résumé

L'objectif de cette étude est de limiter l'utilisation des antifongiques dans le traitement de quelques pathologies mycosiques afin de rechercher d'autres solutions alternatives curatives. L'activité antifongique des huiles essentielles de Ro*smarinus officinalis* L. et d'*Eucalyptus globulus* est étudiée dans le présent travail contre une souche de référence *Candida albicans* et sur trois isolats cliniques de cette même espèce provenant de deux cas d'otite et un cas de vulvo-vaginite. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation. L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de dilution en tube afin déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI 80%). Les deux huiles essentielles ont révélé une activité anticandidosique remarquable, avec des valeurs de CMI 80% comprises entre 2.93 à 37.2 µg/ml. Ces résultats suggèrent que les huiles essentielles étudiées, peuvent constituer des véritables alternatives dans le contrôle des otites et des vaginites cliniques mais méritant des études plus approfondies et détaillées sur leur application in vivo.

1. Introduction

Les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques ; ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies et les infections. Les perspectives d'application sont nombreuses comme par exemple, le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale (Shapiro et *al.,* 1994) et du système respiratoire (Inouye et *al.,* 2001). Les huiles essentielles s'opposent au développement des germes tels que les bactéries pathogènes, y compris les souches habituellement antibiorésistantes, les champignons responsables de mycoses dont, les doses actives sont en général faibles et se traduisent soit par l'inhibition de la croissance des micro-organismes soit par un effet létal (Bruneton, 1993). En effet, la communauté scientifique soit constamment à la recherche de nouvelles molécules douée d'une activité antifongique. Par ailleurs, le traitement des infections fongiques repose à l'heure actuelle sur l'utilisation des antifongiques conventionnels. L'utilisation intensive de ces molécules a malheureusement conduit à une augmentation de l'incidence des résistances aux antifongiques. Dans cet esprit, notre objectif est à la recherche d'une substance naturelle à activité antifongique, cela est assurée par l'évaluation de l'activité anticandidosique des huiles essentielles des deux plantes aromatiques ; *Eucalyptus globulus* Labill. et *Rosmarinus officinalis* L. en déterminant les valeurs de la concentration minimale inhibitrice à 80% de *Candida albicans.* Nous avons choisi cette espèce fongique, car *Candida albicans* est une espèce très fréquente en pathologie humaine et animale (Euzeby, 1992) et la plus pathogène (Bouchara et *al*., 2010).

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel fongique

L'activité antifongique des deux huiles essentielles a été évaluée sur une seule espèce de champignons levuriformes, *Candida albicans*. La souche ATCC 10231 de *Candida albicans* (Institut Pasteur d'Alger) et trois isolats cliniques de la même espèce ont été testé*.* Ces isolats cliniques ont été identifié par examen macro et microscopique ainsi la culture sur milieux spécifiques et la recherche des caractères auxanographiques. Deux souches de *Candida*

albicans ont été isolées à partir de deux cas clinique d'otites, examiné par un médecin otorhinolaryngologiste. La troisième souche testée a été isolée à partir d'un cas clinique d'une vulvo-vaginite des femmes enceintes.

2.2. Matériel végétal

Les feuilles et les sommités fleurées de *Rosmarinus officinalis* L. ont été collectées dans leur habitat naturel, de la région d'Ouenza (Chaîne de Gora) de la wilaya de Tébessa, au mois de Mars 2017. Pour la seconde plante aromatique, *Eucalyptus globulus* Labill. Seules les feuilles ont été échantillonnées en Mars 2017 sur des arbres de territoire de la wilaya de Guelma, commune de Bouchegouf (Djebel Beni Salah).

2.3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger. L'opération consiste à introduire 100 g de matériel végétal séché dans un ballon en verre, puis submergé les plantes avec une quantité d'eau distillée. À l'aide d'un chauffe-ballon, le mélange est porté à l'ébullition, l'opération dure trois heures à partir du début d'ébullition. Les vapeurs d'eau entrainent les huiles essentielles volatiles, qui sont ensuite condensées par un condenseur froid (serpentin de refroidissement) qui les transforme en liquide. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, surnage à la surface. Elle est récupérée, mesurée et pesée pour déterminer le rendement en fonction de la matière sèche.

$$R_{HE}\ (\%) = M'/M \times 100$$

R_{HE} : *rendement exprimé en pourcentage.*
M' : *masse d'HE obtenue après l'extraction.*
M : *masse de la matière végétale utilisée.*

2.4. Méthode d'évaluation de l'activité des huiles essentielles étudiées (Fig. 1)

Nous avons utilisé la technique de dilution en tube décrite par Giordani et *al*. (2002, 2003).

- Préparation des différentes dilutions d'huiles

On prépare 10 dilutions à partir de la dilution ½ par mélange dans un tube conique stérile, 0.5 ml d'eau stérile avec 0.5 ml d'huile essentielle (solution mère) puis on a réalisé des dilutions à partir de cette solution mère qui sont respectivement (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024).

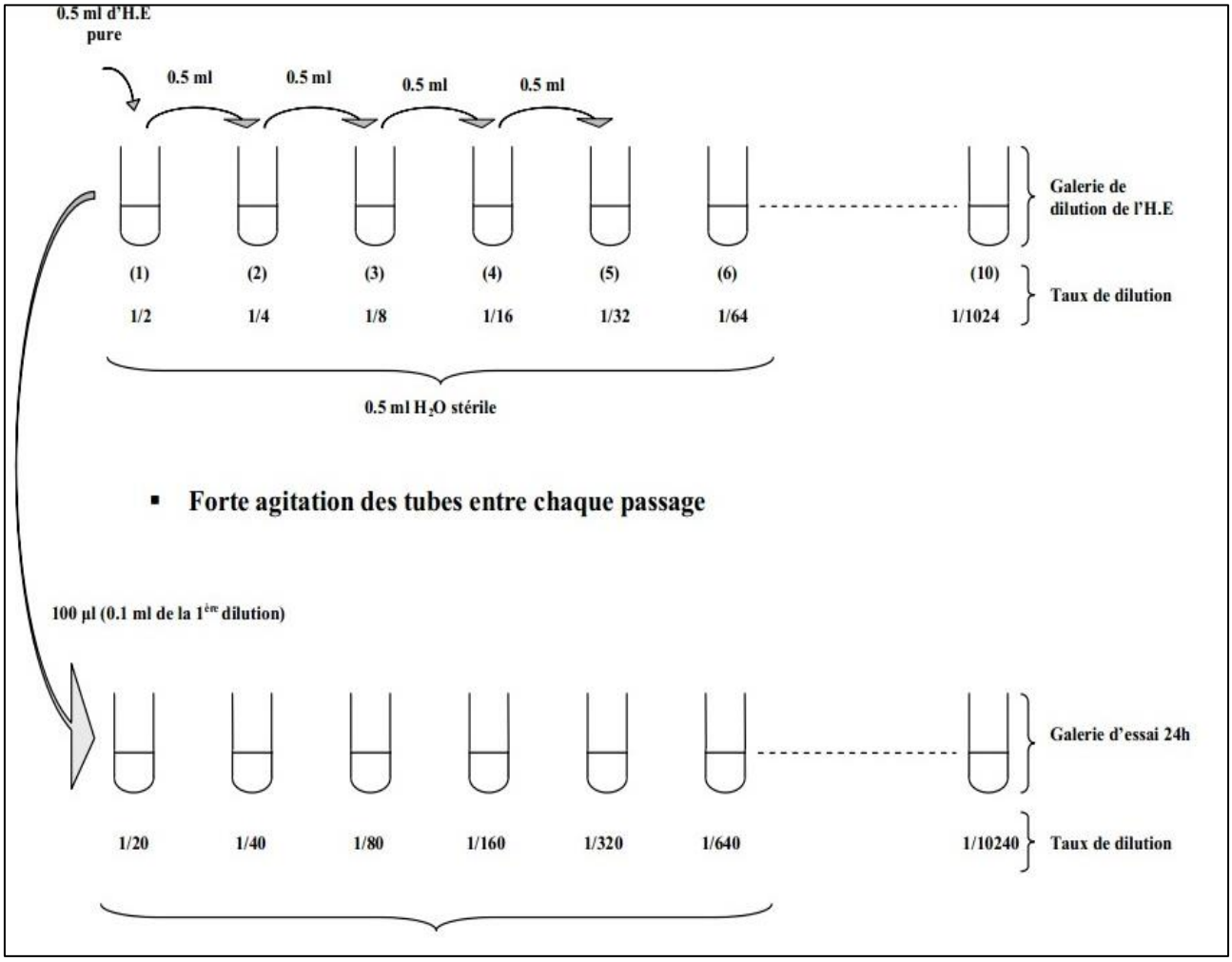
- Préparation du milieu Sabouraud liquide inoculé

Pour préparer une suspension de levure de turbidité de 0.5 Mac Farland, on mélange dans des tubes de Sabouraud liquide additionné de gentamycine à 0.1 g/L avec une colonie de *Candida albicans* puis homogénéiser le tous à l'aide d'un vortex. Ensuite faire une lecture de la préparation au spectrophotomètre afin de mesurer la densité optique à 600 nm contre la densité optique de milieu de Sabouraud liquide (Joseph, 1907). On a mis séparément 0.9 ml de la suspension inoculé (contenant la souche fongique) dans 10 tubes coniques stériles, puis on ajoute de chaque tube correspondant de série des tubes de dilution d'huile essentielle, 0.1 ml (100µl) dans les 0.9 ml de milieu de culture inoculé (figure 1). L'incubation est assurée au bain marie va et vient à 35°C pendant 24 heures. À la longueur d'onde de 560 nm, on fait la lecture contre le milieu de culture. Les données expérimentales (Densité Optique Mesurés ou D.O mesurés) sont soumises à une analyse statistique. La représentation graphique de l'inhibition de la croissance fongique en fonction de la concentration en huiles essentielles présente un aspect hyperbolique dont l'équation :

$$Y = a.x/(b + x)$$

a: l'inhibition maximal calculée.
b: concentration en antifongique qui induit une inhibition égale à la moitié de l'inhibition maximale calculée.

L'utilisation d'un logiciel (Développer par le département de pharmacie de l'université de la Méditerranée, Aix-Marseille, 2000) d'ajustement permet de déterminer les paramètres a et b. On peut assimiler cette représentation graphique de l'inhibition à une courbe de saturation enzymatique d'où l'on déduit, d'une part, la concentration minimale inhibitrice (CMI 80%) qui caractérise le taux d'activité antifongique et d'autre part, la constante d'affinité (K_{aff}) de l'antifongique pour la levure.



- Les tubes essais sont mis à incuber à 35 °C durant 24h dans un bain marie agité
- La lecture sera faite à 560 nm contre un MC (milieu de culture).

Fig. 3 : Technique de dilution en tubes selon Giordani et *al*. (2002, 2003)

3. Résultats

Le **Tableau 1** récapitule tous les résultats de rendement moyen des huiles essentielles extraites à partir de 100 g de chaque plante aromatique.

Tableau 1 : Rendement des huiles essentielles étudiées.

Espèce	Quantité d'huile essentielle (g) pour 100 g de matière végétale sèche	Pourcentage de rendement %
***Eucalyptus globulus* Labill.**	2.43	2.43 ± 0.23
***Rosmarinus officinalis* L.**	1.82	1.82 ± 0.16

Dans le tableau ci-dessous, nous avons récapitulé les valeurs de CMI 80% qui ont été enregistré au cours de cette étude pour chaque huile essentielle.

Tableau 2 : Valeurs des CMIs 80% des huiles essentielles enregistrées pour les deux espèces

	Eucalyptus globulus		***Rosmarinus officinalis***	
Souche	**CMI 80% µl/ml**	**K_{aff}**	**CMI 80% µl/ml**	**K_{aff}**
N°1	4.78	1.35	5.79	0.47
N°2	3.15	1.33	21.87	0.064
N°3	40	1.85	8.8	0.40
ATCC 10231	18.39	1.58	17.65	0.16

Les résultats montrent que les valeurs de CMI à 80% pour les deux huiles essentielles, allant de 3.15 à 40 µl/ml soit 2.93 et 37.2 µg/ml. La souche ATCC 10231 a enregistrée une valeur de CMI 80%, 18.39 µl/ml soit 17.10 µg/ml pour l'Eucalyptus, 17.65 µl/ml soit 16.41 µg/ml pour romarin. Ces deux valeurs sont incluses à l'intervalle des CMI 80% enregistré sur les isolats cliniques.

4. Discussion

Nos échantillons de *Rosmarinus officinalis* L. récolté en Mars 2017 de la Chaîne de Gora de la région d'Ouenza (Wilaya de Tébessa), ont fourni un taux de 1.82%. Ce dernier est très semblable par rapport à celui obtenu à partir de cette plante prélevée de la région de Hammamet (wilaya de Tébessa) avec une valeur de 1.85% (Boutabia et *al*., 2016). Une autre valeur de rendement des huiles essentielles de cette plante collecté de cette même région par Baghloul (2007) apparait supérieure de la nôtre à combien (1.82%). Par ailleurs, sur des échantillons provenant d'Ouargla, Benikhlef (2014) a trouvé un rendement moyen très faible 0.76% par rapport à notre échantillon. De même, 0.44% a été enregistré par Boutekedjiret et *al*. (2003) dans la région de Bibanes, localisé 200 km de l'Est de l'Algérie. Le rendement moyen en huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Labill. récoltée en Mars 2017 au niveau de la région de Bouchegouf (Wilaya de Guelma) est de 2.43%. Cette valeur est très importante de ce qui a été enregistré par Bessedik et Khenfer (2014) sur ses échantillons de la même plante effectué dans la région d'Ouargla (1.17%). Tandis que dans cette même région, un rendement très faible a été obtenu par Kesbi (2011) avec une valeur de 0.51%. De même, un rendement de 0.48% a été rapporté par de Taleb-Toudert (2015) dans la Kabylie de notre pays. Cette variabilité chimique pourrait être due à plusieurs paramètres tels que la partie de la plante utilisée, la période de récolte, la région, la nature du sol et la méthode d'isolement des huiles essentielles (Brada et *al*., 2012).

L'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de cette plante sur les trois isolats cliniques de *Candida albicans* a permis de déterminer des valeurs de CMI à 80% allant de 5.79 à 21.87 µl/ml soit 5.38 à 20.34 µg/ml. La souche ATCC 10231 a été également inhibée à une valeur de CMI 80% de 17.65 µl/ml soit 16.41 µg/ml. Cette valeur est incluse à l'intervalle des CMI 80% enregistré sur les isolats cliniques. Ces valeurs de CMI 80% observés sur toutes les souches de *Candida albicans* sont proches en les comparants avec la CMI 80% de cette même plante collectée par Ksouri et *al*. (2017) de la même région avec des valeurs de 23.99 à 31.08 µg/ml ont été obtenues sur la souche ATCC (10231) et des isolats de mammite clinique de cette même espèce. Dans leur étude sur *Rosmarinus officinalis* L. récolté de la région d'Annaba, Giordani et *al.* (2008) ont trouvé un pouvoir antifongique très important avec des valeurs de CMI 80% de 2.208 µg/ml plus faible à ce qu'on a trouvé. Par contre, les résultats d'une étude menée par Djeddi et *al.* (2007), sur les plantes de *Rosmarinus officinalis* L. récoltées d'El Hamma (Alger) en mars 2005, ont montré que l'huile essentielle de cette plante, n'a présenté aucune activité anticandidale.

A propos des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* Labill., une activité antifongique a été enregistré avec des valeurs de CMI 80% se trouve entre 3,15 et 40 µl/ml soit 2.93 et 37.2 µg/ml, pour les trois isolats cliniques de *Candida albicans* et une valeur de 18.39 µl/ml soit17.10 µg/ml, pour la souche ATCC 10231. Cette dernière valeur est appartenue à l'intervalle des CMIs 80% des souches cliniques. Nos résultats sont différents lorsqu'on les compare avec ceux de Bessedik et Khenfer (2014) dans la région d'Ouargla où ils ont enregistré une très forte activité antifongique de cette essence avec une CMI 80% très faible de 0.75 µl/ml. De même, l'étude de Riyaha (2013) réalisée au Maroc, montre une excellente activité antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* Labill. avec des valeurs de CMI 80% allons de 0.5 à 1 µl/ml. En revanche, l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Labill testée dans le présent travail, montre une activité anticandidale très supérieur à celle testée par Daroui-Mokaddem (2012) où il a trouvé une valeur de CMI 80% supérieur (160 µg/ml) sur des échantillons récolté de la région de Constantine.

5. Conclusion

Les plantes utilisées dans la présente étude, *Eucalyptus globulus* Labill. et *Rosmarinus officinalis* L. possèdent un très bon rendement d'extraction d'huile essentielle, ce qui est très intéressant pour l'exploitation de ces essences dans le domaine industriel. Quant à l'évaluation des activités antifongiques de ces deux huiles essentielles provenant de ces deux plantes aromatiques endémiques de la région de Guelma et de Tébessa, ont donnée des résultats très encourageant en évaluant leur pouvoir anticandidosique sur *Candida albicans* isolées d'otite et de vulvo-vaginites. Ces propriétés antifongiques convaincantes, peuvent être liées à leurs richesses probablement en constituants phénoliques comme celles de 1,8–cinéole, L-camphre, α-terpinéol, bornéol, globulol, α-pinène, p-cymène et pseudo-limonène. Cette étude montre que la flore algérienne peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que l'industrie pharmaceutique. Enfin, nos résultats suggèrent que les huiles essentielles étudiées, peuvent constituer des véritables alternatives dans le contrôle des otites et des vulvo-vaginites candidosiques mais méritant des études plus approfondies et détaillées sur la toxicité et la tolérance de ces huiles essentielles vis-à-vis la muqueuse auriculaire et vaginale.

Référence :

[1] Shapiro S., Meier A., Guggenheim B. 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. Oral. Microbiol. Immunol., 9: 202-208.

[2] Bruneton J. 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, Tec &Doc. Lavoisier, Paris, 2ème édition, 915 p.

[3] Euzeby J. 1992. Mycologie Médicale Comparée, Les Mycoses Des Animaux Et Leurs Relations avec Les Mycoses De L'homme. Edition Vigot Frères, Tome 1 : 9-262.

[4] Giordani R., Buc J., Regli P. 2002. Mathematical modelling of antifungal action. Mycoses, 45 : 482-487.

[5] Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Portugal H., Buc J.J. 2003. In vitro synergistic effect of a mixture of Hevea brasiliensis latex and essential oil from Thymus vulgaris with amphotericin B against Candida albicans growth. Mycol. Med, 13: 87-91. Doi : JMM-06-2001-13-2-1156-5233-101019-ART4

[6] Giordani R., Hadef Y., Kaloustian J. 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils,of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia, 79: 199-203.

[7] Benikhlef A. 2014. Comparaissant entre les huiles essentielles et leurs effets antibactériens sur Rosmarinus officinalis de la région de Bechar et Ouargla réalisé. Mem. Mas. Agr et fors. Univer Abor Belkaid-Tlemcen., 27.

[8] Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessiere J.M. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour Fragr. J., 18: 481-488; Doi 10.1002/ffj.1226.

[9] Bessedik M et khenfer B. 2014. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et Thymus Algeriensis contre quelques champignons phytopathogènes des palmes du palmier dattier (Phoenix dactylifera L). Mém. Mas. Bio vég. Univ Kesdi Merbeh Ouargla., 51.

[10] Taleb-Toudert K. 2015. Extraction et caractérisation des huiles essentilles de dix plantes aromatiques prenant la région de Kabyl (Nord Algerie). Evaluation de leurs effets sur la bruche des niébé Colossobruchus maculatis (Coloeptra : Bruchudae). The. Doc. Bio ani et vég. Univer Mouloud Mammeri Tezi Ouzou, 160.

[11] Brada M, Saadi A, Wathelet JP, Lognay G. 2012. The Essential Oils of Origanum majorana L. and Origanum floribundum Munby in Algeria. Jeobp. 15 (3) : 497-502.

[12] Ksouri S., Djebir S,. Bentorki A.A., Gouri A., Hadef Y., Benakhla A., 2017. Antifungal activity of essential oils extracts from Origanum floribundum Munby, Rosmarinus officinalis L. and Thymus ciliatus Desf. Against Candida albicans isolated from bovine clinical mastitis. Journal de Mycologie Médicale., 684 :5. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.004

[13] Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa H.D. 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Algeria. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 43, No. 4: 487-490.

[14] Daroui-Mokaddem H. 2012. Etude physique et biologique des espèces Eucalyptus globulus (Myrtaceae), Smyrnium olusatrum (Apiaceae), Asteriscus maritimus ET Chrysanthemum trifurcatum (Asterarceae). Thèse de Doctorat Chimie appliqué Univer Badji Mkhtar Annaba., 197.

[15] Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou I.B. 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species J. Agric. Food Chem., 49:4168-4170.

[16] Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T.. 2001. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. J Infect Chemother., Dec;7(4):251-4. DOI: 10.1007/s101560170022

[17] Boutabia L., Telailia S., Bouguetof I., Guenadil F., Chefrour A. 2016. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 85 : 174 – 189.

[18] Baghloul F. 2007. Caractérisation chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle du Romarin. Mémoire Magister en Biochimie Appliquée. Univ. Badji Mokhtar-Annaba, 62 p.

[19] Kesbi A. 2011. Étude Des Propriétés Physicochimique Et Évaluation L'activite Biologique Des Huiles Éssentielles D'eucalyptus Globulus Dans La Région De Ouargla. Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés Option : Génie Chimique, Universite Kasdi Marbah Ouargla.

[20] Riyaha H. 2013. Valorisation des plantes aromatiques et médicinales:étude du potentiel chimique et antibactérien des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis (sauvage et domestiqué). Master Sciences Et Techniques Gestion & Conservation De La Biodiversite, Universite Sidi Mohamed Ben Abdellahf Aculte Des Sciences Et Techniques Fes, Faculte des sciences et techniques fes, 38 p.

[21] Bouchara J.P., Pihet M., de Gentile L., Cimon B., Chabasse D. 2010. Les levures et levuroses. Cahier De Formation Biologie Médicale. Bioforma ; N° 44, Juin : 1-200.