

**Université Sidi Mohamed Ben Abdallah
Faculté des Sciences Dhar El Mehrez
Fès**

**BIOLOGIE
Pharmacologie expérimentale**

**Evaluation *in vitro* de l'Action Antifongique des
Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de
leurs Composés Majoritaires *in vivo*
*Application dans la Prophylaxie et le Traitement de
la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de
Souris Immunodéprimés***

Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences

**Présentée par : Chami Fouzia
Et soutenue publiquement le 12 Février 2005
Devant le jury**

Pr : Jacqueline Trouillas (Présidente)	Faculté de médecine Lyon I France
Pr : Adnane Remmal	Faculté des Sciences Fès
Pr : Abderrahim Ziyat (Rapporteur)	Faculté des Sciences Oujda
Pr : Abdelmajid Ziad (Rapporteur)	FST Béni Mellal
Pr : Abdelghafour Tantaoui Elaraki (Membre)	Sup Agro Casablanca
Dr : Jean Claude Tardy (Membre)	Hôpital de la croix Rousse Lyon
Pr : Marie-Antoinette Piens (Membre)	Faculté de médecine Lyon I France
Pr : Mohammed Belemlih (Membre)	Faculté des Sciences Fès

RESUME

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles (HE) extraites des plantes aromatiques a été largement décrite *in vitro* dans plusieurs études

La première partie de ce travail consiste à tester l'activité antifongique d'une vingtaine d'HE de familles chimiques différentes sur trois souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* en utilisant une méthode améliorée et standardisée dans notre laboratoire. Ce test montre que les HE les plus fongicides ont pour composé majoritaire des substances de nature phénolique. Parmi ces huiles, les HE d'origan et de girofle ont été choisies afin d'étudier le mécanisme d'action fongicide sur *Saccharomyces cerevisiae*. La lyse des cellules fongiques se traduit par une libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm. En plus l'observation au microscope électronique à balayage montre que l'enveloppe cellulaire de *S. cerevisiae* traitée par ces deux huiles d'origan et de girofle est fortement altérée

La deuxième partie de travail consiste à mettre en évidence l'activité anticandidosique *in vitro* du carvacrol et de l'eugénol, composés majoritaires phénoliques respectifs des HE d'origan et de girofle et de tester cette activité *in vivo* en utilisant le modèle expérimental de la candidose vaginale chez le rat immunodéprimé. Ces deux composés majoritaires sont utilisés en prophylaxie et en traitement thérapeutique. L'efficacité des deux types de ces deux molécules est mise en évidence par des techniques microbiologiques et histologiques en comparaison avec la nystatine utilisée comme traitement de référence.

Les résultats obtenus montrent que le traitement prophylactique au carvacrol élimine entièrement la charge fongique vaginale des rats infectés alors que le traitement par l'eugénol réduit le nombre d'unités formant colonie (UFC) de *Candida albicans* dans les vagins des rats infectés de 98,90 % 10 jours après l'inoculation.

Le traitement thérapeutique par le carvacrol pendant 7 jours consécutifs est capable d'éradiquer la charge fongique vaginale chez 7/9 des rats infectés, alors que celui par l'eugénol est capable de guérir 2/9 des animaux infectés et les 7/9 restants montrent un pourcentage de réduction d'UFC de 84,83% dans leur vagin. Sur le plan histologique, tous les rats traités montrent une absence totale de *C. albicans* dans leur lumière vaginale contrairement aux témoins infectés non traités qui montrent une présence remarquable de *C. albicans* dans toutes ses formes dans la lumière vaginale révélée par la coloration PAS (Periodic Acid. Schiff). Les résultats obtenus avec le traitement par la nystatine utilisée à 10 x CMI confirment la validité de ce modèle expérimental.

La troisième partie du travail consiste à évaluer l'activité anticandidosique du carvacrol et de l'eugénol en utilisant comme modèle expérimental la candidose vaginale œstrogène dépendant chez la souris immunodéprimée. Cette activité est évaluée microbiologiquement après un traitement thérapeutique de cinq jours. Ce traitement a été comparé à celui de la nystatine utilisée comme témoin de référence.

Les résultats montrent que le traitement par le carvacrol est efficace puisque 6/8 des animaux sont complètement guéris. Les deux animaux restants ont une charge fongique significativement plus faible que celle des témoins positifs. (91% de réduction). Cinq jours après l'arrêt du traitement, aucune récurrence n'a été observée. Le traitement par l'eugénol s'avère aussi efficace puisque 5/8 des animaux sont guéris au bout de cinq jours de traitement après lesquels aucune récurrence n'a été constatée. Le traitement par la nystatine permet une guérison de tous les animaux. Néanmoins, 25% d'entre eux montrent une récurrence de l'infection cinq jours après l'arrêt du traitement.

En conclusion; Le carvacrol et l'eugénol peuvent être considérés comme une base pour la mise au point d'une nouvelle génération très prometteuse d'agents antifongiques naturels pouvant être utilisés contre les infections rebelles aux agents antifongiques classiques.

Mots clés *Candida. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*,. Activité anticandidosique, Huile essentielle, Carvacrol, Eugénol.

Summary

The antimicrobial properties of volatile aromatic essential oils (EO) have been reported *in vitro* for many years ago, but no molecular level of their mode of action has been studied

In the first part of this work, we have tested the fungicidal activity of twenty EO from different chemical families on three strains of *Saccharomyces cerevisiae*, using our standardized method, improved in our laboratory. The results show that the most fungicidal EO are those which possess phenolic component as the major component. Among the three EO which show the strong fungicidal action, oregano and clove ones were chosen to bring out some information about the mechanism of the fungicidal action. *Saccharomyces cerevisiae* was used as yeast model. The treatment of yeast cells with these EO led to their lysis as demonstrated by the release of absorbing substances at 260nm. In addition, Scanning electron microscopy analyses revealed that the surface of treated cells by oregano and clove oils was significantly damaged.

The second part of this work aims to study the anticandidale efficacy of eugenol and carvacrol, the major phenolic components of oregano and clove EO respectively *in vitro* and *in vivo* in the prophylaxis and treatment of experimental vaginal candidiasis in immunosuppressed rats. The anticandidal activity was analysed by microbiological and histological techniques and was compared with that of nystatin. Microbiologically, prophylactic treatment with carvacrol eradicated the vaginal fungal burden of infected rats, whereas eugenol reduced the number of colony counts of *Candida albicans* in vaginas of infected rats by 98.9%, 10 days after inoculation. Therapeutic treatment for 7 consecutive days with carvacrol was able to eradicate the vaginal candidal burden in 7/9 of the infected rats and reduced the number of colony counts of *C. albicans* in vaginas of the two remaining rats by 98%. Treatment with eugenol completely cured 2/9 of the infected animals, but the 7/9 still infected showed an 84% reduction of colony counts of *C. albicans* in their vaginas. Histologically, in all treated rats, no *Candida* organisms were found in the lumina of the vagina; this was in contrast to control groups in which many yeasts, strongly stained with periodic acid-Schiff (PAS), were observed. The results obtained with nystatin used at 10-fold minimal inhibitory concentration confirm the validity of this model.

The third part of this study consists of testing the anticandidale activity of carvacrol and eugenol in the treatment of experimental vaginal candidiasis oestrogen dependent in the immunosuppressed mice. The anticandidale activity was analysed by microbiological technique and compared with that of nystatin. The treatment with carvacrol was efficient since 6/8 of animals were completely cured while the two remainder had a fungal burden significantly reduced ($P < 0,05$) compared to untreated mice. Five days after the interruption of treatment, no relapse was observed. The treatment with eugenol was also efficient since 5/8 were totally cured after five days of treatment and any relapse was established. Nystatin led to a cure of all mice; however, 25% had relapse after five days of the interruption of treatment.

Conclusions: Carvacrol and eugenol could be considered as promising products in the treatment of vaginal candidiasis. This work is a preliminary contribution to the development of a new generation of efficient and natural antifungal agents for curative treatment and prophylaxis.

Key word index *Candida. albicans*, *Saccharomyces Cerevisiae*, Anticandidal activity, Essential oils, Carvacrol, Eugenol.

**Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles
essentielles d'origan et de girofle
et
de leurs composés majoritaires *in vivo* dans la prophylaxie et
le traitement de la candidose vaginale
sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés.**

Introduction bibliographique

I. Caractères généraux des Fungi

Le règne des Fungi ou règne des mycètes est constitué d'organismes eucaryotes, principalement multinuclés dont les noyaux sont dispersés dans un mycélium avec paroi. Ce sont principalement des organismes terrestres dont les cellules sont organisées en un appareil végétatif primitif, le thalle. Chez la majorité des espèces fongiques, le thalle est formé d'un enchevêtrement de filaments; les mycéliums, pouvant donner naissance à des spores sexuées ou asexuées.

La plupart des mycètes sont saprophytes, excepté les champignons parasites responsables de certaines maladies et qui peuvent infecter les plantes et les animaux.

Les mycètes se subdivisent principalement en deux formes:

- La forme moisissure : filaments longs, fins et ramifiés à structure cellulaire appelée hyphe formant un mycélium, souvent visibles à l'œil nu.
- La forme levure : champignons microscopiques unicellulaires possédant un seul noyau et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement ou scissiparité, soit par reproduction sexuée par formation de spores. Les levures constituent un thalle particulier dans lequel les cellules restent agglomérées en colonies. Chaque levure représente la forme végétative, et dans la plupart des cas, la forme de résistance et de dissémination de l'espèce. On compte 597 espèces de levures (Barnett et coll., 1990). En pratique, les critères morphologiques et physiologiques sont suffisants pour identifier et discriminer le nombre réduit d'espèces de levures impliquées en pathologie humaine. (Tableau: I).Cependant, Le nombre de maladies fongiques ne cesse d'augmenter, car en plus des champignons pathogènes connus comme *Candida*, *Cryptococcus* et d'autres, les mycologistes pensent qu'il y aurait d'autres espèces qui peuvent être pathogènes ; les espèces *Aspergillus* sont en rapport avec les pneumonies, *Fusarium*, la plante pathogène a été isolée chez des patients souffrant de maladie de sang et

même *Saccharomyces*, la levure est capable de provoquer des infections chez des personnes brûlés,(Alcamo, 1997)

Type d'infection	Agent responsable	Site d'infection
Cryptococcoses	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Poumon, cerveau (méninges et liquide céphalorachidien)
Candidoses	<i>Candida albicans</i> <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i>	Peau et muqueuses, tractus gastro-intestinal et sang
Dermatophytoses	<i>Trychophyton</i> , <i>Microsporum</i> , <i>et Epidermophyton</i>	Cuir chevelu, peau, ongles
Histoplasmoses	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Poumon
Blastomycoses	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Visage, mains et pieds, infection des poumons par inhalation
Coccidioidomycoses	<i>Coccidioides immitis</i>	Poumons
Aspergilloses	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>et</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Poumons, oreille, sang, foie
Sporotrichoses	<i>Sporothrix schenkii</i>	Peau

Tableau I: Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme (d'après Alcamo, 1997).

II. Les *Candida*

Candida appartient à la classe des Deuteromycètes. Au sein des levures, le genre *Candida* anciennement appelé *Monilia* compte actuellement 166 espèces et regroupe les levures non pigmentées formant des colonies blanches crémeuses. La nomenclature des différentes étapes

morphologiques du développement de *Candida* a été clairement définie ; les bourgeons incluent la croissance de nouveau matériel à partir d'un site particulier de la blastospore. Quand le bourgeon atteint une taille donnée, la division nucléaire se produit et un septum se forme entre les 2 entités cellulaires. L'hyphe est défini comme étant un tube microscopique qui contient différentes cellules séparées par des septa. L'hyphe peut émaner d'hyphe préexistants ou de blastospores. Les hyphes qui se développent à partir de blastospores sont dits tubes germinatifs et ils poussent continuellement par extension apicale. Les blastospores qui sont produits l'un à partir de l'autre de façon linéaire sans séparation forment des pseudohyphes. Les vrais septa sont produits par plusieurs espèces de *Candida* tel que *C.tropicalis* dans certaines circonstances (semi-anérobiose, développement *in vivo*), mais les vrais hyphes sont associés à *C.albicans*. Enfin, la totalité des agrégats cellulaires incluant les hyphes et les branches latérales des bourgeons sont regroupés sous le nom de mycélium (Odds, 1988).

1. Caractéristiques macroscopiques:

Les espèces de *Candida* forment des colonies de couleur blanche, avec une odeur typique de levure lorsqu'ils poussent en milieu aérobie à pH entre 2,5 et 7,5 et une température comprise entre 20 et 38°C. Leur croissance nécessite souvent 48 à 72h, alors que celle d'une préculture en milieu liquide agité se fait plus rapidement. La capacité de ces levures de se multiplier à 37°C est l'une des caractéristiques à prendre en considération pour leur identification à partir des espèces isolées cliniquement puisque la plupart des espèces pathogènes et saprophytes croissent facilement entre 25 et 37°C

2. Caractéristiques microscopiques

D'une manière générale, l'apparence microscopique de toutes les espèces de *Candida* est similaire. La taille des levures varie entre 3 et 15µm de diamètre. Elles sont formées à partir d'une cellule initiale selon un processus de bourgeonnement donnant naissance à des cellules

sphériques ou oblongues encore appelées blastospores ou blastoconidies, mais parfois la forme des blastospores peut changer de la forme ovoïde (*C.albicans*) ou allongée (*C.krusei* et *C. pseudotropicalis*) à la forme sphérique (Odds, 1988). Toutes ces formes de croissance, blastoconidies, pseudomycéliums et mycéliums sont réversibles et susceptibles d'être observées dans les tissus humains parasités. En règle générale, les *Candida* commensaux se développent sous forme de blastoconidies alors que la phase parasitaire est filamenteuse. Toutes les levures sont à Gram positif

3. *Candida albicans*

C.albicans présente, par rapport aux autres levures du genre *Candida*, deux stades morphologiques spécifiques, ce qui lui confère le caractère de champignon dimorphique avec une transition des blastoconidies à la forme filamenteuse (Photo 1):

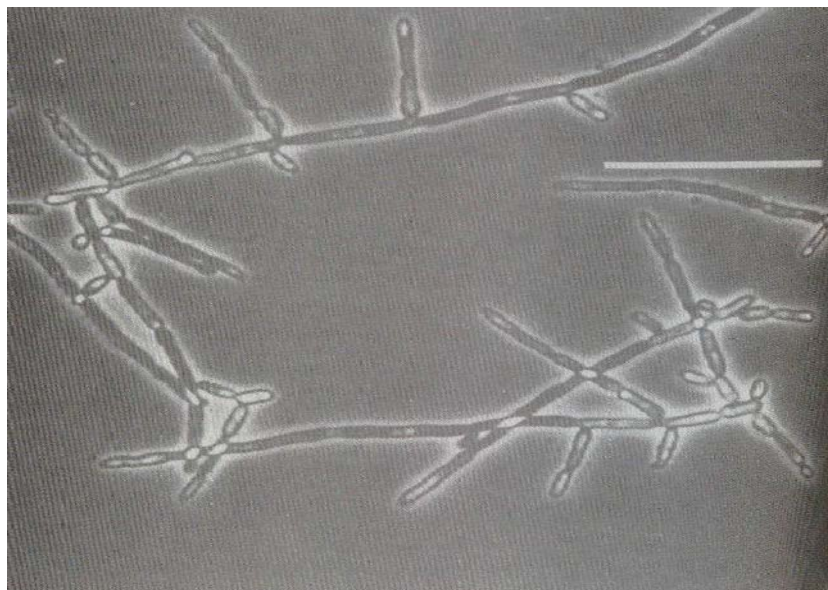


Photo1: Photo de microscopie à contraste de phase *C. albicans* dans sa forme mycélienne

La barre à droite = 40 μ m (Alcamo, 1997)

- la première forme est celle des blastoconidies;
- la seconde est celle du mycélium vrai, résultant d'une croissance apicale qui débute en quelques heures par la formation d'un tube germinatif. Ce dernier est un élément flexueux qui va ultérieurement s'allonger et se rigidifier. Ce mycélium participe dans les processus d'infection (Kerridge, 1993).

La production de pseudomycéliums chez *C. albicans* est l'une des propriétés qui la différencient de *C. glabrata* qui, elle, ne forme pas de pseudomycéliums. Lorsque les conditions de croissance sont défavorables, *C. albicans* peut prendre la forme d'une grosse spore ronde, réfractaire, à paroi très épaisse qui se forme à l'extrémité des rameaux pseudomycéliens; la chlamydospore. Cette transition morphologique représente souvent une forme d'adaptation morphologique aux différentes niches biologiques. La chlamydospore constitue également un critère d'identification de *C. albicans* (Warren et Shadomy, 1991).

4. Ultrastructure de la cellule de *C.albicans*

4.1. Le noyau

Contrairement à ce qui est généralement observé chez les autres cellules eucaryotes, la membrane nucléaire persiste durant la division cellulaire de *C. albicans*. *C. albicans* est une espèce diploïde dont la principale caractéristique du génome est le polymorphisme. Ainsi, une simple analyse du caryotype par électrophorèse permet de différencier les souches de *Candida* selon la taille et le nombre des chromosomes (7 à 12) (Rustchenko-Bulgac et Howard 1993). Cette analyse est mise à profit pour la différenciation épidémiologique des souches de *Candida* selon leurs profils électrophorétiques de chromosomes ou selon leurs profils d'ADN après coupure par les enzymes de restriction et hybridation des séquences répétées. Les séquences conservées et spécifiques servent pour l'identification des espèces par la technique de PCR (polymerase chain reaction) (Miyakawa et coll., 1992).

4.2. Le cytoplasme

Le cytoplasme contient tous les organites typiques de la cellule eucaryote: ribosomes, mitochondries, et vacuoles. Mis à part le développement d'un système vacuolovésiculaire qui évolue en relation avec le cycle cellulaire et qui est impliqué dans la synthèse de la paroi, les protéines cytoplasmiques n'induiraient la synthèse des anticorps qu'après dégradation des levures par les macrophages au cours du processus pathologique. Parmi ces protéines cytoplasmiques, deux antigènes majeurs ont été étudiés, il s'agit d'une enolase ayant un intérêt diagnostique (Walsh et coll., 1991) et d'une protéine cytoplasmique HPS dont les anticorps anti HPS auraient un effet protecteur au cours de l'infection (Matthews et coll., 1993).

4.3. La paroi

La paroi cellulaire de *Candida* était considérée au début comme une structure inerte qui confère au protoplaste sa rigidité. Actuellement, elle est considérée comme un élément essentiel pour tous les aspects biologiques de la pathogénicité de *C. albicans*. (De Bernadis et coll., 1997).

L'extension de la paroi varie avec l'hydrophobicité du milieu (Kusamichi et coll., 1990). C'est à son niveau que se situent les adhésines de *C. albicans* qui constituent un facteur de pathogénicité puisqu'elles conditionnent l'adhérence aux cellules épithéliales (Hostetter, 1994). La paroi elle-même comprend un réseau très dense de fibrilles de chitine ou de polymères de glucose: les glucanes (Figure 1) non visibles en microscopie optique et s'apparentant à une capsule en microscopie électronique. Dans les mailles du réseau fibrillaire se situent des mannoprotéines possédant une cupule polysaccharidique qui constitue le mannane, ce dernier est un antigène quantitativement et qualitativement majeur des *Candida* (Poulain et coll., 1990). Chez l'Homme, le mannane suscite l'élaboration des anticorps à des degrés divers chez les sujets sains et chez les patients colonisés ou infectés (Jones, 1990). Il

circule dans le sérum des patients atteints de la forme profonde de candidose (Herent et coll., 1992). Cette paroi constitue également le lieu où circulent les enzymes dégradant les substances nécessaires à la croissance de *C. albicans*. Parmi ces enzymes, les aspartylprotéinases sont les mieux caractérisées. Leur sécrétion a été corrélée à la pathogénicité de *C. albicans* (DeBernadis et coll., 1999 ; Wu et coll., 1996).

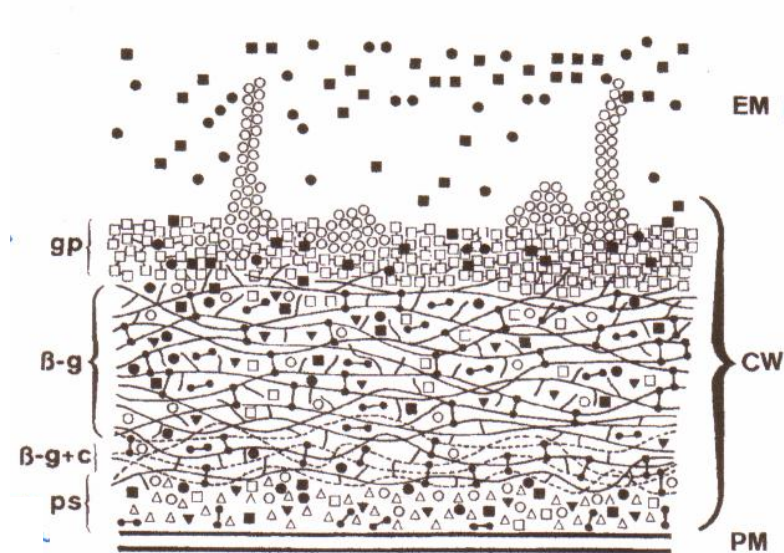


Figure 1: Schéma de la structure de la paroi cellulaire de *C. albicans* selon Chaffin et coll. (1998). EM: Milieu extracellulaire; CW: Paroi cellulaire; PM: Membrane plasmique; gp: Glycoprotéines; β-g: β-glucanes; βc + c: β-glucanes + chitine; ps: espace périplasmique

III. Notion d'infection

Le terme infection désigne la relation entre un parasite et un organisme hôte, et l'entrée en compétition des deux pour la dominance du premier par rapport au second. Lorsque l'organisme hôte présente un degré de résistance important, celui-ci reste sain et soit le germe est exclu de l'organisme hôte, soit il entretient une relation bénigne avec l'organisme. Au contraire, lorsque l'hôte est dominé par le parasite, la maladie se déclare. Cette relation hôte-parasite n'implique pas forcément la maladie car un organisme peut être colonisé sans qu'il soit pour autant malade (Alcamo, 1997). Le degré d'altération de l'immunité de l'hôte est déterminant pour la manifestation et le développement de l'infection.

La pathogénicité est la capacité du parasite à envahir les tissus et à entraîner des changements physiologiques et anatomiques conduisant au développement de la maladie. Pour *C. albicans*, les facteurs de virulence qui déclenchent cette infection ont fait l'objet de plusieurs études. Ce sont:

- la production d'enzymes hydrolytiques comme les aspartyl-protéinases (DeBernadis et coll., 1990) et les phospholipases (Lane et Garcia, 1991);
- le caractère dimorphique (passage des blastoconidies à la forme filamenteuse);
- la capacité d'adhésion aux substrats inertes ou biologiques grâce à la présence des adhésines. (Hostetter, 1994);
- la variabilité antigénique.

1. Les candidoses

Bien qu'il soit souvent présent comme un organisme commensal exclusif des muqueuses respiratoires, digestives et vaginales, *C. albicans* est capable de passer de l'état commensal à l'état parasitaire. Ceci a pour résultat le développement d'une infection nommée candidose (Odds 1988). Cette candidose apparaît comme le résultat d'une rupture de l'équilibre entre la virulence fongique et les systèmes de défenses de l'organisme (notamment la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles et la réponse immunitaire cellulaire à lymphocytes T) compromis par différentes situations telles que la malnutrition, le cancer, le diabète, une maladie infectieuse bactérienne ou virale, une microflore altérée par la prise de médicaments, notamment les antibiotiques qui s'attaquent aux bactéries commensales aérobies et anaérobies.

Avec l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) durant ces deux dernières décennies, les candidoses tiennent une place importante parmi les maladies infectieuses dites opportunistes. En général, la candidose orale est l'une des premières manifestations infectieuses chez les sujets séropositifs, suivi par d'autres infections cutanéomuqueuses récidivantes (Samaranayake et Scully, 1989; Imam et coll., 1990; Scully et coll., 1994).

Il existe 2 formes cliniques de candidoses: les candidoses superficielles muco-cutanées et les candidoses systémiques.

1. 1. Les candidoses superficielles muco-cutanées

Elles peuvent être cutanées, oropharyngées, oesogastrointestinales ou vaginales

1. 1. a. Candidoses cutanées

L'altération du revêtement cutané favorise le développement des candidoses. Elles peuvent résulter de contacts répétés avec l'eau, de traumatismes mécaniques ou chimiques. Les traumatismes de la cuticule provoquent la survenue des candidoses unguéales appelés communément onychomycoses causées dans 90% des cas par *C. albicans* (Hay et coll., 1988).

Les candidoses cutanées sont également responsables d'intertrigo des grands plis (abdominaux, sous mammaires, axillaires et interfessiers) et des petits plis (interdigitaux).

1. 1. b. Candidose oropharyngée

Communément connue sous le nom de muguet, cette infection apparaît sous forme de taches blanches sur une muqueuse érythémateuse de la paroi buccale avec des petites plages d'aspect «lait caillé». Les modalités d'infestation dépendent de la tranche d'âge:

- le nouveau-né lors de son passage dans les voies génitales de la mère atteinte de candidose vaginale (Rangel -Frausto et coll., 1999).
- l'enfant en bas âge peut également contracter le muguet par contact de *C. albicans* avec les ustensiles de nurseries et les jouets;
- les personnes âgées dont le système immunitaire est compromis.

1. 1. c. Les candidoses œso-gastro- intestinales

Elles sont souvent liées à la prise prolongée d'antibiotiques qui détruisent la flore bactérienne intestinale et permettent à *C.albicans* de proliférer. Ces candidoses ont un aspect de pseudomembranes blanches adhérentes à la muqueuse inflammatoire, parfois ulcérée. Semblables au muguet buccal, elles s'observent sur différents segments du tube digestif

(oesophage, estomac, intestin). La levure est souvent décelable dans les fèces (Flattery et coll., 1996). Cette atteinte est associée en général à un déficit immunitaire sévère (SIDA, agents immunosuppresseurs) (Poulain et Feuilhade de Chauvin, 1995; Alcamo, 1997).

1. 1. d. Candidoses vaginales

Les candidoses vaginales affectent un grand nombre de femmes bien portantes en âge de procréation (Sobel et coll., 1998). Elles occupent une place particulière parmi les infections fongiques puisque 75% des femmes connaissent au moins un épisode de vaginite dans leur vie, 5 à 10 % de ces infections étant récidivantes (Fidel et Sobel, 1996). Les symptômes évocateurs de la vaginite sont le prurit, la présence de leucorrhées blanches avec une muqueuse vaginale érythémateuse à aspect pseudomembraneux blanchâtre (Odds, 1988). Son diagnostic se fait par l'observation des sécrétions vaginales et de frottis vaginaux et par la culture des microorganismes sur milieu Sabouraud. D'une manière générale, les candidoses superficielles sont fréquentes chez les patients à système immunitaire défaillant. Curieusement, ce n'est pas toujours le cas pour la vaginite. Cette dernière est souvent associée à une antibiothérapie prolongée (Mac Donald et coll., 1993 ; Spinillo et coll., 1999) qui favorise la perte de lactobacilles qui constituent la flore commensale vaginale, ce qui change le pH de l'environnement vaginal et favorise la prolifération de *C. albicans*. (Pittet et coll., 1994; De Tourris et coll., 1998), à la corticothérapie (Bodey, 1993), au diabète insulino-dépendant, à la gestation ou à l'usage des contraceptifs oraux (Kent, 1991). Dans d'autres cas, les facteurs qui prédisposent à cette infection ne sont pas connus (Sheehan et Hitchcock, 1999).

1.2. Les candidoses systémiques

Les candidoses systémiques sont rares dans la population générale, mais elles représentent une complication redoutée en milieu hospitalier. Les candidoses systémiques occupent actuellement la 4^{ème} place dans les infections nosocomiales entraînant la morbidité et la mortalité chez 8 % de patients immunodéprimés (Beck-Sague et Jarvis, 1993; Pfaller et coll.,

1998; Kao et coll., 1999). Le terme de candidose systémique est synonyme de l'atteinte de plusieurs sites non adjacents parfois secondaire à une dissémination hématogène à partir des accès vasculaires ou de solutions de perfusion ou par manuportage (Burnie et coll., 1985; Vaudry et coll., 1988; Pittet et coll., 1994; Reagan et coll., 1995).

Toutefois, les modifications de la flore du tractus gastro-intestinal induites par l'administration d'antibiotiques favorisent la croissance rapide des *Candida* qui colonisent la surface des muqueuses (Pappu-katikaneni et coll., 1990). *Candida* s'infiltré alors jusqu'au niveau sous-muqueux lorsque l'intégrité des barrières est rompue (Kennedy et Volz, 1985).

IV. Les agents antifongiques

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières (la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote) et d'autre part aux molécules antifongiques elles-mêmes qui sont soit fongistatiques, toxiques, ou qui peuvent engendrer des résistances. (Odds 1993; Prasad et Kapoor, 2004).

Il existe plusieurs classes d'agents antifongiques: les polyènes, les dérivés azolés, les analogues nucléosidiques, les allylamine, les pneumocandines, et les sordarines.

1. Aperçu historique

Le premier dérivé azolé et le premier polyène, la nystatine ont été découverts respectivement en 1944 et 1949 (Hazen et Brown, 1950; Fromtling, 1988), ce n'est qu'en 1958 que le premier dérivé azolé (par voie locale) est devenu disponible pour usage thérapeutique. Après la nystatine, l'amphotéricine B a été découverte en 1960 (Gupta et coll., 1994) et reste jusqu'à nos jours un traitement de choix contre les candidoses systémiques sévères chez le patient neutropénique en l'absence de d'insuffisance rénale et de traitements néphrotoxiques associés (Yoshida, 2004). En 1962, l'activité antifongique de la 5-fluorocytosine a été rapportée. Deux

autres dérivés azolés, le miconazole et le clotrimazole ont été introduits en thérapeutique vers 1969 suivis par l'éconazole en 1974 (Gupta et coll., 1994).

Entre les années 1980 et 1990, l'augmentation remarquable de la population immunodéprimée dans le monde, à la suite de l'apparition du SIDA, ainsi que l'utilisation des agents immunodépresseurs en rapport avec les greffes d'organes et la chimiothérapie ont conduit à une forte probabilité de contracter de sérieuses infections par *Candida* (Georgopapadakou et Walsh, 1996). Vers les années 80, la découverte d'un nouveau dérivé azolé pour le traitement des infections systémiques, le kétoconazole par voie orale a été suivi par la découverte de la première allylamine, la naftifine puis le développement de la forme liposomale et de la forme complexe lipidique de l'amphotéricine B connues pour être moins toxiques que l'amphotéricine B seule. Vers les années 90, les triazolés représentés par le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole ont été découverts pour le traitement des mycoses systémiques, les pneumocandine et les échinocandine (caspofongine) ont aussi connu un essor considérable pendant cette décennie (Bartoli et coll., 1995). Ensuite, une 2^{ème} allylamine, la terbinafine a été découverte pour le traitement des dermatophytoses (Ghannoum, 1997; Santangelo et coll., 2000). Actuellement, les recherches sur la dernière classe d'agents antifongiques, les sordarines, sont en cours.

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée sur la figure 2 et leurs formules chimiques sont représentées sur la figure 3

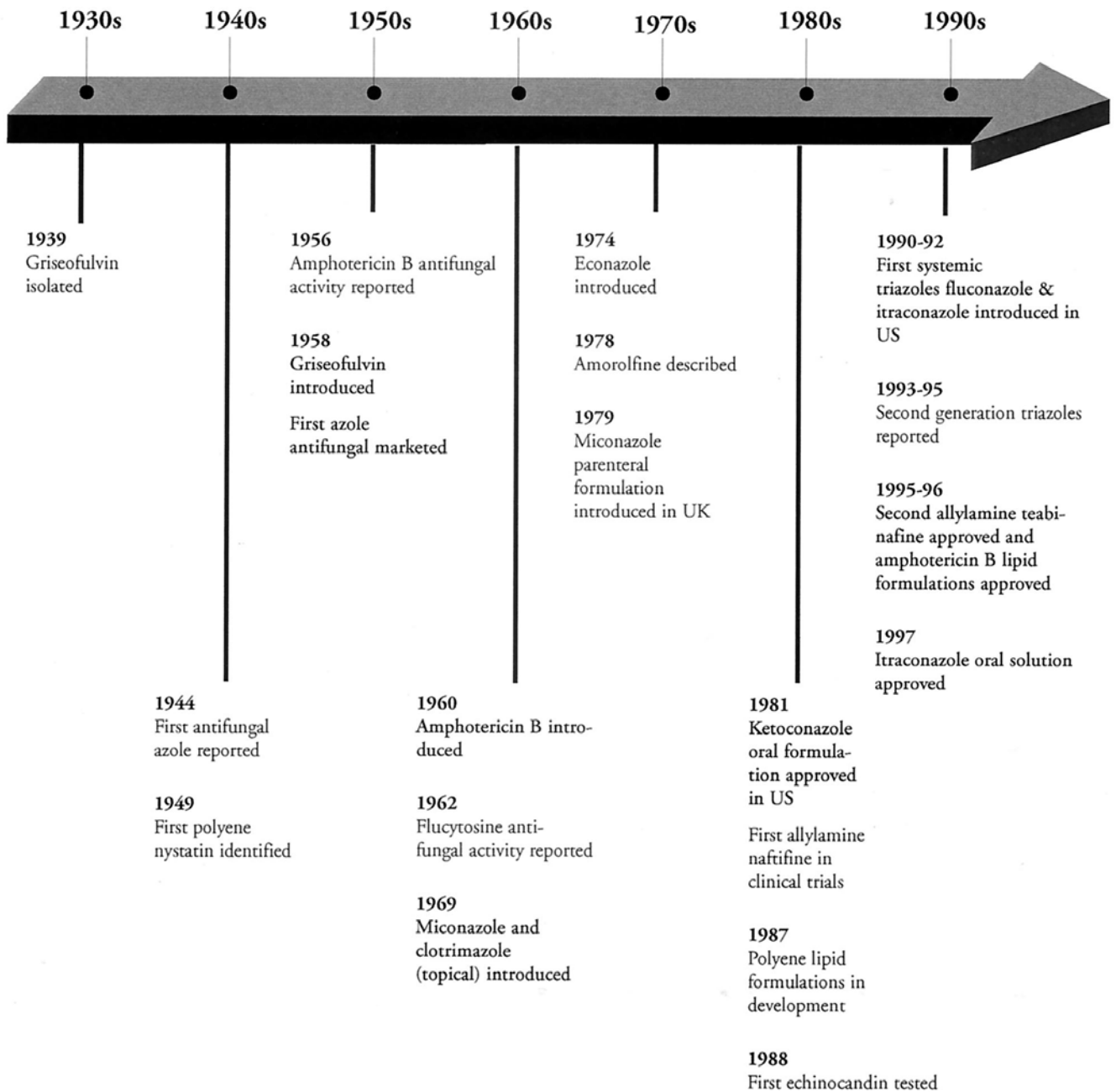
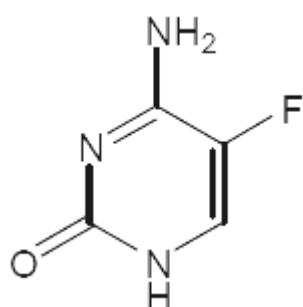
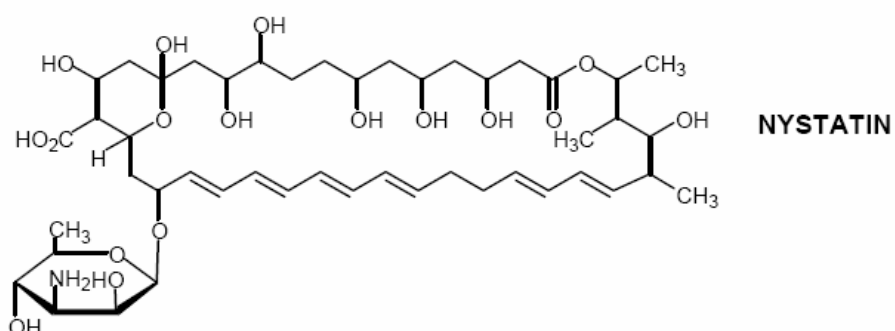
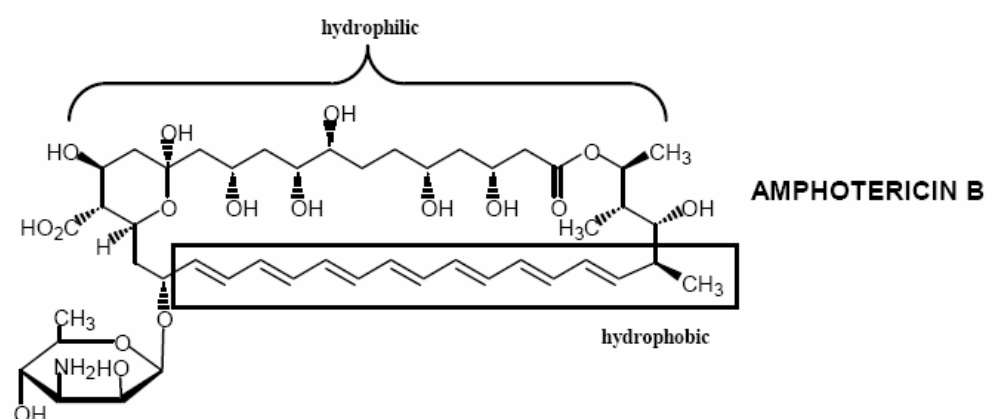
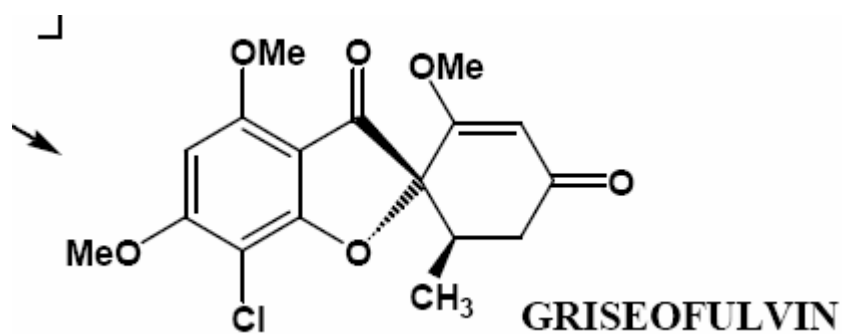
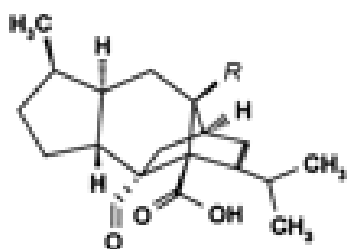


Figure 2: Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques (d'après Sheehan et coll., 1999).

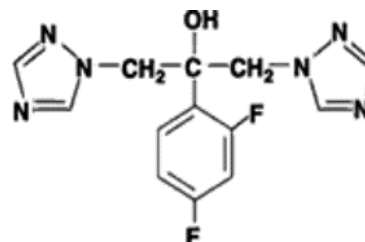


5- Fluorocytosine

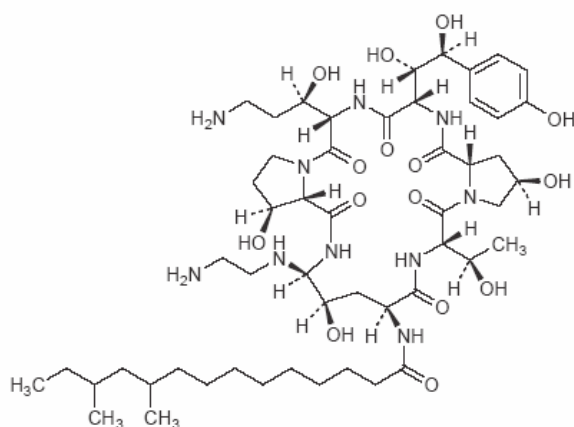
Figure 3a: formules chimiques des différents agents antifongiques



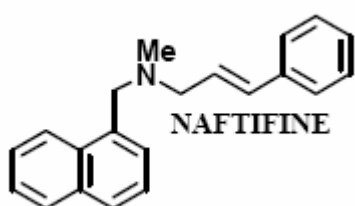
Sordarines



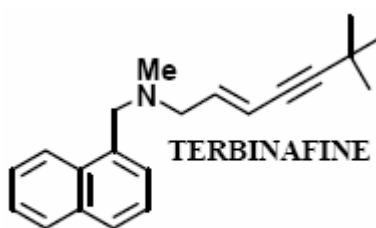
Fluconazole



Caspofongine



NAFTIFINE



TERBINAFINE

Allylamines

Figure 3b: Formules chimiques des différents agents antifongiques connus

2. Les agents antifongiques et leurs mécanismes d'action

2. 1. Les polyènes

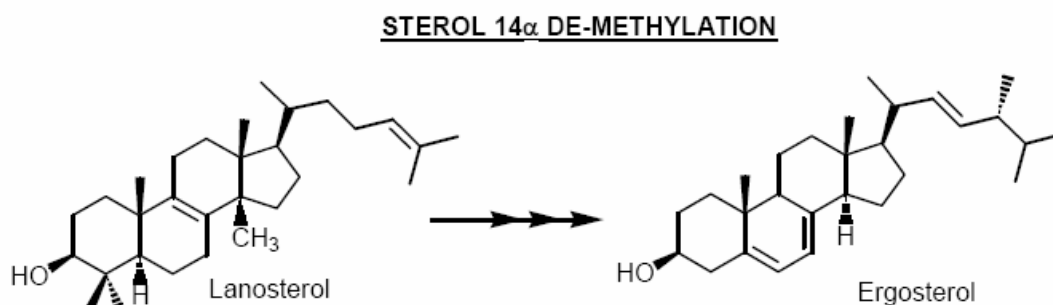
Isolés à partir des champignons du genre *Streptomyces*, les polyènes représentés par l'amphotéricine B et la nystatine, sont des antifongiques à action fongicide. Ils se lient irréversiblement aux ergostérols membranaires des champignons levuriformes, dimorphiques et filamenteux. Ceci entraîne des troubles osmotiques de perméabilité et inhibe l'ATPase Na⁺/K⁺ de la cellule fongique, ce qui conduit à la mort cellulaire par déplétion des réserves énergétiques de la cellule y compris le glucose (Hammond, 1977; Bolard, 1986).

L'amphotéricine B se lie de façon significative mais réduite aux molécules de cholestérol présentes dans les membranes cellulaires des mammifères, conduisant ainsi à une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions, ce qui explique son effet secondaire toxique (Brajtburg et coll., 1990; Sawaya et coll., 1995; Kauffman et Carver, 1997). Un autre facteur qui limite son utilisation, est lié à sa lipophilie, et donc sa faible disponibilité dans les liquides biologiques, y compris le liquide cébrospinal. De nouvelles formes galéniques (complexe lipidique et forme liposomale) se sont avérées moins toxiques mais aucune étude prospective contrôlée n'a pour l'instant démontré un avantage en terme d'efficacité de ces nouvelles formes galéniques d'autant plus que leur prix est 10 à 100 fois plus élevé que celui des formulations standards (Walsh et coll., 1999). Cependant, les polyènes ne sont pas absorbés par le tractus gastro-intestinal lorsqu'ils sont utilisés per os, ce qui minimise les inconvénients liés à leur néphrotoxicité.

2. 2. Les dérivés azolés

Ce sont des substances synthétiques. Leur mécanisme d'action est d'empêcher la synthèse de l'ergostérol, composant majeur de la membrane plasmique des champignons en inhibant l'enzyme 14 α déméthylase, enzyme cytochrome P₄₅₀ dépendante qui permet la déméthylation des lanostérols (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Koltin et Hitchcock, 1997) conduisant à

une accumulation toxique des lanostérols (stérols 14 α méthylés), ce qui entrave les fonctions principales de l'ergostérol tels que le transport des nutriments et la synthèse de la chitine d'où son action fongistatique. Les triazolés, génération des dérivés azolés dont le fluconazole, lorsqu'ils sont utilisés à des doses thérapeutiques possèdent une plus grande affinité pour l'enzyme de la cellule fongique que pour la cellule des mammifères. Ceci explique leur faible toxicité (Koltin et Hitchcock, 1997). Le caractère hydrosoluble du fluconazole et du voriconazole (et non de l'itraconazole) leur confère une plus grande disponibilité dans les liquides biologiques, particulièrement le liquide cébrospinal (Goa et Barradell, 1995).

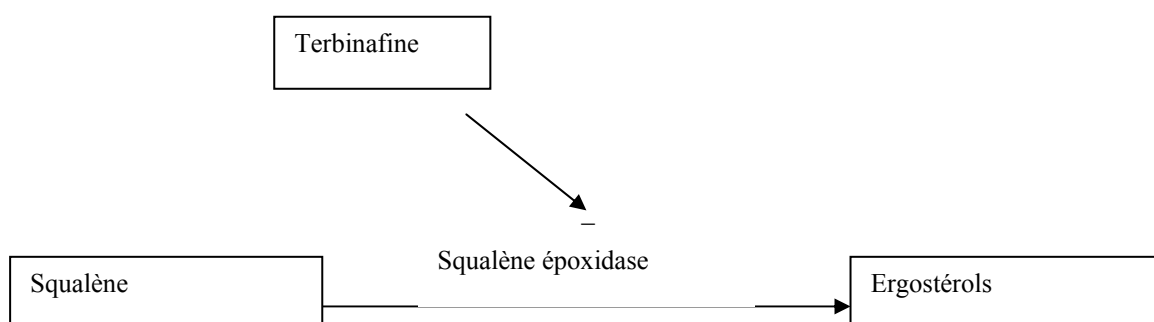


2.3. Les analogues nucléosidiques

Molécule synthétique, la 5-fluorocytosine est une pyrimidine fluorée. Fongistatique, son spectre d'action englobe les champignons levuriformes et certains champignons filamenteux y compris les *Aspergillus*. Sous l'effet d'une cytosine désaminase fongique spécifique, la 5-fluorocytosine est transformée en 5-fluorouracile qui est incorporée à l'ARN bloquant ainsi la synthèse des protéines (Utz, 1972). Cependant, un dysfonctionnement hépatique et une toxicité de la moelle osseuse ont été rapportés pour cet antifongique avec une forte probabilité de provoquer une mutation spontanée conduisant au phénomène de la résistance (Bennett, 1990). Son emploi est préconisé en association avec l'amphotéricine B ou avec le fluconazole.

2. 4. Les allylamines

Cette classe d'antifongiques synthétiques est représentée par la terbinafine qui agit spécifiquement sur les *Candida*, les *Aspergillus* et les dermatophytes en inhibant la synthèse des ergostérols, composants essentiels de la membrane de la cellule fongique, via l'enzyme squalène époxidase. Le déficit de synthèse de ces ergostérols et l'accumulation du squalène toxique entraînent un effet fongistatique et fongicide (Ryder et Fabre, 1997).



2. 5. Les échinocandines

Les échinocandines sont représentées par la caspofungine administrée uniquement par voie parentérale avec un spectre d'action limité aux espèces de *Candida* et *Aspergillus*. Cette classe d'agents antifongiques s'est avérée aussi efficace que le desoxycholate d'amphotéricine B et le fluconazole dans le traitement des candidoses oropharyngée et œsophagienne (Arathoon et coll., 2002; Villanueva et coll., 2002). Elle agit en inhibant la synthèse du glucane: le $\beta(1,3)$ -D-glucane conduisant ainsi à une perméabilisation de la paroi fongique et, par conséquent, à une lyse de la cellule fongique (Figure 4).

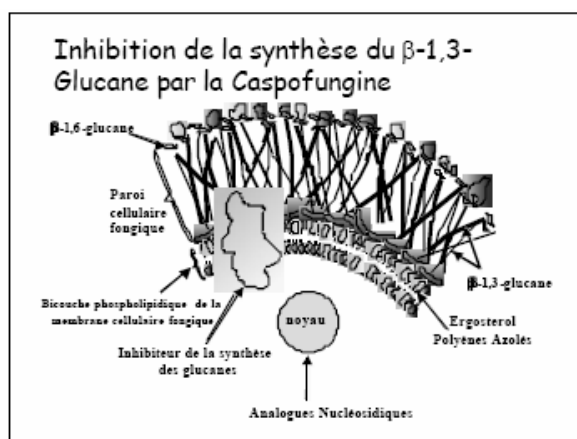


Figure 4: Schéma montrant le mécanisme d'action de la caspofungine et d'autres agents antifongiques d'après laboratoire

Merck-Sharp et Dohme

2.6. Les sordarines

C'est une nouvelle classe d'agents antifongiques à large spectre qui a été découverte récemment. Les sordarines ont une activité fongicide qui a été mise en évidence *in vitro* par Herreros et coll. (1998) et *in vivo* sur des modèles animaux par Aviles et coll. (2001) et Martinez et coll. (2001). Leur mécanisme d'action passe par l'inhibition du cycle d'élongation de la synthèse protéique. Mais cette famille de composés a montré elle aussi, une certaine toxicité (Herreros et coll., 2000).

2.7. Traitement de la candidose vaginale

Puisque nous nous intéressons à la candidose vaginale dans ce travail, nous avons jugé nécessaire de donner un aperçu historique du traitement de ce type d'infection.

La nystatine a été le premier polyène utilisé comme agent antifongique et continue d'être, un traitement local efficace contre la candidose vaginale (Sojacova et coll., 2003). Après la nystatine, d'autres polyènes sont apparus comme l'amphotéricine B, mais l'utilisation de cette dernière est restée limitée à cause de la toxicité rénale et osseuse qu'elle engendre, et de son passage à travers la barrière hématoencéphalique (Kauffman et Carver, 1996). La découverte des dérivés azolés a été un progrès important dans le traitement des candidoses vaginales; l'introduction des imidazoles tels que le miconazole, le clotrimazole et l'éconazole a montré une grande efficacité de ces composés par traitement locale (Odds, 1977). Plus tard, le kétoconazole, le premier azole utilisé par voie orale, s'est avéré encore plus efficace contre cette infection (Bisschop et coll., 1979). Cependant, l'utilisation prolongée de ce dérivé azolé a montré des effets secondaires comme l'hépatotoxicité avec une toxicité endocrine (Kauffman, 1996). Quelques années après l'apparition de ces azoles, le problème de la résistance de *Candida* à ces molécules s'est révélé important (Odds, 1993).

Entre 1980 et 1990, avec l'augmentation de la population de patients immunodéprimés dans le monde, sont apparus les dérivés triazolés représentés par l'itraconazole et le fluconazole, dont l'efficacité s'est avérée plus grande que celle du kétoconazole (Sobel et Muller, 1984). Cependant, l'apparition d'une résistance clinique associée à une diminution de la sensibilité au fluconazole, en particulier chez les patients qui sont à un stade avancé du SIDA, s'est imposée comme une réalité épidémiologique indiscutable (Dupont et coll., 1996). Ainsi, il s'avère que la recherche de substances ayant un effet antifongique, agissant par un autre mécanisme et permettant de traiter la candidose vaginale sans provoquer de toxicité et surtout sans résistance devient une nécessité. C'est dans ce cadre là que plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'activité antifongique des HE.

V. Mécanismes de résistance aux différents agents antimicrobiens

Un germe est dit résistant à un agent antimicrobien quand la CMI de celui-ci est supérieure à la concentration sanguine maximale médicamenteuse à une posologie standard. Cette résistance peut être naturelle ou acquise.

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à l'antibiotique parce que la cible d'action de celui-ci est absente ou inaccessible.

La résistance est dite acquise quand une certaine proportion (parfois très élevée) des souches d'une espèce normalement sensible à l'antibiotique devient résistante à son action.

Pour ce dernier type de résistance, 3 stratagèmes principaux sont connus chez les bactéries, les virus et les champignons : le brouillage, le blindage et le camouflage.

On parle de brouillage quand le germe synthétise des protéines qui peuvent dégrader l'antibiotique et le rendre inefficace par complexation.

Il s'agit de camouflage lorsque le germe peut modifier la cible de l'antibiotique si bien que celle-ci n'est pas reconnue, ce qui rend la cellule insensible à cet antibiotique.

Enfin, quand le germe empêche l'accès de l'antibiotique aux cibles intracellulaires soit par modification de la perméabilité membranaire, soit par mise en place d'un système d'expulsion de l'antibiotique via une pompe membranaire qui refoule ce dernier, on parle de blindage.

Le traitement des infections par *C.albicans* reste délicat à cause du phénomène de résistance qui apparaît à la suite d'utilisation prolongée d'agents antifongiques.

Pour ces agents antifongiques, 4 mécanismes de résistance sont connus:

- la cellule fongique peut soit modifier sa perméabilité pour l'agent antifongique, soit agir par la mise en place d'une pompe d'efflux ce qui a pour conséquence un rejet de la molécule antifongique. Ces deux phénomènes connus avec les azoles systémiques nous rappèlent le stratagème de blindage cité ci-dessus (Hitchcock 1993 ; Vanden Bosshe 1992; Rex et coll., 1995).
- une modification de la cible comme l'altération de l'enzyme 14 α -déméthylase pour les azoles rappelle le stratagème de camouflage;
- une perte de la cytosine-désaminase intervenant dans le mécanisme d'action de la 5-fluorocytosine;
- une surproduction de la cible, phénomène connu avec les azoles (14 α -déméthylase) et la 5-fluorocytosine (néosynthèse excessive de pyrimidine). Ces 2 derniers mécanismes de résistance nous rappellent le stratagème de brouillage (Figure 5).

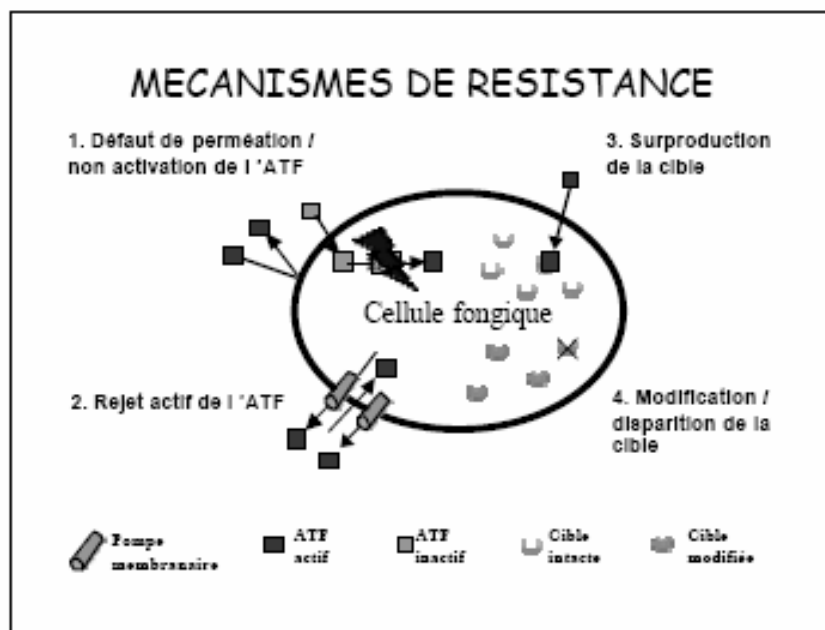


Figure 5: Principaux stratagèmes des mécanismes de résistance contre les différents agents antifongiques d'après Grillot, 1999

VI. Les modèles animaux

Le comité national des Etats-Unis pour la recherche scientifique a défini le modèle animal de laboratoire comme étant un modèle pour qui les normes de la biologie et du comportement sont étudiées. Selon ce modèle, les phénomènes pathologiques spontanés ou induits présentent un ou plusieurs aspects de la maladie qui ressemblent à ceux observés chez l'homme ou chez d'autres espèces animales.

Les modèles animaux sont classés en 5 catégories (Guhad et Hau, 1999):

1. le modèle animal spontané: c'est un modèle de maladies rencontrées chez l'homme ou l'animal utilisant des espèces mutées génétiquement telles que les souris nude.
2. Le modèle négatif: dans ce modèle, la maladie est non induite par un agent ou une souche quelconque, mais apparaît de façon spontanée.
3. le modèle orphelin: c'est un modèle où la maladie s'observe naturellement chez certaines espèces animales mais non encore chez l'Homme comme la maladie de Marek du poulet (Hau et coll., 1989).

4. le modèle transgénique: c'est un modèle où l'on procède à une manipulation du génome embryonnaire, ce qui a pour résultat une anomalie s'exprimant dans les cellules germinales de l'animal; ainsi, plusieurs modèles sont devenus disponibles au sein de la communauté scientifique.

5. le modèle animal induit: ce modèle utilise des animaux sains chez lesquels on provoque expérimentalement l'infection à étudier (Hau et coll., 1989); c'est ce dernier modèle qui a été utilisé dans le présent travail.

L'extrapolation des résultats expérimentaux obtenus chez l'animal à l'homme est généralement basée sur la validité du modèle utilisé en accord avec l'hypothèse émise.

Afin de tester l'efficacité des agents antifongiques pour le traitement des infections mycosiques, plusieurs modèles animaux ont été adoptés, parmi lesquels, la muqueuse orale du rat et de la souris largement utilisées pour la candidose orale (Jones et coll., 1976; Deslauriers et coll., 1995). L'infection systémique par *C. glabrata* (Atkinson et coll., 1995) et par *C. albicans* (Graybill et coll.; 1998) a également été utilisée chez les souris immunodéprimées. D'autres modèles ont été développés pour traiter les infections, fongiques contre les dermatophytoses (Gaspari et coll., 1998)

Le modèle de la candidose vaginale qui fera l'objet de la troisième et la quatrième partie de ce travail a été utilisé pour la première fois chez le rat par Mac Ripley et coll. (1979) et depuis, il a servi à tester l'activité antifongique des composés azolés (Sobel et Muller, 1983; Sobel et Muller, 1984a et b; Richardson et coll., 1985), des polyènes (Scudamore, 1992) et des sordarines (Martinez et coll., 2001).

VII. Les mécanismes de défense contre les infections par *Candida*

La défense de l'organisme hôte contre la candidose se fait de deux façons:

- le mécanisme d'immunité non spécifique représentée par la peau, l'intégrité des muqueuses et leurs sécrétions, les bactéries commensales, les leucocytes polynucléaires et les macrophages;
- le mécanisme d'immunité spécifique impliquant l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire (Challacombe, 1990).

1. Immunologie vaginale: concepts actuels

Concernant les mécanismes immunologiques au niveau de la muqueuse vaginale, on connaît peu de choses chez la femme par rapport aux notions rapportées sur les modèles animaux. Au niveau vaginal, trois lignes de défense ont été décrites dans la littérature (Fidel et Sobel, 1996): l'immunité à médiation cellulaire, humorale et hormonale.

- L'immunité à médiation cellulaire: bien que des anticorps aient été trouvés au niveau du liquide de lavage vaginal, il n'existe pas de tissu lymphoïde proprement dit au niveau du vagin comme c'est le cas pour le tractus gastro-intestinal. Cependant, des techniques avancées ont identifié un grand nombre de cellules épithéliales, de macrophages, de cellules T et de cellules de Langerhans dendritic-like au niveau de la muqueuse vaginale de la souris (Parr et Parr, 1991). Les cellules de Langerhans possèdent des complexes majeurs d'histocompatibilité de la classe II⁺ situées au niveau de la sous muqueuse vaginale capables de présenter des antigènes (Parr et coll., 1991)

Les lymphocytes T intra-épithéliaux de la sous muqueuse vaginale sont capables de migrer à la surface des cellules épithéliales ou dans la lumière de l'utérus en réponse à des facteurs chimiotactiques (Anonyme, 1995). Ainsi, la présence des cellules T et des cellules présentatrices d'antigènes fait que la muqueuse vaginale peut se comporter comme un tissu immunocompétent capable de donner une réponse à médiation cellulaire d'autant plus que l'épithélium vaginale est perméable aux protéines de différents poids moléculaires qui peuvent atteindre les cellules de Langerhans dendritic-like qui, à leur tour, stimulent les

lymphocytes T (Parr et Parr, 1990). Cette hypothèse a été soutenue par des études sur des modèles animaux d'infection vaginale par *Chlamydia trachomatis* où les lymphocytes T se multiplient et produisent des cytokines en réponse aux antigènes chlamydiaux (Cain et Rank, 1995).

- L'immunité humorale vaginale: son rôle protecteur reste toujours incertain chez le rat, les connaissances dans ce domaine se limitent à l'isolement des immunoglobulines IgA et IgG qui sont les plus dominants dans le tractus génital femelle (Parr and Parr, 1994). Au contraire, chez la souris, des anticorps anti-mannane IgM et Ig3 ont montré un effet protecteur contre la candidose vaginale expérimentale (Han et coll., 2000)

- L'immunité hormonale: les œstrogènes jouent également un rôle dans l'immunité vaginale. Sur des modèles animaux, la réponse immunitaire de l'utérus augmente en présence d'œstrogènes alors qu'elle diminue au niveau vaginal (Wira et coll., 1994). De même, la sécrétion des anticorps IgG et IgA dans le fluide vaginal est réduite en présence des œstrogènes (Wira et coll., 1994). Récemment, les travaux de Fidel et coll. (2000), et ceux de Nomanhboy et coll. (2002) ont décrit *in vitro* chez la souris et sur des cellules en culture, une inhibition exercée par les cellules de l'épithélium vaginal sur la croissance de *C. albicans* sous l'influence des œstrogènes.

VIII. Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des produits odorants obtenus à partir de plantes par entraînement à la vapeur d'eau, par hydro distillation des végétaux entiers ou en partie, ou par expression du péricarpe frais de certains agrumes.

Cette définition est restrictive car elle exclut, d'une part, les produits odorants d'origine animale, et, d'autre part, les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction (d'après les organismes de normalisation: A.F.N.O.R* et I.S.O**).

2. Répartition botanique

Les HE sont largement réparties dans le règne végétal; certaines familles en sont particulièrement riches: Conifères, Rutacées, Myrtacées, Ombellifères, Composées, Labiées (Sauvage, 1974; Boulos, 1983). On peut les extraire à partir de tous les organes végétaux: sommités fleuries, écorces, racines, rhizomes, fruits, bois, etc. Au sein d'une même plante, elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes. Leur composition peut varier d'une partie de la plante à l'autre (Paris et Urabielle, 1981)

3. Composition chimique

La composition chimique d'une HE est assez complexe, on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques: les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane.

Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les tri terpènes (C30). Ces composés ont tous la même origine métabolique.

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ont une biogenèse différente de celle des terpènes. On peut citer l'acide et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), le carvacrol (HE d'origan), l'anéthol et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis et de fenouil) qui sont les principaux membres de cette famille.

Les acides organiques, les cétones de faible poids moléculaire et les coumarines volatiles entrent également en faible proportion dans la constitution des HE

Cependant, cette complexité de la composition chimique des HE suscite plusieurs remarques:

- parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement, on l'appelle composé majoritaire.
- à l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes, ce qui conduit à admettre l'existence de

chémotypes chimiques (exemple: Thym à thymol, à géraniol, à carvacrol, à linalool, etc.).

La composition chimique des HE varie avec le milieu et l'époque de la végétation. Elle peut aussi se modifier au cours de l'extraction et durant la conservation.

4. Domaines d'utilisation des HE

4. 1. Industrie alimentaire

Les HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires, elles y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (Lachowicz et coll., 1998; Cosentino et coll., 1999; Nielson et Rios, 2000; Skandamis et Nychas, 2001).

Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, de cannelle, d'origan et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires (Montes-Belmont et Carvajal, 1998; Nielsen et Rios, 2000)

4. 2. Parfumerie et cosmétologie

Un grand nombre d'HE (400 à 500) est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces essences servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant une odeur agréable (Roulier, 1992). De même, certains constituants chimiques isolés à partir d'HE peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs; ainsi, à partir de l'eugénol tiré de l'essence de girofle, on aboutira à l'isogénol qui a une odeur d'œillet (Vigne, 1987).

4. 3. Désinfection des locaux

Des essences naturelles (de citron et de lilas) à activité bactéricide, acaricide et fongistatique entrent dans la composition d'un produit, le «paragerm», solution volatile qui s'est révélé sans toxicité pour l'homme aux doses utilisées (Mallea et coll.,1979).

Les HE étant volatiles, on peut envisager leur utilisation en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air (De Billerbeck et coll., 2002). Les composés majoritaires de certaines HE (thymol et carvacrol) sont utilisés dans certains pays comme additifs aux déchets animaux afin d'empêcher leur dégradation, qui pourrait générer de mauvaises odeurs, réduire les agents pathogènes et conserver les nutriments des déchets jusqu'à leur recyclage comme agents fertilisants (Varel, 2002).

4.4. Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Beaucoup d'ouvrages décrivent des préparations à base d'HE diverses prescrites pour le traitement de plusieurs maladies. Cependant, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratiques empiriques (Valnet, 1990). Actuellement, plusieurs publications scientifiques fondées utilisent les HE ou leur composés majoritaires pour tester leurs effets *in vitro* (Lima et coll., 1993; Viollon et coll., 1993; Viollon et Chaumont, 1994). Ces effets sont également testés *in vivo* sur des modèles animaux afin de traiter certaines infections expérimentales d'origine bactérienne provoquées par *Helicobacter pylori* chez la souris par exemple (Bergonzelli et coll., 2003; Ohno et coll., 2003), ou de champignons opportunistes (Surech et coll., 1997; Manohar et coll., 2001)

4. 5. Médecine dentaire

En médecine dentaire, l'exemple le plus couramment utilisé est la listerine: solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol utilisée pour le lavage de la cavité orale et des dents et qui possède une activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato et coll., 1990). Plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très

satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire et dans le traitement et la prévention des caries (Pellecuer et coll., 1980; Sourai 1989; Schwartz et coll., 1992).

Plusieurs auteurs ont rapporté les propriétés antimicrobiennes d'un certain nombre d'HE et de leurs composés majoritaires sur les bactéries de la cavité orale (Shapiro et coll., 1994; Didry et coll., 1994). Hammer et coll. (2003). Une autre équipe de chercheurs a décrit les propriétés antifongiques de l'HE de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) sur les infections oropharyngées chez les patients ayant présenté une résistance aux antifongiques classiques (Vasquez et coll., 2000).

IX. Pouvoir antimicrobien des HE

L'effet antimicrobien des HE est connu depuis longtemps. En 1919, Gattefossé a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'HE de pin. Beylier-Maurel (1976) rappelle qu'en 1887, Chamberland rapporta l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle. Plus tard, d'autres auteurs ont montré que les HE étaient efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques et qu'elles ont un spectre d'action assez large puisqu'elles agissent aussi bien sur les bactéries, les levures, les moisissures que sur les virus (Valnet et coll., 1978; Janssen et coll., 1987, Knoblock et coll., 1989 ; Tantaoui-Elaraki et coll., 1993a et b; Remmal et coll., 1993a et b; Remmal 1994; Siddiqui et coll., 1996). Des travaux plus récents ont confirmé l'effet antimicrobien *in vitro* des HE sur les bactéries à Gram+ et à Gram- et les levures (Hili et coll., 1997; Cox et coll., 2001; Delaquis et coll., 2002; Rhayour et coll., 2003).

La composition de ces HE et, en particulier, la nature de leurs composés majoritaires sont responsables de cette activité antimicrobienne (Simeon De Buochberg et coll., 1976). En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires: phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters (Lee et coll., 1971; Franchome, 1981 Inouye et coll., 2001b). En effet,

d'après Hulin et coll (1998) et Ultee et coll (1999), le carvacrol semble être un puissant inhibiteur de croissance de bactéries telles que *Bacillus cereus* et *Salmonella*. De même, Bagamboula et coll. (2004) ont récemment montré un effet inhibiteur du carvacrol sur deux espèces de *Shigella*.

D'autre part, Viollon et Chaumont (1994) ont décrit l'effet fongitoxique du thymol et du carvacrol sur *Cryptococcus neoformans*, champignon opportuniste rencontré au cours du SIDA. Arras et Usai (2001), ont reporté l'effet fongitoxique du carvacrol, composé majoritaire de *Thymus capitatus* sur le champignon *Penicillium digitatum*. Cependant, l'effet des composés quantitativement minoritaires n'est pas forcément négligeable (Lattaoui, 1989; Tantaoui-Elaraki et coll., 1993a).

La recherche de l'activité antimicrobienne des HE a débuté au Maroc avec les travaux de Benjilali et coll. (1986) et Tantaoui-Elaraki et coll. (1992) Ces études se sont poursuivies avec les travaux de Remmal et coll. (1993a et b) et Rhayour et coll. (2003), étant donné que la flore Marocaine est particulièrement riche en plantes aromatiques. Cette richesse est le fruit de la variabilité importante du climat due à la situation géographique du Maroc (Bellakhdar, 1978).

1. Action antifongique des HE et de leurs composés majoritaires

C.albicans, le champignon commensal, opportuniste et pathogène chez les patients immunodéprimés dont la proportion ne cesse de croître ces deux dernières décennies, a suscité plus d'attention de la part des chercheurs. Cette attention a augmenté en raison de l'apparition de la maladie du SIDA, des transplantations d'organes, de la chimiothérapie dans le traitement des cancers et de l'antibiothérapie ainsi que la corticothérapie prolongée (Odds, 1988; Bodey, 1993).

En effet, l'effet anticandidosique de l'HE du thier (*Melaleuca alternifolia*) *in vitro* a été rapporté par plusieurs auteurs (Hammer, et coll., 1998; Cox et coll., 2001). Par ailleurs, Suresh a démontré l'activité anticandidosique de l'HE de *Santolina chamaecyparissus* (1997).

Perez et coll. (1999) ont rapporté l'action inhibitrice de l'HE de *Senecio graveolens* (composée) et de ses constituants sur des isolats cliniques de *C.albicans*.

Dans la même optique, Hammer et coll. (1999) ont fait montré l'effet anticandidosique *in vitro* de plusieurs HE dont celles de thym, d'origan et de girofle. Manohar et coll. (2001) ont montré que l'HE d'origan a des propriétés anticandidosiques *in vitro* allant de l'inhibition de la croissance des blastoconidies jusqu'à l'inhibition de la formation du tube germinatif. Salgueiro et coll. (2003) ont également décrit l'effet anticandidosique de l'HE d'une espèce d'origan.

Concernant l'effet anticandidosique des composés majoritaires d'HE, Boonchird et Flegel (1982) ont examiné l'activité *in vitro* de l'eugénol sur 31 souches de *C.albicans* et ont montré que ce composé phénolique inhibe et retarde la croissance des blastospores et des mycéliums ainsi que la formation du tube germinatif. D'autres auteurs (Ali-Shtayeh et coll., 1997) ont montré l'effet inhibiteur du thymol, isomère du carvacrol sur la croissance de *C.albicans*. Par ailleurs, l'équipe de Manohar et coll. (2001) a également rapporté l'effet inhibiteur du carvacrol *in vitro* sur la formation du tube germinatif de cette levure et l'effet antifongique de ce même composé *in vivo* pour traiter la candidose systémique chez la souris.

Concernant l'effet antifongique sur d'autres espèces, Lachowicz et coll. (1998) a montré que la croissance de *S. cerevisiae* le jus de tomate, est inhibée par 1% de l'HE d'anis, enfin, Selon Caccioni et coll 1998 la croissance de *Penicillium digitatum* est inhibée par les HE du genre *Cirtus*

Puisque nous avons consacré une première partie de ce travail à l'activité antifongique des HE sur une autre levure *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi qu'une étude du mécanisme d'action des deux HE d'origan et de girofle sur cette levure, nous avons jugé nécessaire de parler des caractères généraux de cette levure, ainsi que la monographie des plantes dont ces deux HE ont été extraites.

2. Généralités sur *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae est une cellule eucaryote unicellulaire qui fait partie de la classe des ascomycètes supérieurs. Observée au microscope optique, une goutte de *S.cerevisiae* montre une multitude de cellules individualisées, de forme ovoïde, non mobile, d'aspect translucide, de taille entre 6 à 8 μ . Certaines d'entre elles présentent des bourgeons (Photo 2). Le microscope électronique à transmission révèle une ultrastructure de l'enveloppe qui, de l'extérieur vers l'intérieur montre:

- une paroi cellulaire: Composée de glucanes et de mannanes associés à des protéines, elle constitue une protection physique externe, et elle est complètement perméable à l'eau, aux minéraux et aux petites molécules organiques.
- une membrane cytoplasmique: constituée de glycolipides et de glycoprotéines, elle règle les échanges entre les milieux intra et extracellulaires. Cette membrane est caractérisée par une perméabilité sélective.

Le reste des organites intracellulaire étant le même que celui d'une cellule eucaryote classique

(a)

(b)

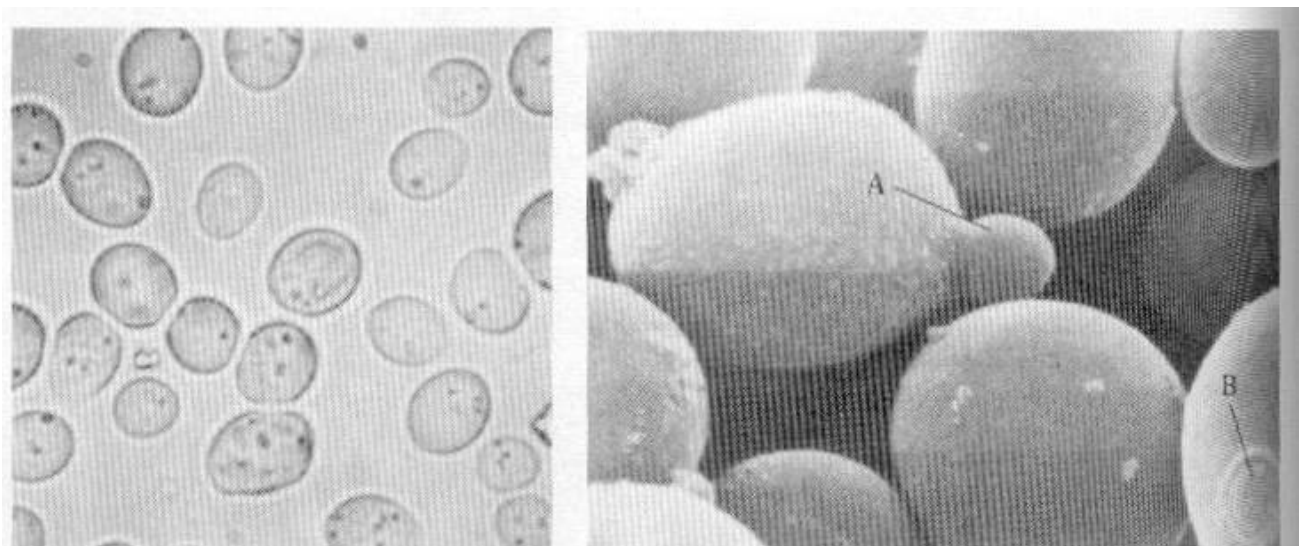


Photo2. *S.cerevisiae*: (d'après Alcamo, 1997).

(a) Cellules de *S. cerevisiae*. La levure de bière vue au microscope optique (Gx100)

(b) Microscopie électronique à balayage de *S.cerevisiae*: le bourgeon (A) est présent sur l'une des cellules. (B) correspond à une trace «cicatrice» de bourgeonnement (en bas à droite)

3. Monographie des plantes étudiées

L'HE aromatique d'origan (*Origanum compactum*, Famille des labiacées) est extraite à partir des sommités fleuries de l'origan; plante vivace qui renferme 0,15 à 0,40% d'essences riches en phénols; le carvacrol et/ou le thymol (son isomère de position). L'HE d'origan en renferme à des proportions différentes. Le terme aromatique définit un composé odoriférant ou non qui comporte au moins un noyau benzénique

L'HE aromatique de girofle (*Eugenia caryophyllata*, Famille des Myrtacées) est extraite à partir des boutons floraux (clous de girofle) à odeur caractéristique et à saveur chaude et piquante. La plante renferme 15 à 20% d'HE extraite à partir des boutons floraux desséchés du giroflier. L'essence renferme de 85 à 93% en volume d'eugénol libre et combiné. L'essence de girofle est officinale et elle est utilisée en médecine dentaire comme antiseptique et analgésique.

Introduction générale

L'activité antifongique des HE est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur.

Le mécanisme de l'action fongicide des HE a été abordé par quelques études qui sont arrivées à la conclusion que ce mécanisme se manifeste par une altération de la membrane plasmique de la cellule fongique. Cependant, les méthodes biochimiques utilisées dans ces travaux ne permettent pas de déceler d'autres altérations éventuelles notamment au niveau de la paroi cellulaire.

In vivo, l'incidence croissante des infections fongiques, plus particulièrement celles provoquées par les levures du genre *Candida* pousse à rechercher de nouveaux agents antifongiques qui ne soient pas fongistatiques, toxiques et générateurs de résistance comme ceux déjà utilisés. La recherche d'une alternative thérapeutique s'avère donc nécessaire. D'où l'intérêt d'essayer de transposer les résultats de l'action fongicide des HE obtenus *in vitro* sur des modèles *in vivo*.

Le but du présent travail sera :

Dans la première partie :

- De comparer l'activité antifongique de vingt HE *in vitro* sur une levure ; *Saccharomyces cerevisiae* en utilisant une méthode standardisée et améliorée dans notre laboratoire
- D'étudier le mécanisme d'action des HE d'origan et de girofle ayant montré une puissante action fongicide sur l'enveloppe cellulaire de cette même levure.

Dans la deuxième et la troisième partie:

- Mettre en évidence l'activité anticandidosique *in vitro* des deux composés majoritaires, le carvacrol ou l'eugénol, et de tester cet effet *in vivo* en utilisant comme modèle expérimental,

la candidose vaginale chez le rat immunodéprimé. L'un ou l'autre de ces deux composés majoritaires sont utilisés en traitement prophylactique et en traitement thérapeutique.

- Evaluer l'activité *in vivo* du carvacrol et de l'eugénol en utilisant le modèle expérimental de la candidose vaginale œstrogène dépendant chez une deuxième espèce mammifère; la souris. Le carvacrol et l'eugénol ont été utilisés en traitement thérapeutique.

Première partie

Etude de l'activité antifongique de différents chémotypes d'huiles essentielles et du mécanisme d'action des huiles essentielles de girofle et d'origan sur *Saccharomyces cerevisiae in vitro*

I. Introduction

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE sont différentes et peuvent donner des résultats différents d'une technique à l'autre (Youssef et Tawil, 1980; Carson et Riley, 1995 et Suhr et Nielsen, 2003)

L'objectif du présent chapitre est d'appliquer dans une première partie une méthode standardisée et améliorée dans notre laboratoire pour la comparaison de l'action antifongique de vingt huiles essentielles de familles chimiques différentes sur 3 souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* en utilisant la concentration de 0,2% (v/v) pour toutes les huiles. Pour les huiles ayant montré une inhibition de croissance, des concentrations plus faibles de ces huiles sont utilisées afin de déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) et leurs concentrations minimales fongicides (CMF), et voir quelles sont parmi elles celles qui ont l'effet antifongique le plus puissant.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons essayé d'élucider le mécanisme d'action fongicide des HE d'origan et de girofle sur une des trois souches de *S. cerevisiae*

Les HE pour lesquelles nous avons testé l'activité antifongique peuvent être classées suivant la nature chimique de leurs composés majoritaires en quatre groupes:

les HE de thym, d'origan et de clou de girofle dont les composés majoritaires sont de nature phénoliques;

les HE de patchouli, de géranium et de la menthe poivrée dont les composés majoritaires possèdent un groupement alcoolique;

les HE de laurier, de basilic, de sauge sclérée, de lavande et d'ilang-ilang ayant pour composé majoritaire le groupe linalool;

les HE de mélaleuque (arbre à thé) et de cyprès dont les terpinènes représentent une forte proportion.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

- Deux souches *S. cerevisiae* FF182168 et FF182170 ont été utilisées dans cette étude. Ces souches nous ont été aimablement fournies par le Dr A Aboussekhra du centre de recherche de l'hôpital King Faisal (Riyadh, Royaume de l'Arabie Saoudite). Ces deux souches ont servi pour l'étude de la réparation des dimères de pyrimidine dans les différentes phases du cycle cellulaire (Al-moghrabi et coll., 2001).

- Une troisième souche ascomycète, *S. cerevisiae* SB36-85 a été isolée à partir du levain traditionnel dans notre laboratoire et identifiée en utilisant la procédure standard de détermination des levures (Kreger van Rij, 1987).

2. Milieu de culture

- Pour les deux premières souches, le milieu YEPG, yeast extract peptone glucose, (annexe) (Difco) a été utilisé afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) des levures traitées par les différentes HE

Le milieu YEPG agar a été utilisé pour la culture des levures et leur maintenance

- Pour la souche SB36-85, le milieu minimum synthétique YNB, yeast nitrogen base(annexe) supplémenté de 0,5% de glucose est utilisé afin de déterminer la CMI et la CMF

Afin d'éviter une contamination par les bactéries, du chloramphénicol à 0,05% est rajouté au milieu YEPG liquide et YEPG agar

3. Préparation des cellules lavées

Une colonie de *S.cerevisiae* est mise en culture dans 200 ml de YPG pendant 18 h dans un bain Marie agitateur à 30°C. Un volume de 3ml de la préculture obtenue est sédimenté par centrifugation à 2000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est enlevé et le culot est repris dans un volume de tampon phosphate (PBS) de 3 ml, puis centrifugé pendant 5min à 2000 g.

Le surnageant est enlevé et le culot est resuspendu. Cette opération est répétée 3 fois pour obtenir des cellules dites lavées.

4. Comptage de cellules

Le comptage des cellules se fait sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Après dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la suspension de cellules lavées, une microgoutte est déposée entre lame et lamelle. Le comptage du nombre de cellules par carré moyen se fait en respectant les caractéristiques de la lame utilisée (surface: 0.0025 mm^2 ; profondeur: 0.2 mm).

5. Comptage des cellules viables

Le dénombrement des cellules viables est confirmé par la méthode de la goutte calibrée selon laquelle la suspension subit une série de dilutions progressives au $1/10^{\text{ème}}$ et à partir de chaque dilution, une goutte calibrée de $25\mu\text{l}$ est déposée à la surface d'une boîte de Petri contenant 20ml de milieu nutritif gélosé (YPG). Après incubation à 30°C pendant 24h, les levures sont dénombrées, et les résultats sont exprimés en nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) sur la $1^{\text{ère}}$ dilution permettant d'observer entre 7 et 30 colonies nettement séparées (Courvalin et coll., 1991).

En utilisant différentes tailles de l'inoculum, 10^7 a été choisie comme taille de l'inoculum pour la détermination de la CMI et la CMF.

6. Agents antifongiques

La qualité des différentes HE utilisées dans cette étude est certifiée par la société Abissinia essential oils qui nous les a fournies. (Fès, Maroc).

7. Dispersion des HE

Les HE pures sont d'abord mises en émulsion à la concentration $1/10^{\text{ème}}$ dans une solution d'agar à 0,2% (1/500) afin d'obtenir un maximum de contact entre l'huile et le microorganisme à tester (Remmal et coll., 1993a), ensuite toutes les huiles sont diluées à 0,2% (1/500) afin de déterminer l'activité antifongique à cette concentration.

8. Détermination de l'activité antifongique des HE

Un volume final de 1 ml est préparé dans des tubes stériles contenant le milieu de culture (880µl), le volume de 20µl l'HE diluée au $1/10^{\text{ème}}$ et 100µl de la suspension de cellules au nombre de $10^7/\text{ml}$ et la croissance des levures est observée après 24 h à 30°C à l'œil nu. L'observation d'une moire témoigne d'une croissance de *S. cerevisiae*. Les HE ayant présenté une CMI supérieure à 1/500 sont éliminées, les autres présentant une croissance négative seront testées pour des concentrations plus faibles pour voir quelles sont les HE qui ont la plus importante action antifongique.

9. Détermination de la CMI et de la CMF

Pour les HE ayant présenté une croissance négative à la concentration 0,2% (1/500), Les CMI des HE sont déterminées en duplicate dans un milieu liquide par contact direct de l'huile essentielle dont les concentrations sont 0,1%, 0,05%, 0,066% et 0,025% et la levure pendant 24 h à 30°C suivant la méthode décrite par Remmal et coll. (1993a)

Pour la détermination de la CMF, Une fraction de 20µl des tubes présentant une croissance négative est aseptiquement transférée dans des tubes contenant 980µl de milieu YPG stérile. Ainsi la quantité des HE contenue dans les 20µl est diluée 50 fois, afin d'éliminer le risque de transporter l'effet inhibiteur des agents antifongiques. Après incubation à l'étuve à 30°C pendant 24h, Les tubes n'ayant pas montré de croissance, sont considérés comme contenant une concentration levuricide d'HE.

III. Résultats

Les résultats de l'activité antifongique des vingt HE testées sur les trois souches de *S.cerevisiae* sont présentés sur le tableau II. Parmi les 20 HE testées, 12 d'entre elles ont révélé une activité antifongique à une concentration de 0,2% (1/500) pour les 3 souches de *S.cerevisiae* testées, ce sont les huiles essentielles de sauge, de lavande, de cyprès, d'origan, de basilic, de menthe poivrée, d'ilang-ilang, de verveine exotique, de clou de girofle, d'ail, de mélaleuque et de thym. Ces douze HE ont servi pour la détermination de la CMI et de la CMF. Les résultats présentés sur le tableau III montrent les valeurs de concentrations minimales (CM).inhibitrices et fongicides. Celles qui présentent les plus faibles valeurs de CMI et de CMF sont les HE de thym, d'origan, de verveine exotique, d'ail, de girofle et d'ilang-ilang. Les HE levuricide à des valeurs moyennes de CMI et CMF sont les HE de basilic, de menthe poivrée, de lavande et de sauge alors que les HE de l'arbre à thé et celle du cyprès ont des effets très limités.

Huile essentielle	Nom latin	<i>S.cervisiae</i> FF182168	<i>S.cerevisiae</i> FF182170	<i>S.cerevisiae</i> SB36-85
Noix de muscade	<i>Myristica fragrans</i>	+	+	+
Laurier	<i>Laurus nobilis</i>	+	+	+
Sauge sclarée	<i>Salvia sclarea</i>	–	–	–
Lavande	<i>Lavandula hybrida</i>	–	–	–
Menthe poivrée	<i>Mentha spicata</i>	–	–	–
Mandarine	<i>Citrus reticulata</i>	+	+	+
Armoise	<i>Artemisia absinthium</i>	+	+	+
Ilang ilang	<i>Cananga odorata</i>	–	–	–
Orange douce	<i>Citrus sinensis</i>	+	+	+
Verveine exotique	<i>Listea cubeba</i>	–	–	–
Géranium	<i>Pelagronium</i>	+	+	+
Baie de genièvre	<i>Juniperus communis</i>	+	+	+
Patchouli	<i>Pogostemon</i>	+	+	+
Clou de girofle	<i>Eugenia caryophyllata</i>	–	–	–
Ail	<i>Allium sativum</i>	–	–	–
Arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>	–	–	–
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	–	–	–
Cyprès	<i>Cupressus sempervirens</i>	–	–	–
Origan	<i>Oreganum compactum</i>	–	–	–
Basilic	<i>Ocimum basilicum</i>	–	–	–

Tableau II: Tests de l'activité de 20 HE sur les 3 souches de *S. cerevisiae* FF182168, FF182170 et SB36-85 par la méthode de microdilution en milieu liquide. Les tests sont réalisés avec une proportion de 0,2%(v/v) pour les 20 HE
 (-) absence de croissance; (+) croissance

Huile essentielle	Nom latin	CMI et CMF des 3 souches de <i>S. cerevisiae</i>
Origan	<i>Oreganum compactum</i>	0,025 <CM < 0,033
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	0,025 <CM < 0,033
Verveine exotique	<i>Listea cubeba</i>	0,033 <CM < 0,050
Ail	<i>Allium sativum</i>	0,033 <CM < 0,050
Girofle	<i>Eugenia caryophyllata</i>	0,033 <CM < 0,050
Ilang-ilang	<i>Cananga odorata</i>	0,033 <CM < 0,050
Basilic	<i>Oscium basilicum</i>	0,050 <CM < 0,1
Menthe poivrée	<i>Mentha spicata</i>	0,05 <CM < 0,1
Lavande	<i>Lavandula hybrida</i>	0,05 <CM < 0,1
Sauge sclarée	<i>Salvia sclarea</i>	0,05 <CM < 0,1
Arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,1 <CM < 0,2
Cyprès	<i>Cupressus semparvirens</i>	0,1 <CM < 0,2

Tableau III: Détermination des CMI et des CMF des 12 HE ayant inhibé la croissance des trois souches de *S.cerevisiae* à 0,2% (v/v).

VI. Discussion

L'importance de pousser scientifiquement les investigations sur les HE des plantes aromatiques comme source potentielle de nouveaux composés antimicrobiens vient de l'utilisation traditionnelle des plantes à des fins médicinales. Cependant, la consommation de ces produits naturels nécessite une recherche plus approfondie dans ce domaine.

Dans la bibliographie scientifique, un grand nombre d'auteurs ont rapporté l'effet antimicrobien de plusieurs HE. Cependant, ce qui rend difficile cette détermination de l'activité antimicrobienne, est l'insolubilité des HE dans l'eau. Notre laboratoire a essayé de remédier à ce problème en faisant une standardisation de la méthode de contact direct en milieu liquide qui consiste à utiliser comme agent de dispersion de l'agar-agar.

Dans cette étude, nous avons testé l'activité d'une vingtaine d'HE en utilisant une méthode améliorée et standardisée dans notre laboratoire. Cette méthode a pour avantage l'utilisation de l'agar à 0,2% comme agent de dispersion, car ce dernier permet d'obtenir une dispersion stable et homogène avec les HE. De même, l'utilisation des détergents comme le tween 80, le triton X100 ou des solvants comme l'éthanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO) exercerait une inhibition de l'activité antimicrobienne. (Remmal et coll., 1993 a et b) De plus, cette méthode a pour avantage l'utilisation d'un inoculum constant car la taille de l'inoculum influence fortement les valeurs des CMI et CMF (Remmal et coll., 1994). Plusieurs années plus tard, Hili et ses collaborateurs (1997) ont confirmé par la technique de microdilution en milieu liquide que l'utilisation d'un agent de dispersion; le DMSO diminue de 50 fois l'activité antifongique de l'huile essentielle de cannelle sur *S. cerevisiae*. Plus récemment, les travaux de Inouye et coll. (2001a) sur l'action d'une huitaine de composés majoritaires d'HE sur *Aspergillus fumigatus*, ont également confirmé que l'addition du tween 80 fait augmenter les valeurs de la CMI de six composés parmi les huit testés d'un facteur de 2 à 8 en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide

Les résultats sur le tableau II représentés par les symboles + pour la croissance et – pour l’inhibition de la croissance ont été réalisés avec une concentration de 0,2% (1/500). Le choix de cette concentration comme seuil maximal de CMI et CMF vient du fait que ce travail vise la sélection des HE et de leurs composés majoritaires pour effectuer des tests *in vivo* sur des modèles animaux. Pour cela, il faut se placer dans des conditions loin de l’utilisation des concentrations toxiques.

Parmi les douze HE qui ont inhibé la croissance des 3 souches de *S.cerevisiae* testées (Tableau II), les HE de thym, d’origan, d’ail, de verveine exotique, de girofle et d’ilang-ilang se sont montrées les plus efficaces. Ces résultats sont en accord avec les résultats du screening publiés par Hammer et coll. (1999) ainsi que ceux de Nascimento et coll. (2000) sur une autre levure, *C. albicans*. Concernant les HE de girofle et de thym, les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux rapportés par Hili et coll. (1997) utilisant également la technique de microdilution en milieu liquide. Les HE d’ail, d’origan, de thym, et de girofle possèdent également une activité bactéricide selon les résultats rapportés par Inouye et coll. (2001b). L’effet antifongique des HE d’origan, de thym et de girofle serait dû à la présence de leurs composés majoritaires de nature phénolique (Boonchird et Flegel, 1982; Inouye et coll., 2001b; Ultee et coll., 2002; Bennis et coll., 2004).

Nos résultats sur l’effet antifongique de l’HE de verveine exotique testée sur les trois souches de *S.cerevisiae* (tableau III) corroborent ceux obtenus par Wang et coll. (1999) qui ont montré que cette HE a une action antifongique importante sur plusieurs espèces de champignons et de moisissures.

Les résultats que nous avons obtenus avec l’HE de sauge qui s’est avérée moyennement efficace sur *S.cerevisiae* sont différents de ceux obtenus par Hili et coll. (1997), qui ont montré que cette HE est très peu efficace sur *S. cerevisiae*. Les travaux de Nascimento et coll. (2000) ont rapporté que la levure *C.albicans* était insensible à cette HE. Cette variabilité des

résultats pourrait s'expliquer par la composition des HE qui change suivant les conditions climatiques et environnementales d'un pays à l'autre (Janssen et coll., 1987). D'autre part, plusieurs HE portant le même nom peuvent dériver de différentes espèces de plantes (Reynolds, 1996).

D'après les résultats du tableau III, l'HE de cyprès et de l'arbre à thé sont peu efficaces sur *S. cerevisiae*. Pour l'HE de cyprès, ce résultat est en accord avec celui rapporté par Hammer et coll. (1999). Pour l'HE de l'arbre à thé, nos résultats corroborent ceux obtenus par Nenoff et coll. (1996) qui ont montré que les champignons du genre *Candida* étaient peu sensibles à cette HE *in vitro*. Testée dans notre laboratoire sur *C. albicans*, cette HE a donné le même résultat. Cependant, elle est très utilisée dans le traitement des infections cutanéomuqueuses causées par *C. albicans* mais à des doses nettement supérieures à la CMI (Barnes, 1989; Hammer et coll., 1998; Vasquez, 2000).

Pour beaucoup d'HE, certains travaux ont montré leurs effets toxiques et leurs propriétés irritantes lorsqu'elles sont utilisées à fortes concentrations (Lawless, 1995). Malgré cela, la plupart de ces HE sont utilisées en partie ou en entier comme produits pharmaceutiques ou cosmétiques indiquant que leur toxicité n'interdit pas leur utilisation à faible dose. Cependant des recherches sur leur toxicité et leur irritabilité seraient nécessaires avant de les utiliser chez l'Homme ou dans le domaine vétérinaire. Si leur utilisation est envisageable dans le domaine médical ou agroalimentaire pour la préservation des aliments, des études sur les mesures de sécurité à prendre et des recherches de leur toxicité s'imposent.

D'après les résultats obtenus, et suivant la classification des HE par familles de composés majoritaires, on peut conclure que, parmi les HE qui ont montré l'activité antifongique la plus importante sur *S. cerevisiae* sont celles ayant des composées majoritaires de nature phénolique, suivies de celles qui possèdent le linalool comme composé majoritaire. Quant aux HE à composés terpinéniques, leurs effets antifongiques *in vitro* restent limités.

Conclusion

Dans cette première partie qui a consisté à tester *in vitro* de l'activité antifongique de 20 HE de familles chimiques différentes sur 3 souches de *S. cerevisiae*, Nous avons choisi comme seuil de concentration maximale 0,2% (v/v) car notre but était de sélectionner les HE et leurs composés majoritaires pour faire des tests *in vivo*, Parmi les 20 HE testées, huit ont montré une croissance positive. Les 12 HE restantes ont été testées avec des concentrations plus faibles (0,1; 0,05; 0,033; et 0, 025%) et 6 d'entre elles ont montré une puissante action antifongique. Parmi ces HE, trois ont pour composé majoritaire des substances de nature phénolique

Puisque les HE d'origan et de thym possèdent respectivement comme composés majoritaires le carvacrol et le thymol qui sont des isomères de position, nous avons choisi dans le suivant chapitre l'HE d'origan avec l'HE de girofle pour étudier leur mécanisme d'action fongicide sur une souche de *S. cerevisiae*.

Etude du mécanisme d'action des huiles essentielles de girofle et d'origan sur *Saccharomyces cerevisiae* in vitro

I. Introduction

Afin de comprendre l'action antifongique des HE d'origan et de girofle sur *S. cerevisiae*, mise en évidence dans le chapitre précédent, nous avons essayé d'étudier leurs mécanismes d'action sur l'enveloppe des cellules de cette levure afin de voir s'il est le même que celui déjà démontré dans notre laboratoire sur l'enveloppe des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Rhayour et coll., 2003).

Le mécanisme d'action de ces deux HE a été étudié en utilisant trois approches:

- l'évaluation de la mortalité cellulaire de *S.cerevisiae* en fonction de la concentration de l'HE utilisée par la méthode de comptage de colonie sur milieu gélosé.
- la mesure de la libération du contenu cellulaire de *S.cerevisiae* absorbant à 260 nm en fonction de la concentration de l'HE utilisée et de la durée du traitement (dose-réponse)
- l'observation au microscope électronique à balayage des cellules traitées par ces deux HE.

II. Matériel et Méthodes

1. Levure

La souche *S. cerevisiae* SB36-85 a été choisie pour l'étude du mécanisme d'action des HE d'origan et de girofle

2. Milieu de culture

YNB: le milieu minimum synthétique YNB (0,67% yeast nitrogen base) supplémenté de 0,5% de glucose (annexe) est utilisé dans la détermination de la CMI et de la CMF de la levure traitée par les HE d'origan ou de girofle

YPG : le milieu YPG agar (Difco) est utilisé pour la culture de cette levure et sa maintenance

3. Préparation des cellules lavées

Une seule colonie de *S.cerevisiae* est mise en culture dans 200ml de YNB glucose pendant 18h dans un bain Marie agitateur à 30°C, et la préparation des cellules lavées se fait comme dans le chapitre précédent afin d'obtenir une concentration de cellules de $2,5 \cdot 10^7$ Cellukles/ml.

4. Agents antifongiques

L'huile essentielle d'origan et l'huile essentielle de girofle utilisées dans cette étude sont fournies par la société Abissinia essentielles oils (Fès. Maroc). Les émulsions d'HE sont préparées de la même façon que celles qui ont servi pour la première partie de ce chapitre.

5. Détermination de la CMI et de la CMF

La CMI et la CMF des HE d'origan et de girofle sont déterminées en triplicate dans un milieu liquide par contact direct de l'HE à tester avec les cellules de *S. cerevisiae* suivant la méthode mise au point par Remmal et coll. (1993a, et b) déjà décrite dans la première partie de ce chapitre.

6. Comptage des cellules vivantes

Le nombre de cellules vivantes de *S.cerevisiae* après traitement par les HE d'origan et de girofle est déterminé sur des boîtes de Petri en utilisant la méthode de la goutte calibrée déjà décrite dans le chapitre précédent (Courvalin et coll., 1991).

7. Traitement des cellules et estimation des constituants cytosoliques libérées dans le surnageant

La libération des constituants cellulaires absorbant à 260 nm de la levures traitée par l'HE d'origan ou de girofle a été réalisée de la façon suivante: Dans chaque cas, un échantillon de 1,5 ml de la suspension de cellules lavées ($2,5 \times 10^7$ Cellules/ml dans du tampon phosphate PBS) est traité. Trois groupes de traitement sont considérés:

1/ un tube témoin non traité où les cellules sont suspendues dans du PBS.

2/ les cellules sont suspendues dans du PBS avec des concentrations croissantes d'HE allant de 0,025% à 0,25% pendant une heure. (Dose-réponse)

3/ les cellules sont suspendues dans du PBS avec une concentration levuricide d'HE (0,2%) à différents temps de traitement: 0, 10, 30, 60, 90, 120 et 180 min.

Après traitement, les cellules sont centrifugées à $12000 \times g$ pendant 2 min et l'absorbance du surnageant est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à UV (Beckman).

8. Microscopie électronique à balayage

Après une heure de traitement par la concentration levuricide de l'HE (0,2%), les levures sont préfixées dans 2% de glutaraldehyde pendant 1 heure à 4°C, ensuite une postfixation est faite à 2% de tétroxyde d'osmium pendant 30 min à 4°C. Après chaque fixation, les cellules sont lavées 2 fois au PBS, puis séchées à un point critique (Balzers CPD 010, Balzers, Lichtenstein) au CO₂ liquide sous une pression de 95 bar, ensuite, les échantillons sont couverts par un spray (couvert d'or) cathodique (Edwards S150B, Edwardshigh Vacuum

International, Wilmington, NC, USA) et les échantillons sont observés au microscope électronique à balayage (Stereoscan 360, Cambridge, UK) (Benyahya et col., 1992)

III. Résultats

1. CMI et CMF.

Les résultats montrent que 0,025% d'huile d'origan inhibe complètement la croissance de *S. cerevisiae* alors que 0,033% est levuricide. Concernant l'huile de girofle, La CMI est de 0,033% alors que la CMF est de 0,050 %.

2. Lyse et viabilité des cellules en fonction des concentrations d'HE.

La figure 6 montrant le nombre de cellules viables exprimé en nombre d'unités formant colonie (UFC/ml) diminue au fur et à mesure que la concentration de l'huile d'origan augmente, et ceci jusqu'à 0,033% au de là de laquelle la mortalité des cellules est de 100%. La figure 7, montre qu'après traitement des cellules par une concentration fongicide de l'huile essentielle d'origan (0,2%), 10 minutes de contact entre l'HE et les cellules sont suffisantes pour provoquer la mort totale des cellules. Concernant l'HE de girofle, la figure 8 montre que le nombre d'UFC/ml diminue aussi avec l'augmentation de la concentration de l'HE de girofle jusqu'à 0,125% à partir de laquelle la mortalité des cellules est totale. En terme de cinétique d'action, dix minutes de traitement sont suffisantes pour une mortalité totale (Figure9).

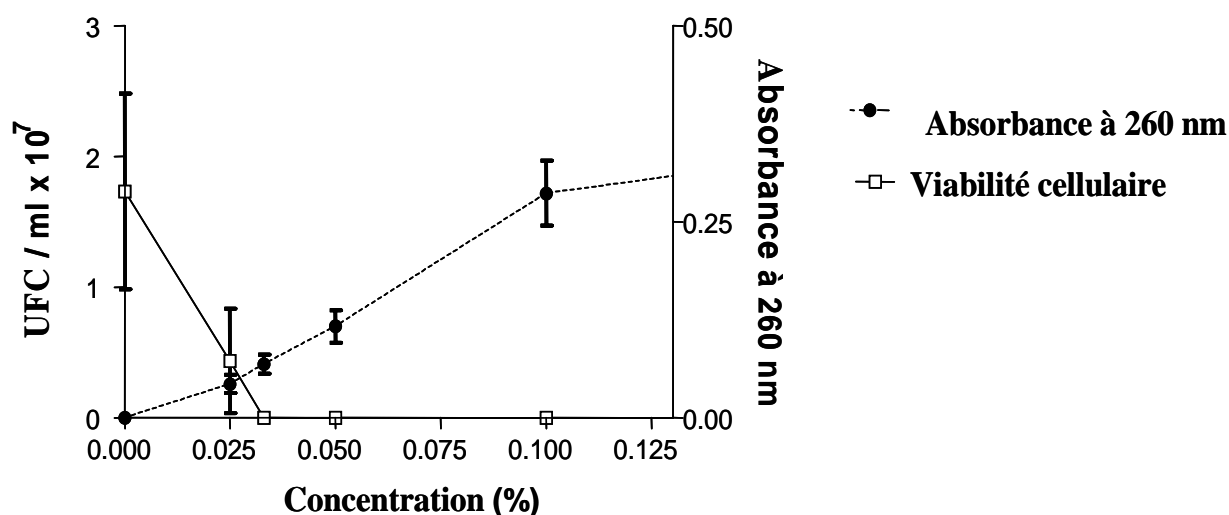


Figure 6: L'effet de différentes concentrations d'huile d'origan sur la mortalité cellulaire et la libération du contenu cellulaire à 260 nm de *S. cerevisiae*

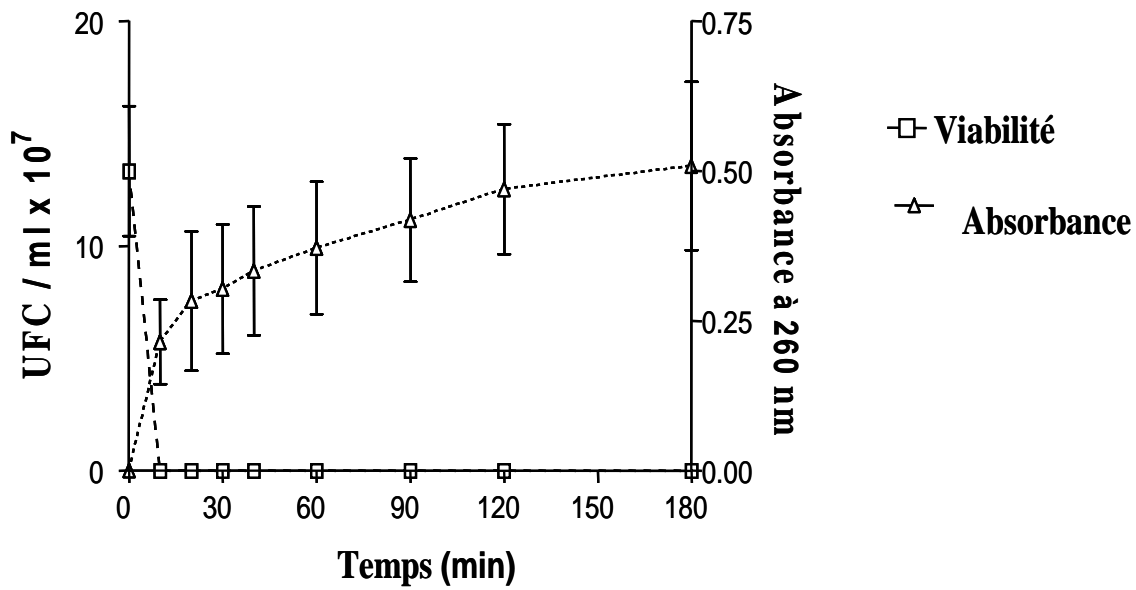


Figure 7: Taux de mortalité et libération du contenu cellulaire à 260 nm de *S. cerevisiae* traitée par 0,2% d'huile d'origan.

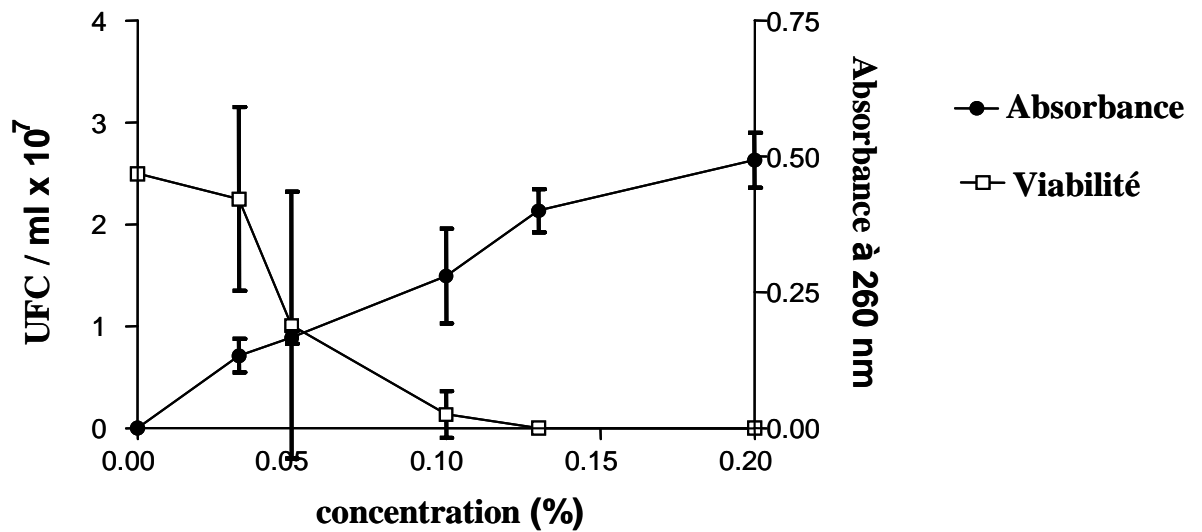


Figure8: L'effet de différentes concentrations d'huile de girofle sur la mortalité cellulaire et la libération du contenu cellulaire à 260 nm de *S. cerevisiae*.

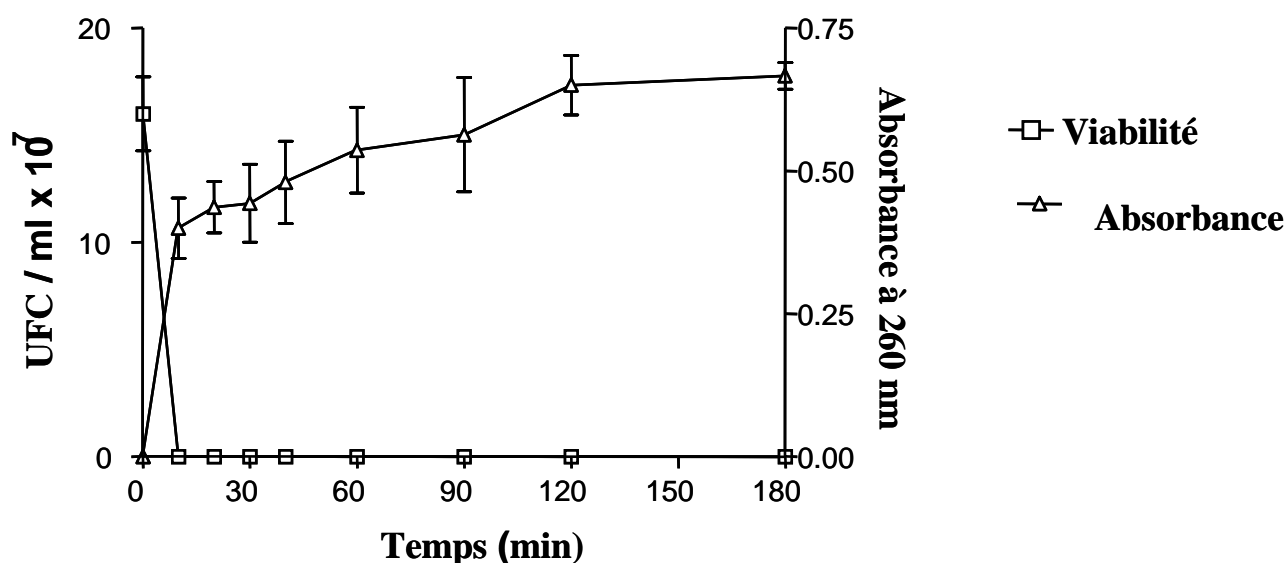


Figure 9: Taux de mortalité et libération du contenu cellulaire à 260 nm de *S. cerevisiae* traitée par 0,2% d'huile de girofle.

3. Libération et viabilité cellulaire en fonction de la durée du traitement par les HE

Dans le but d'expliquer la cause de la mort cellulaire, nous avons mesuré la lyse des cellules de *S.cerevisiae* traitées par des concentrations croissantes d'HE en mesurant la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm. Les figures 6 et 8 montrent que, aussi bien pour l'HE d'origan que celle de girofle, la libération du contenu cellulaire de *S. cerevisiae*, augmente en fonction de la concentration des HE. Les figures 7 et 9 montrent que cette libération est obtenue de façon concomitante avec la mortalité cellulaire, ce qui suggère que la mort cellulaire est liée à la lyse cellulaire de *S. cerevisiae* pour les deux HE.

4. Observation au microscope électronique à balayage

Compte tenu du fait que les HE d'origan et de girofle conduisent à une libération du contenu cellulaire, nous avons cherché leur action au niveau de l'enveloppe cellulaire de *S. cerevisiae*. Cette action s'est traduite sur les électronographies obtenues au microscope électronique à balayage par d'importantes altérations morphologiques. En comparaison avec la photo 3 où

on observe des cellules possédant une surface cellulaire lisse et régulière, la photo 5 montre qu'à la surface des cellules traitées par l'HE de girofle on voit des altérations qui se traduisent par une déformation des cellules alors que pour l'huile d'origan, en plus des déformations, la surface cellulaire montre des craquelures qui la parcourent dans tous les sens. (Photo4)

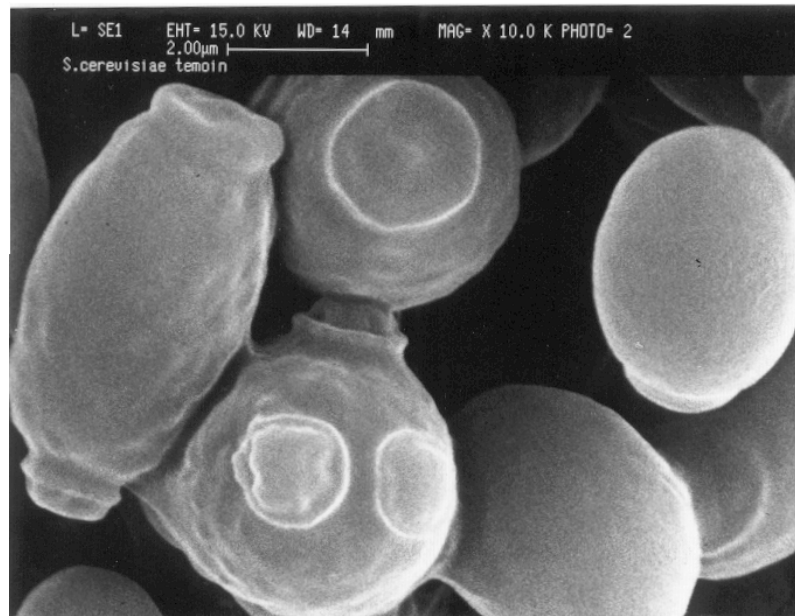


Photo 3: Microscopie électronique à balayage de *S. cerevisiae* (Témoin). G X 100.



Photo 4: Microscopie électronique à balayage de *S. cerevisiae* traitée par 0,2% d'huile d'origan. G X 100

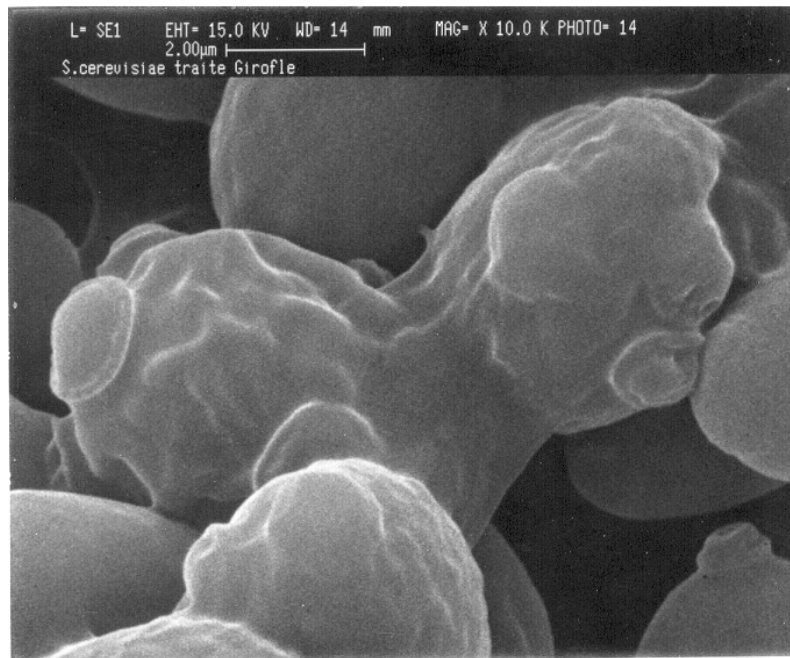


Photo 5: Microscopie électronique à balayage de *S. cerevisiae* traitée par 0,2% d'huile de girofle. G X 100

VI. Discussion

Dans le présent travail, *S. cerevisiae* a été utilisée comme un modèle de levure pour étudier l'activité antifongique de l'HE d'origan et de girofle dans le but d'élucider leur mécanisme d'action antifongique

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'origan et de girofle a été rapportée dans plusieurs publications (Remmal et coll., 1993a ; Hammer et coll., 1999; Manohar et coll., 2001; Salgueiro et coll., 2003). Les composés majoritaires des ces huiles qui sont de nature phénoliques sont également connus pour leur action antifongique (Bonchird et flegel, 1982; Arras et Usai, 2001; Bennis et coll., 2004)

Les valeurs de CMI et de CMF obtenues avec ces HE sur *S. cerevisiae* sont aussi basses que celles déjà obtenues avec les mêmes huiles vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Remmal et coll., 1993a; Rhayour et coll., 2003). Cette détermination de la CMI et de la CMF nous a permis d'évaluer les concentrations de ces deux HE nécessaires pour induire la mortalité cellulaire. Les résultats obtenus montrent aussi que l'HE d'origan induit la mortalité cellulaire à une concentration inférieure à celle de l'HE de girofle, mais le temps d'action des deux est rapide. Une telle rapidité d'action est également observée pour ces mêmes HE avec les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Rhayour et coll., 2003).

Afin d'expliquer la mortalité des cellules de *S. cerevisiae*, nous avons étudié la lyse de ces levures en les traitant par différentes concentrations d'HE et nous avons mesuré la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm.

Les résultats obtenus montrent que cette lyse est concomitante avec la mort cellulaire ce qui suggère que cette dernière est une conséquence de la lyse cellulaire pour les huiles testées. Ceci nous conduit à émettre une hypothèse selon laquelle les deux huiles agissent au niveau de l'enveloppe cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons observé les cellules de *S. cerevisiae* traitées aux deux huiles en microscopie électronique à balayage, ceci nous a

permis de voir les effets de ces dernières sur l'enveloppe cellulaire. En effet, l'HE de girofle provoque des déformations au niveau des cellules. Les blastospores qui se trouvent en arrière plan de la photo 5 ne montrent aucune altération apparente. Au contraire, le traitement à l'HE d'origan montre des craquelures au niveau de toutes les cellules. Ceci montre que l'HE d'origan a un effet plus puissant que celui de l'HE de girofle. Ces résultats nous conduisent à émettre l'hypothèse selon laquelle les huiles essentielles agissent au niveau de l'enveloppe cellulaire.

Des recherches sur le mode d'action de l'huile essentielle d'origan sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif menées par Lambert et coll. (2002) ont montré une augmentation de perméabilité de la membrane plasmique, une modification du gradient de pH, et une libération des ions organiques. Ces perturbations ont pour conséquence une altération de la membrane. Des travaux de l'huile de l'arbre à thé sur *Candida albicans* rapportés par Cox et coll. (2000) montrent qu'en présence de cette huile, il y a une inhibition de la respiration cellulaire et une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique de *C. albicans* ce qui a pour conséquence une perturbation du contrôle chimiosmotique à l'origine de la mort cellulaire, de même, une altération des fonctions membranaires de *S.cerevisiae* a été constaté en présence de cette même HE (Hammer et coll., 2004). Les travaux de Salgueiro et coll.(2003), et de Pina-Vaz et coll. (2004) montrent que les HE d'origan et de thym provoquent une perméabilisation de la membrane plasmique conduisant à la mort de la cellule fongique. Tous les résultats rapportés par ces auteurs plaident en faveur d'une altération de la membrane plasmique des cellules fongiques ou bactériennes. Nos résultats concernant la libération du contenu cellulaire confirment ce point de vue. En plus, les résultats de microscopie électronique suggèrent une action antifongique de ces HE qui affecte non seulement la membrane mais toute l'enveloppe cellulaire. Ces résultats corroborent ceux de Bennis et coll.

(2004) qui montrent que le thymol et l'eugénol provoquent une altération de l'enveloppe de *S.cerevisiae*.

Puisque ces HE peuvent conduire à une telle action, elles peuvent être utilisées pour extraire l'ADN génomique de *S. cerevisiae* par l'HE d'origan ou de girofle au lieu d'utiliser des zymolyases ou du Sodium dodécyl Sulfate (SDS) couramment utilisés comme solutions de lyse.

Après avoir choisi ces deux HE à composés majoritaire phénoliques (origan et girofle), et déterminé leur mécanisme d'action, le suivant chapitre traitera de l'étude de l'activité antifongique de leurs composés majoritaires, le carvacrol et l'eugénol *in vivo* sur un modèle animal d'une infection superficielle provoquée par un champignon pathogène; *C albicans*, La candidose vaginale chez le rat.

Deuxième partie

**Evaluation du carvacrol et de l'eugénol *in vivo* dans la
prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale
sur le modèle de rat immunodéprimé.**

I. Introduction

Dans le présent travail, afin de tester l'activité *in vivo* du carvacrol et de l'eugénol, composés majoritaires respectifs des HE d'origan et de girofle, nous avons adopté le modèle expérimental de la candidose vaginale chez le rat immunodéprimé rapporté par Martinez et coll. (2001

Dans une première partie de cette étude, l'activité anticandidosique du carvacrol et de l'eugénol a été mise en évidence en utilisant un traitement prophylactique chez des rates inoculées par *C. albicans*, l'efficacité de ce traitement évaluée par des techniques microbiologiques et histologiques a été comparée à celle de la nystatine utilisée comme traitement de référence. Dans une deuxième partie, l'action thérapeutique du carvacrol et de l'eugénol a également été mise en évidence par des techniques microbiologiques et histologiques. A notre connaissance, c'est la première fois que le traitement par le carvacrol et l'eugénol est utilisé dans un modèle expérimental de candidose vaginale chez le rat.

II Matériel et méthodes

1/Animaux

Dans chaque expérience, 81 rates de souche Wistar âgées de 10 à 12 semaines et dont le poids variait de 150 à 200g ont été utilisées; 45 d'entre elles ont servi pour le traitement prophylactique, et 36 pour le traitement thérapeutique. Les animaux sont répartis par groupes de 5 dans des cages (480mm x 270mm x 200mm) et la photopériode est réglée à 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La température environnante de l'animalerie est maintenue entre 21 et 24°C et l'alimentation se compose de biscuits du commerce (annexe) et d'eau fournie *ad libitum*.

1.1 Ovariectomie des rates:

Afin d'éviter les effets des fluctuations de décharge hormonales ovariennes causées par le cycle œstrien chez les rates, ces dernières ont été ovariectomisées. Sobel et Muller (1983) Pour cela, les rates sont anesthésiées à l'éther par inhalation. Chaque animal est couché sur le côté et le champ opératoire est désinfecté à l'alcool puis rasé. Le plan peaucier est incisé selon la bissectrice de l'angle déterminé par l'axe de la dernière côte flottante avec celui de la colonne vertébrale. Le plan musculaire sous-jacent est également incisé. L'ovaire caché dans les franges graisseuses est dégagé, une ligature est pratiquée au niveau de chaque oviducte, les deux artères ovariennes sont obturées et la section est effectuée entre la ligature et l'ovaire. Les plans musculaire et peaucier sont fermés avec des points de suture. La région opérée est désinfectée et saupoudrée de sulfamide. Trois jours plus tard, la région opérée est entièrement cicatrisée.

1.2 Préparation des animaux au pseudo œstrus:

Dans le but d'avoir la concentration d'œstrogènes nécessaire et suffisante pour induire et maintenir l'infection, toutes les rates sont maintenues en pseudo œstrus. Pour cela, nous avons adopté le modèle déjà mis au point par Sobel et Muller (1983) et modifié par Cassone et coll.

(1995). Selon ce modèle, une dose de 0,5mg de benzoate d'œstradiol (Intervet) /rate est injectée par voie sous cutanée, toutes les 48 heures pendant 6 jours avant l'inoculation, puis une fois par semaine après inoculation et jusqu'à la fin de l'expérimentation. (Figure10)

1.3. Immunosuppression des animaux

Puisque la candidose vaginale est très fréquente chez les sujets immunodéprimés, le moyen choisi pour rendre les animaux immunodéprimés a été celui adopté par Jones et Adams (1970) modifié par Jones (1976) puis amélioré par Martinez et coll. (2001). Selon ce modèle, les animaux sont rendus immunodéprimés une semaine avant l'infection par administration d'un corticoïde, la dexaméthasone (cortaméthazone, Vétroquinol) en solution dans l'eau de boisson à la dose de 0,5 mg /l associé à la tétracycline 0,1% également dans l'eau de boisson. En effet, l'administration de la tétracycline altère la flore vaginale favorisant ainsi la prolifération de plusieurs espèces de *Candida* (Scudamore et coll., 1992), Cette association dexaméthasone/tétracycline se poursuit jusqu'à la fin de l'expérience avec augmentation de la dose de la dexaméthasone à 1mg/l et la réduction de la dose de tétracycline à 0,01%, à partir du septième jour et jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 10)

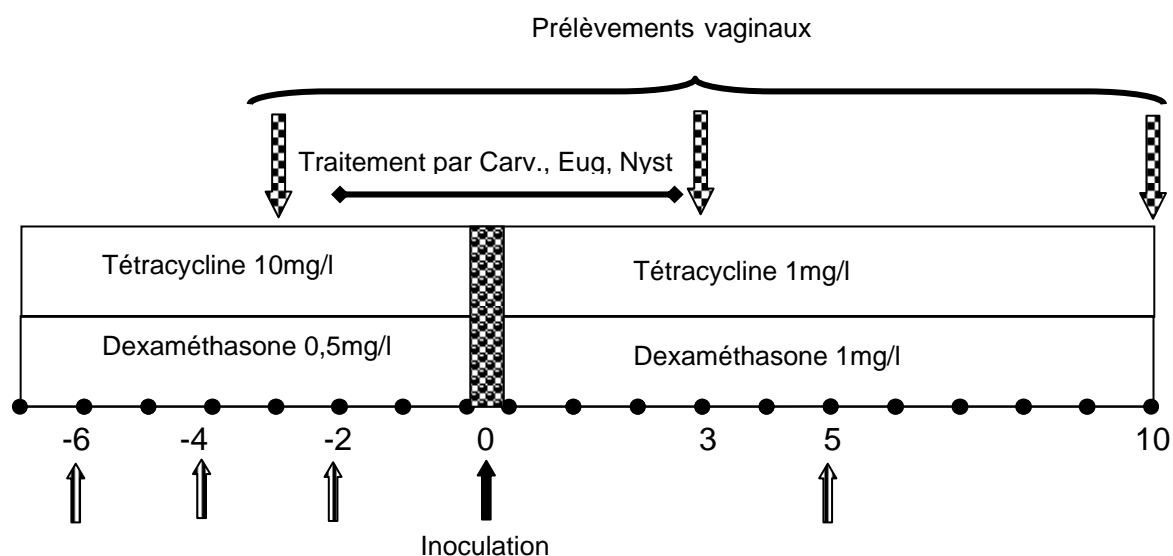


Figure 10a: traitement prophylactique
Diagramme schématisique du modèle de la candidose vaginale chez la rate immunodéprimée

↑↑: Injection de E₂ (0.5 mg/rat)

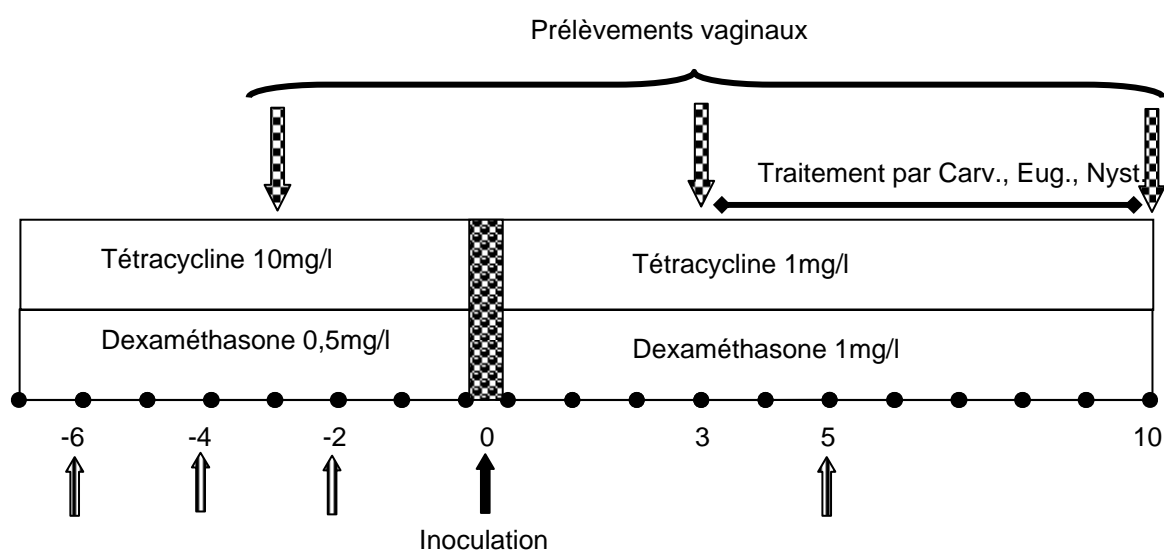


Figure 10b: traitement thérapeutique
Diagramme schématisique du modèle de la candidose vaginale chez la rate immunodéprimée

↑↑ : Injection de E₂ (0.5 mg/rat)

2/ Agents antifongiques

Le carvacrol, composé majoritaire de l'huile essentielle d'origan, et l'eugénol, composé majoritaire de l'huile essentielle de girofle, ont fournis par Sigma

La Nystatine, (Mycostatine), a été fournie par Brystol Meyer Squibb.

3/Microorganismes et conditions de croissance

La souche de *C. albicans* 1E111PV515 utilisée dans ce travail a été isolée dans le milieu hospitalier à partir de sécrétions vaginales d'une femme souffrant de vaginite aiguë.

3.1 Préculture

A partir d'un épuisement de *C. albicans* 1E111PV515 sur un milieu solide YPG (Yeast extract Peptone Glucose), une colonie est prélevée à l'aide d'un enseigneur et placée dans un erlenmeyer contenant 50 ml de milieu YPG liquide. Celui-ci est placé dans un bain Marie agitateur à 30°C pendant 18 heures. Afin d'éviter une contamination par les bactéries, du chloramphénicol à 0,05% est rajouté au milieu YPG liquide

3.2 Lavage des cellules

Un volume de 3ml de préculture est sédimenté par centrifugation à 2000 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans un volume égal de tampon phosphate (PBS). Les cellules sont ainsi lavées 3 fois et resuspendues dans du PBS puis ajustées à un nombre final de $6,6 \cdot 10^7$ cellules /ml.

3. 3 Comptage des cellules

Le comptage des cellules a été fait sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Après dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la suspension de cellules lavées, une microgoutte est déposée entre lame et lamelle. Le comptage du nombre de cellules par carré moyen se fait en respectant les caractéristiques de la lame utilisée (surface: $0,0025\text{mm}^2$; profondeur: 0,2mm). Le dénombrement des cellules viables est confirmé par la méthode de la goutte calibrée (Courvalin et coll., 1991)

3. 4. Détermination de la CMI et de la CMF

La CMI et la CMF ont été déterminées par la méthode décrite par Remmal et coll. (1993a)

Pour la détermination de la CMI et de la CMF des trois agents antifongiques, nous avons testé deux tailles différentes de l'inoculum, 10^3 - 10^4 et 10^5 - 10^7 UFC/ml afin de choisir la taille appropriée que nous allons adopter pour les manipulations suivantes.

Afin de préparer des concentrations variables de ces trois composés, le carvacrol et l'eugénol sont d'abord mis en émulsion à la concentration $1/10^{\text{ème}}$ dans une solution stérile d'agar à 0,2%, et la nystatine est mise en solution dans de l'eau stérile. Le mélange est préparé dans des tubes stériles contenant le milieu de culture, un volume de l'agent antifongique en quantités croissantes (pour le carvacrol et l'eugénol; 1/250, 1/500, 1/750, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/1750, et 1/2000 et pour la nystatine; 2, 3, 4, 5, 10, 15, et 20UI), et 100 μ l de la suspension de cellules. 24 h plus tard, la croissance des levures est observée à l'œil nu

La détermination de la CMF est faite de la même façon que dans le chapitre précédent

4. Infection expérimentale

Les rates sont maintenues en pseudoœstus par l'injection sous-cutanée de benzoate d'oestradiol (Intervet) à une dose de 0,5 mg/ rate une fois toutes les 48 heures avant l'inoculation, puis une fois par semaine. Six jours après la première injection de benzoate d'oestradiol (Figure10), les rates sont inoculées par voie intra vaginale par 10^7 cellules (blastoconidies de *C. albicans*) dans 150µl de PBS. Trois jours avant l'inoculation et avant le début de tout traitement, un prélèvement vaginal a été effectué pour tous les groupes d'animaux afin de vérifier l'absence de *C.albicans* dans leur cavité vaginale. Le prélèvement vaginal se fait en roulant un coton tige stérile dans la cavité vaginale des rates. Le contenu de ce coton tige est ensuite suspendu dans 1ml de PBS puis vortexé. La détermination du nombre d' UFC est faite en duplicate selon la méthode de la goutte calibrée (Courvalin et coll., 1991) Cette expérience a été répétée 3 fois et les résultats obtenus sont reproductibles.

5. Préparation des agents antifongiques pour le traitement vaginal

Le traitement est effectué par voie intravaginale par injection de 500 µl de carvacrol ou d'eugénol utilisés à une concentration double de la CMI, $2 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ (approximativement 10mg/kg /jour) pour le carvacrol et $4 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ (approximativement 20 mg/ Kg / jour) pour l'eugénol. La nystatine est utilisée à 10 x CMI (54,45 µg/ml: Approximativement 272 µg/ kg/ jour). Pour qu'il n y ait pas de risque d'écoulement des agents antifongiques de la cavité vaginale, les agents antifongiques sont mis en suspension dans une solution visqueuse d'agar à 0,8 % utilisée en tant qu'excipient.

6. Traitement prophylactique

Avant l'infection, les rates sont réparties en 6 groupes:

Groupe P1:(n=9) les animaux infectés mais non traités (témoin positifs), reçoivent 500µl de suspension d'agar à 0,8 % (sans aucun agent antifongique) 2 fois par jour.

Groupes P2, P3, P4 (n=9 dans chaque groupe). Ces trois groupes d'animaux infectés reçoivent un traitement prophylactique par voie intravaginale à l'aide d'un cône de pipette à une dose de 500 µl d'une suspension de carvacrol, d'eugénol ou de nystatine. Ce traitement commence 2 jours avant l'inoculation et se poursuit 3 jours après (Figure 10a), à raison de deux fois par jour.

Groupe5: (n=9) animaux infectés mais non immunodéprimés. Ce groupe a été utilisé afin d'étudier l'impact de l'immunosuppression sur le développement de l'infection. Ces animaux reçoivent 500µl d'agar à 0,8%.

Groupe 6: (n=9) ce groupe d'animaux, non infectés recevant 500 µl d'agar à 0,8% constitue le groupe des témoins négatifs.

Ces deux derniers groupes d'animaux ont été utilisés également pour l'évaluation du traitement thérapeutique.

7. Traitement thérapeutique

Avant l'inoculation, 36 animaux sont séparés au hasard en 4 groupes appelés groupe T

Groupe T1: (n=9). Les animaux infectés mais non traités reçoivent 500µl de suspension d'agar à 0,8% sans aucun agent antifongique par voie intravaginale à raison de deux fois par jour.

Groupes T2, T3, T4 (n=9 dans chaque groupe). Ces trois groupes reçoivent un traitement thérapeutique de 500µl de suspension de carvacrol, d'eugénol ou de nystatine par voie intravaginale. Le traitement commence 72h après l'inoculation et se poursuit seulement 7 jours à raison de 2 fois par jour (Figure 10b). Comme pour le traitement prophylactique, 500µl de carvacrol ou d'eugénol à une dose double de la CMI sont données respectivement à une concentration finale de 2×10^3 µg/ml (approximativement 10 mg/kg /jour) pour le carvacrol et 4×10^3 µg/ml (approximativement 20 mg/ Kg / jour) pour l'eugénol. 500µl de nystatine sont donnés à 10 x CMI (54,45µg/ml: Approximativement 272µg/ kg/jour).

Groupe5: animaux infectés mais non immunodéprimés. Ce groupe, qui a été utilisé pour étudier l'impact de l'immunosuppression sur le développement de l'infection, ne reçoit aucun agent antifongique.

Groupe 6: ce groupe d'animaux, non infectés et ne recevant pas d'agents antifongiques, constitue le groupe des témoins négatifs.

8. Quantification du degré d'infection et détermination de l'efficacité du traitement prophylactique.

Cette quantification est effectuée par une méthode microbiologique et une méthode histologique.

8. 1. Microbiologie

Durant le traitement prophylactique, trois prélèvements vaginaux permettent l'évaluation de la charge fongique vaginale: trois jours avant l'inoculation, trois jours après, et sept jours après l'arrêt du traitement et ceci dans le but de suivre l'évolution de l'infection (Figure 10a).

8. 2. Histologie

Sept jours après l'administration de la dernière dose de l'agent antifongique (carvacrol, eugénol ou nystatine), ou de l'agar, les rates sont sacrifiées par une overdose d'uréthane à 12%. Les vagins sont prélevés et coupés longitudinalement puis fixés *in toto* par immersion dans une solution de Bouin pendant au moins 48 h. Ensuite les échantillons sont déshydratés puis inclus dans de la paraffine. Des coupes transversales sériées de 5µm sont réalisées et préparées pour une coloration à l'hématoxyline- éosine et une coloration histochimique au PAS (Periodic Acid Schiff) spécifique pour la visualisation fongique (annexe: technique histologique) (Martoja et Martoja-Pierson, 1967). Les coupes et les colorations ont été réalisées au laboratoire d'histologie et d'embryologie moléculaire à la faculté de médecine Lyon I, France

9. Détermination de l'efficacité du traitement thérapeutique

Comme pour le traitement prophylactique, la quantification du degré d'infection et la détermination de l'efficacité du traitement thérapeutique sont effectuées par une méthode microbiologique et une méthode histologique

9.1 Microbiologie.

Durant ce traitement thérapeutique, l'évaluation de la charge fongique vaginale est faite par des prélèvements vaginaux, 3 jours avant l'inoculation pour s'assurer que les animaux ne sont pas infectés, 3 jours après pour s'assurer de l'installation de l'infection, puis à 10 jours c'est à dire après sept jours de traitement. (Figure 10b)

9.2. Histologie

24 heures après la fin du traitement thérapeutique au carvacrol, à l'eugénol, ou à la nystatine, les animaux sont sacrifiés par une overdose d'uréthane à 12 %. Les vagins des différents groupes d'animaux sont préparés pour l'étude histologique comme décrit ci-dessus.

10. Test statistique

Différentes comparaisons sont faites pour la significativité des résultats aux jours 3 et 10 pour les Log d'UFC des animaux témoins en comparaison avec les animaux traités en utilisant le test t de Student.

Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives (Schwartz, 1984)

III. Résultats

1. Valeurs de la CMI et de la CMF du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine en fonction de la taille de l'inoculum

Le tableau IV montre les valeurs des CMI et des CMF pour le carvacrol, l'eugénol et la nystatine *in vitro* sur *C. albicans* en utilisant 2 tailles différentes de l'inoculum en milieu liquide selon la méthode décrite par Remmal et coll. (1993 a)

Taille de l'inoculum (UFC/ ml)	10^3 - 10^4			10^5 - 10^7	
	CMI %	CMF %		CMI %	CMF %
Carvacrol	0,05	0,05		0,1	0,1
Eugénol	0,05	0,05		0,2	0,2
Nystatine	1UI	1UI		5UI	5UI

Tableau IV: Valeurs de CMI et CMF de l'eugénol, du carvacrol et de la nystatine sur *C. albicans* en milieu liquide avec différentes tailles de l'inoculum

2. Valeurs de la CMI et de la CMF du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine *in vitro* sur *C. albicans*

Le tableau V montre les valeurs des CMI et des CMF *in vitro* sur *C. albicans* en milieu liquide avec la taille de l'inoculum 10^6 UFC.

	CMI %	CMF %
Carvacrol	0,1 ($10^3 \mu\text{g/ml}$)	0,1 ($10^3 \mu\text{g/ml}$)
Eugénol	0,2 ($2 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$)	0,2 ($2 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$)
Nystatine	5UI (5,44 $\mu\text{g/ml}$)	5UI (5,44 $\mu\text{g/ml}$)

Tableau V: Valeurs des CMI et des CMF du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage (v/v) et en mg/l pour le carvacrol et l'eugénol ou en unités internationales/ml et en mg/l pour la nystatine

Les concentrations utilisées pour le traitement des animaux sont 2x CMI pour le carvacrol et l'eugénol. La nystatine utilisée à 10 x CMI sert de traitement de référence.

3. Résultats microbiologiques et histologiques du traitement prophylactique

Microbiologie

Les résultats du prélèvement vaginal avant tout traitement n'ont décelé aucune présence de *C.albicans* chez les différents groupes d'animaux. Après cinq jours de traitement prophylactique, l'évaluation de la charge fongique vaginale de tous les animaux est refaite. Pour le groupe des témoins positifs (P1), toutes les cultures sont positives avec une valeur moyenne du Log des UFC de $4,66 \pm 0,21$ (Tableau VI). Concernant le groupe P2 des animaux traités au carvacrol, 44,4% des rates seulement sont restées infectées avec une valeur moyenne de Log d'UFC ($3,45 \pm 0,30$), significativement plus faible que celles des témoins positifs (P1). Pour le groupe d'animaux traités à l'eugénol, les animaux sont restés infectés au même degré que celui des témoins positifs ($4,48 \pm 0,58$). Le traitement à la nystatine a permis l'épuration rapide de l'infection vaginale et la charge vaginale fongique du seul animal encore infecté est significativement inférieure (log UFC=2,74) à celle des témoins positifs.

Après le traitement prophylactique, les animaux sont restés sous observation pendant une semaine dans le but de voir l'évolution de l'infection, ensuite, des prélèvements vaginaux ont été faits sur tous les lots d'animaux. Le pourcentage d'animaux infectés non traités est toujours de 100% avec la même charge fongique que le jour 3 (tableau VI) alors que 100% des animaux traités au carvacrol sont entièrement guéris. Les animaux traités à l'eugénol montrent que seulement 22,3% de ce lot d'animaux sont guéris alors que 77,7% des animaux restants présentent une charge fongique significativement plus faible que celle des témoins positifs ($2,66 \pm 0,15$). Autrement dit, le pourcentage de réduction des UFC comparé aux témoins positifs est très important (98,99%). Pour le groupe des animaux non immunodéprimés, 11,11% des animaux sont restés infectés.

	Jour 3			Jour 10		
	<u>Animaux infectés (%)</u>	<u>Log UFC ± SEM</u>	<u>Pourcentage de réduction des UFC/témoin</u>	<u>Animaux infectés (%)</u>	<u>Log UFC ± SEM</u>	<u>Pourcentage de réduction des UFC/témoin</u>
témoin (P1)	9/9 (100)	4,66 ± 0,21	na	9/9 (100)	4,56 ± 0,27	na
Carvacrol (P2)	4/9 (44,4)	3,45 ± 0,30*	95, 16	0/9 (0)	0	100
Eugénol (P3)	9/9 (100)	4,48 ± 0,58	17,56	7/9 (77,7)	2,66 ± 0,15*	98,89
Nystatine (P4)	1/9 (11,1)	2,74*	99,22	0/9 (0)	0	100
Group 5 # (NID)	5/9 (55,55)	4,30 ± 0,98	35,22	1/9 (11,11)	4,52	na

Tableau VI. Résultats Microbiologiques du traitement prophylactique par le carvacrol et l' eugénol/ à la nystatine contre la candidose vaginale chez la rate.

Les rates sont inoculées par voie intravaginale avec 10^7 cellules de *C. albicans* (1E111PV515); les agents antifongiques sont administrés 2 fois par jour pendant 5 jours consécutifs débutant 2 jours avant l'inoculation et se prolongeant 3 jours après.

$P < 0,05$ comparées aux témoins de traitement (P1),

Groupe 6: Les animaux immunodéprimés non infectés et non traités (n=9) ont une charge fongique nulle tout au long de l'expérimentation.

Groupe 5: Animaux non immunodéprimés, infectés mais non traités. na: non applicable,

Histologie

Une semaine après la fin du traitement prophylactique, tous les groupes d'animaux ont été sacrifiés et un examen histologique de leurs vagins a été effectué afin de détecter la présence éventuelle de *C. albicans* par la coloration au PAS. Chez des groupes d'animaux infectés non traités (témoins positifs), la photo6 montre une présence importante de cellules de *C. albicans* aussi bien sous forme de blastoconidies que de pseudo hyphes qui apparaissent rouge foncé avec la coloration PAS dans la lumière du vagin. A noter également la présence de débris de kératine à la surface de l'épithélium. Concernant le groupe d'animaux non infectés, aucune forme de cette levure n'est détectée dans la lumière vaginale (photo7) alors que pour les animaux traités par le carvacrol et l'eugénol (photo8 et 9), on note une absence totale de *Candida* dans la lumière du vagin.

Concernant les animaux non immunodéprimés, la plupart des animaux montrent une absence totale de *C. albicans* dans la lumière vaginale au jour 10 (Photo 10). Le vagin des animaux traités par la nystatine présente le même aspect que celui des animaux non infectés (Photo11).

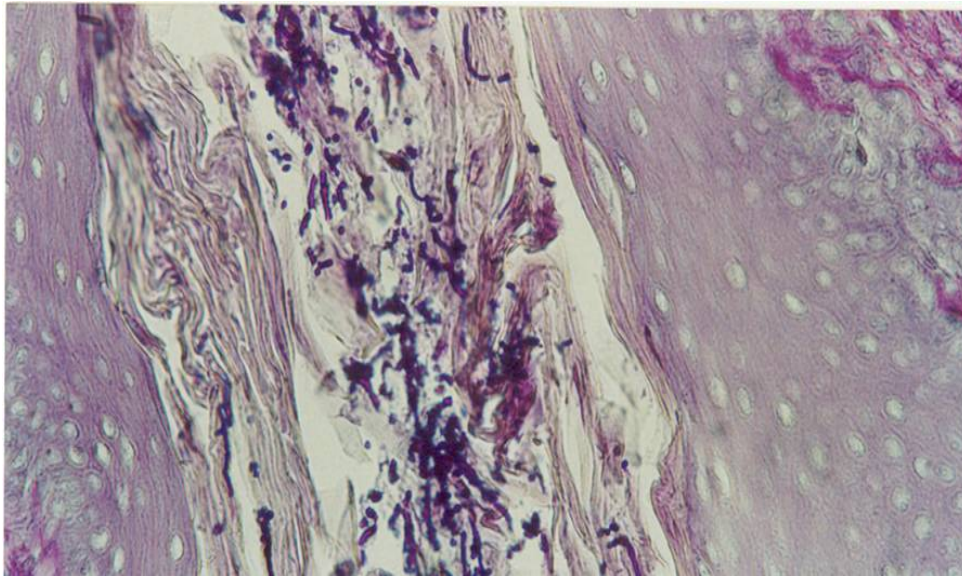


Photo 6: Candidose vaginale chez des rates immunodéprimées infectées non traitées
Présence de pseudohyphes et de blastoconidies dans la lumière vaginale avec la présence de débris de kératine (Groupe P1)
Coupe longitudinale du vagin de rate. Coloration PAS, grossissement x 250.

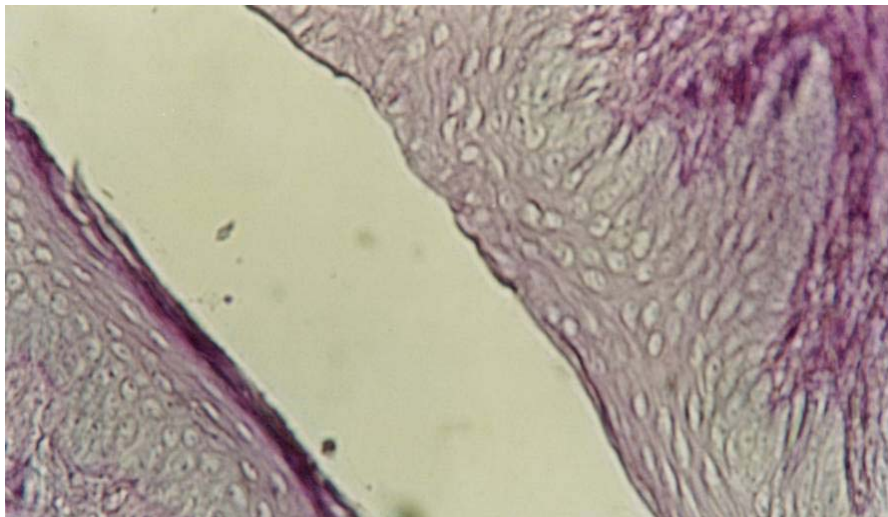


Photo 7: Coupe longitudinale du vagin d'une rate immunodéprimée non infectée et non traitée.
Absence totale de *C. albicans* dans la lumière vaginale
Coloration PAS. Grossissement X 250

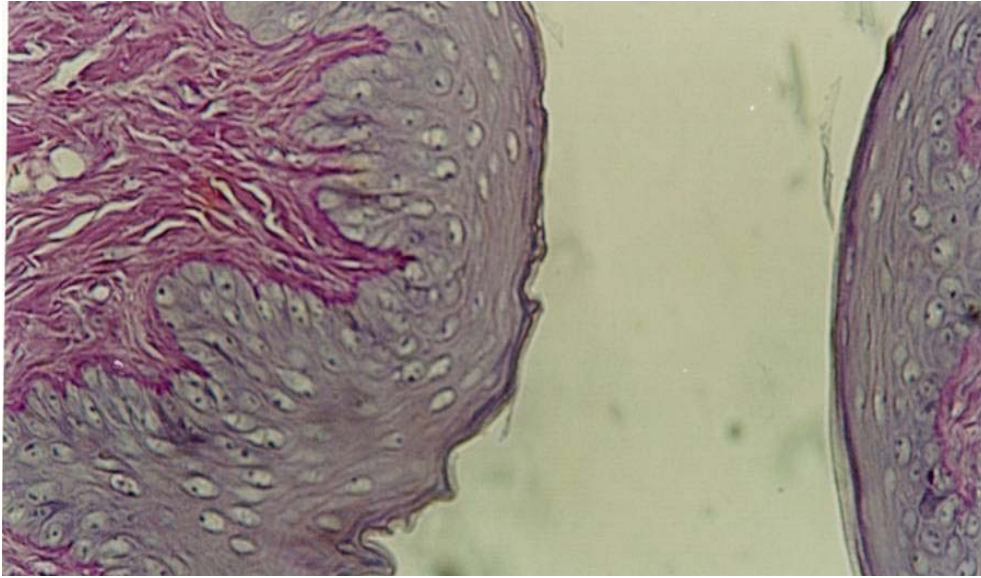


Photo 8: Coupe longitudinale du vagin d'une rate immunodéprimée traitée par le carvacrol (500μl) deux fois par jour pendant cinq jours consécutifs (group P2). Absence d'hyphes dans la lumière vaginale. Coloration PAS, grossissement x 250.

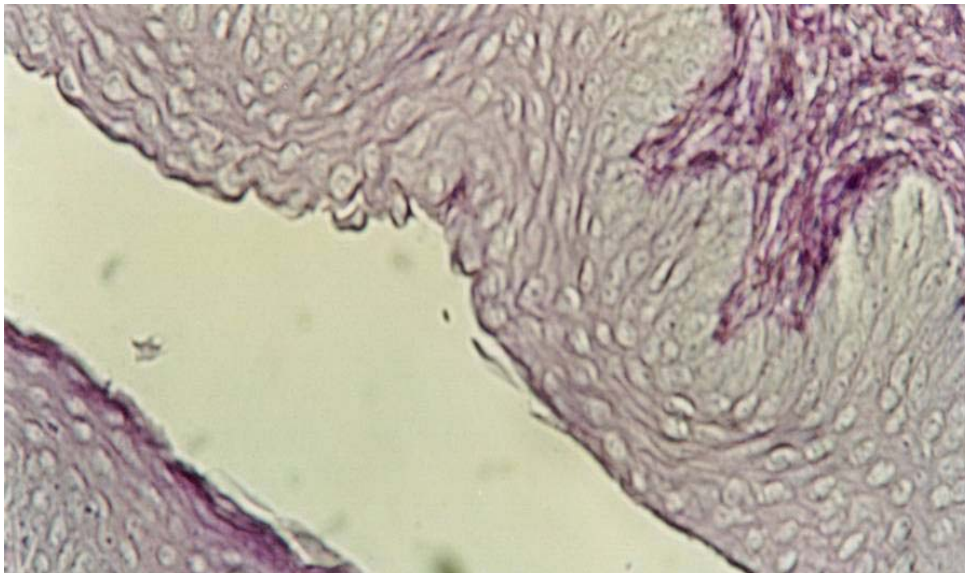


Photo 9: Coupe longitudinale du vagin d'une rate immunodéprimée traitée par l'eugénol (500μl) deux fois par jour pendant cinq jours consécutifs (groupP3). Absence totale de *C.albicans* dans la lumière vaginale. Coloration PAS, grossissement x 250.

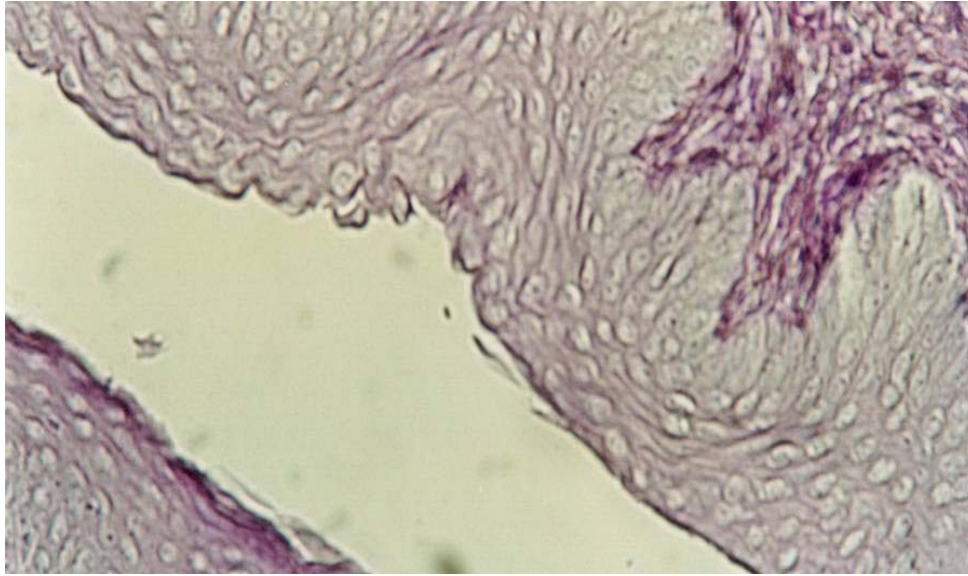


Photo 10: Coupe longitudinale du vagin d'une rate non immunodéprimée infectée mais non traitée (Groupe NID)
Absence de *C.albicans* dans la lumière vaginale. Coloration PAS, Grossissement

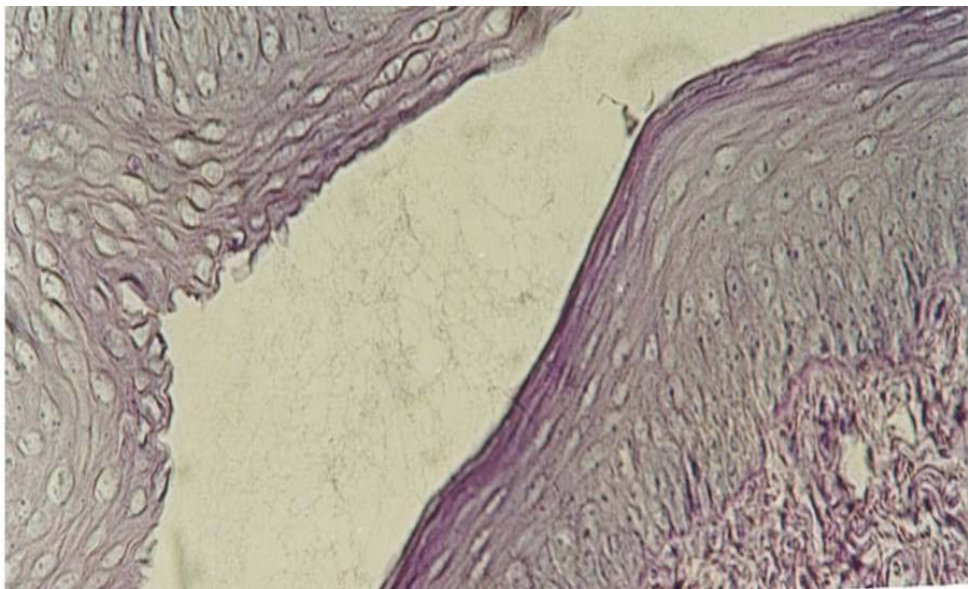


Photo 11: Coupe longitudinale du vagin d'une rate immunodéprimée traitée par la nystatine (500µl) deux fois par jour pendant cinq jours consécutifs (group P4).
Absence de *C.albicans* dans la lumière vaginale. Coloration PAS.
Grossissement x 250.

4. Résultats microbiologiques et histologiques après le traitement thérapeutique

Microbiologie

Avant l'inoculation des animaux, l'examen microbiologique de la cavité vaginale a montré l'absence totale de *C. albicans* pour les différents groupes d'animaux. Trois jours après inoculation, et dans le but de vérifier l'installation de l'infection, un deuxième prélèvement vaginal de tous les lots d'animaux a montré que, pour tous les groupes d'animaux, la charge fongique vaginale est positive et sensiblement la même pour tous les animaux tableau 4. Après sept jours consécutifs de traitement thérapeutique (J 10), la charge fongique est toujours la même pour le groupe des témoins positifs, alors que pour les animaux traités par le carvacrol, 7/9 sont totalement guéris, les deux autres restants montrent une faible charge fongique dont la valeur moyenne en log décimal des UFC est significativement plus faible que celle des animaux traités par l'agar seul. En ce qui concerne le traitement à l'eugénol, après sept jours de traitement, 2/9 seulement des animaux sont complètement guéris. Cependant, les 7/9 restants présentent un pourcentage de réduction de 84,83% des UFC par rapport aux témoins

Le traitement thérapeutique par la nystatine a été efficace puisque une rate seulement sur 9 est restée infectée.

	<u>Jour 3</u>		<u>Jour 10</u>		
	<u>Animaux infectés (%)</u>	<u>Log UFC ± SEM</u>	<u>Animaux infectés (%)</u>	<u>Log UFC ± SEM</u>	<u>Pourcentage de réduction des UFC/témoin</u>
témoin (T1)	9/9 (100)	4,66 ± 0,21	9/9 (100)	4,40 ± 0,39	na
Carvacrol (T2)	9/9 (100)	4,62 ± 0,43	2/9 (22,22)	2,78 ± 0,25*	98,13
Eugénol (T3)	9/9 (100)	4,44 ± 0,50	7/9 (77,77)	3,73 ± 0,80*	84,83
Nystatine (T4)	9/9 (100)	3,85 ± 0,45	1/9 (11,11)	2,50*	98,87
Group 5 # (NID)	5/9 (55,55)	4,30 ± 0,98	1/9 (11,11)	4,52	na

Tableau VII. Résultats Microbiologiques du traitement thérapeutique par le carvacrol et l' eugénol / à la nystatine contre la candidose vaginale chez la rate

Les rates sont inoculées par voie intravaginale avec 10^7 cellules de *C. albicans* (1E111PV515); les agents antifongiques sont administrés 2 fois par jour pendant 7 jours consécutifs débutant 3 jours après l'inoculation et se prolongeant jusqu'à J10 jours.

$P < 0,05$ comparées aux témoins de traitement (T1).

Groupe 6: Les animaux immunodéprimés non infectés et non traités (n=9) ont une charge fongique nulle tout au long de l'expérience.

Groupe 5: Animaux non immunodéprimés, infectés mais non traités. na: non applicable

Histologie

Les études histologiques sur les coupes de vagins de tous les groupes d'animaux sont observées au microscope. Les rats infectés non traités montrent la présence de *C. albicans* aussi bien au stade de blastoconidies qu'au stade mycelien à la surface de l'épithélium vaginal avec une desquamation des couches superficielles (photo6) alors que chez le groupe des témoins négatifs, non infectés et non traités, l'absence de *C. albicans* dans la lumière vaginale est totale (photo7). Le traitement au carvacrol a complètement éradiqué *C. albicans* de la cavité vaginale (photo8). Le traitement à l'eugénol a réduit significativement la charge fongique vaginale si bien que *C. albicans* est indétectable sur les coupes histologiques (photo9). Sur le plan histologique, l'épithélium vaginal des rats infectés traités au carvacrol ou à l'eugénol ne montre aucune différence avec le groupe des témoins négatifs (photo7).

N. B: puisque l'aspect des vagins traités thérapeutiquement au carvacrol ou à l'eugénol est le même que celui des rates traitées à titre préventif, nous avons jugé inutile de fournir des photos qui présentent le même aspect. Nous avons donc utilisé les mêmes photos pour les deux types de traitements.

VI. Discussion

Action antifongique des HE

Plusieurs études *in vitro* ont montré que les composés majoritaires phénoliques des huiles essentielles ont une action antimicrobienne assez importante (Viollon et Chaumont, 1994; Cosentino et coll., 1999). L'activité anticandidosique de l'HE d'origan a été bien mise en évidence (Manohar et coll., 2001; Salgueiro et coll., 2003). Selon ces auteurs, cette activité serait due à son composé majoritaire phénolique, le carvacrol qui a une puissante action anticandidosique, ces auteurs ont montré que la formation du tube germinatif de *C. albicans* est inhibée par l'HE d'origan et le carvacrol, *in vitro*. De même, les travaux de Bonchird et Flegel, (1982) ont montré l'activité anticandidosique de l'eugénol *in vitro*

La détermination de la CMI et de la CMF du carvacrol et de l'eugénol a montré qu'il existait une influence de la taille de l'inoculum sur les valeurs de CMI et de CMF. Ce phénomène est connu aussi chez les bactéries (Courvalin et coll., 1991; Remmal et coll., 1993a ; Lambert et coll., 2001). Les faibles valeurs de CMI et de CMF obtenues *in vitro* 0,1% et 0,2% respectivement pour le carvacrol et l'eugénol sont similaires à celles obtenues avec les mêmes composés sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (Remmal et coll., 1993a et b; Rhayour et coll., 2003). En général, une substance peut être considérée comme un bon agent antimicrobien *in vivo* lorsqu'elle agit à de faibles concentrations *in vitro* car il y a un risque de confrontation aux problèmes de toxicité *in vivo*. Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* nous ont encouragés à tester l'activité des substances étudiées *in vivo*.

Choix du modèle expérimental

Afin de choisir un modèle expérimental pour tester l'action du carvacrol et de l'eugénol, il a fallu choisir une infection localisée, non létale, assez fréquente, et qui soit déjà utilisée pour tester l'action d'un agent antifongique. Ainsi, nous avons choisi ce modèle de candidose vaginale expérimentale chez le rat immunodéprimé. Ce modèle s'est avéré simple et

reproductible pour étudier l'effet de la majorité des agents antifongiques actuellement utilisés pour les traitements médicaux (Meingassner et coll., 1975; Mac Ripley et coll., 1979). Dans ce modèle, le rôle de l'environnement hormonal est essentiel car la présence des œstrogènes est un facteur nécessaire dans la persistance de la vaginite expérimentale (Fidel et coll., 2000; De Tourris et coll., 1997). En effet Fidel et coll. (2000) et Nomanhboy et coll. (2002) ont montré que les œstrogènes lèvent l'inhibition exercée par les cellules épithéliales sur *C.albicans* de la muqueuse vaginale. Afin d'exclure l'effet des fluctuations hormonales ovariennes endogènes, les rates ont été ovariectomisées avant l'administration des œstrogènes nécessaires et suffisants pour créer et maintenir l'infection (Sobel et Muller, 1985).

Dans le présent travail, nous avons induit la vaginite expérimentale chez des rates immunodéprimées par la dexaméthasone. Celle-ci permet d'affaiblir la défense immunitaire en faisant baisser le taux des cellules T (CD4+), ce qui permet à *Candida* de proliférer et de passer de la forme commensale à la forme pathogène (DeBernadis et coll., 1999). Le traitement à la dexaméthasone est associé à un traitement à la tétracycline. Cet antibiotique à large spectre détruit les lactobacilles de l'environnement vaginal, ce qui a pour conséquence le changement de pH favorisant ainsi la prolifération de *C. albicans* (Spinillo et coll., 1999). L'utilisation de cet antibiotique dans ce but est connue avec d'autres modèles pour l'induction de candidoses superficielles cutaneomuqueuses au niveau oral (Jones et Russel, 1976; Samaranayake et Samaranayake, 2001)

Dans ce modèle, l'activité antifongique du carvacrol et de l'eugénol est comparée à celle de la nystatine utilisée comme traitement de référence. Des tests microbiologiques et histologiques ont été utilisés pour évaluer cette activité. A notre connaissance, ce travail constitue une première tentative pour étudier le rôle du carvacrol et de l'eugénol dans le traitement de la vaginite expérimentale.

Choix de la forme galénique du traitement

Le traitement local représente un choix rationnel dans ce type d'infection localisée, le traitement par voie orale ou générale risque d'induire des effets secondaires. En effet, les travaux de recherche en pharmacologie sont de plus en plus focalisés sur l'amélioration du traitement local des infections vaginales pour permettre un contact plus prolongé avec la muqueuse vaginale sans risquer de se confronter aux effets secondaires éventuels au niveau des autres tissus.

Puisque le traitement par une solution liquide peut être rapidement éliminé à cause des sécrétions physiologiques vaginales, nous avons choisi d'homogénéiser nos composés phénoliques dans une suspension gélatineuse à 0,8% d'agar utilisée comme excipient pour permettre une meilleure adhésion du carvacrol ou de l'eugénol sur la muqueuse vaginale, ce qui permet de prolonger au maximum le contact du produit au site d'administration, et par conséquent, une meilleure absorption par les tissus sous-jacents (Duchene et coll., 1988).

Intérêt de l'immunosuppression

Les résultats microbiologiques et histologiques que nous avons obtenus montrent pour le groupe des témoins positifs (animaux immunodéprimés, infectés, mais non traités) que les rates restent infectées tout au long de l'expérimentation alors que les rates non immunodéprimés, infectées et non traitées guérissent spontanément au bout de dix jours.

Ce résultat montre que l'infection des animaux a réussi et que, dans ces conditions expérimentales, l'immunosuppression est nécessaire pour réussir ce modèle de candidose vaginale chez le rat. Cette observation est concordante avec les résultats obtenus par Martinez et coll. (2001).

Choix des concentrations des agents antifongiques

Le choix de la concentration de l'agent antifongique pour le traitement *in vivo* est basé sur le principe suivant: pour le carvacrol et l'eugénol, nous avons utilisé une concentration double de

la CMI obtenue *in vitro* en tenant compte du fait que, dans l'environnement vaginal, d'une part, les germes sont incrustés dans les tissus et dans les sécrétions vaginales, d'autre part, l'agent antifongique, carvacrol ou eugénol déposé dans le vagin risque d'être rapidement éliminé par le système naturel d'épuration des épithéliums, d'où l'intérêt de traiter avec une dose plus forte que la CMI pour obtenir le maximum d'effet antifongique pendant la courte durée de biodisponibilité des agents antifongiques dans la sphère vulvo-vaginale.

Pour la nystatine, nous avons choisi une concentration 10 x la CMI pour s'assurer de l'obtention de l'effet antifongique, car dans notre contexte, la nystatine sert d'indicateur de la validité de nos conditions de travail dans la reproduction du modèle de traitement de la vaginite expérimentale.

Justification du traitement

Dans beaucoup de cas, la candidose vaginale est une infection prévisible; d'où l'intérêt d'essayer un nouvel agent antifongique qui soit utilisé en prophylaxie. Richardson et coll. (1985) et Sobel et Muller (1984b) ont démontré les effets respectifs d'un dérivé de triazoles (UK-49,858) et du kétoconazole en traitement prophylactique, de la vaginite expérimentale, nous avons adopté leur modèle afin de tester l'efficacité du carvacrol et de l'eugénol en traitement prophylactique. Chez le groupe des témoins positifs, infectés non traités, le résultat microbiologique montre que ces animaux sont restés infectés durant toute la durée de l'expérimentation, la valeur moyenne du Log d'UFC est similaire à celle obtenue par d'autres auteurs ayant utilisé la même taille de l'inoculum (Richardson et coll., 1985; De Bernadis et coll., 1997). Avec le traitement prophylactique au carvacrol, les animaux sont restés infectés avec une valeur moyenne du Log d'UFC inférieure d'une unité logarithmique par rapport à la moyenne du groupe des témoins positifs ce qui représente une réduction des UFC de 95,16%. L'observation, sept jours après l'arrêt du traitement, des prélèvements vaginaux pour ce même groupe montre que ces derniers ne sont plus infectés alors que, pour le groupe des témoins

positifs, l'infection est maintenue à 100%. Ceci confirme la réussite du traitement prophylactique, avec un délai. Les observations histologiques sont en accord avec les résultats microbiologiques puisque, sur des coupes vaginales des animaux traités par le carvacrol, *C. albicans* est non détectable.

Le traitement prophylactique à l'eugénol semble être moins efficace que celui au carvacrol car, juste après l'arrêt du traitement, les UFC des animaux n'ont pas été significativement différents du témoin. Néanmoins, pour ce composé, sept jours après l'interruption du traitement, 2/9 des animaux sont complètement guéris, la charge fongique vaginale chez les sept animaux restants est significativement plus faible que celle des animaux infectés non traités, le pourcentage de réduction étant de 98,89%. Sur les coupes du vagin, *Candida* n'était pas détectable.

A partir de ces résultats, on peut déduire que le carvacrol et l'eugénol peuvent être considérés comme des substances efficaces dans le traitement préventif de la candidose vaginale, d'autant plus que ce sont des substances naturelles, non toxiques aux doses utilisées et déjà présentes dans la pharmacopée sous différentes formes.

Si le carvacrol et l'eugénol peuvent être utilisés en traitement préventif, on peut se demander si dans des conditions où l'infection est déjà installée, le carvacrol ou l'eugénol pourraient ils arrêter l'infection et induire la guérison. D'où l'intérêt de bâtir un autre protocole expérimental afin de tester l'action thérapeutique de ces deux molécules. Ainsi, nous avons d'abord induit l'infection du vagin sans aucun traitement préalable, puis, nous nous sommes assuré au bout de 72 heures que l'infection était bien installée pour tous les animaux avant de commencer le traitement thérapeutique.

Le traitement thérapeutique de la candidose vaginale par le carvacrol pendant sept jours consécutifs provoque une disparition de la charge fongique pour la plupart des rates infectées. Ces résultats microbiologiques sont confirmés par les observations histologiques. Les deux animaux qui sont restés infectés montrent un pourcentage de réduction en Log d'UFC ($2,78 \pm$

0,25) significativement plus faible que celui des témoins positifs. Les observations histologiques confirment les résultats microbiologiques puisque les sections vaginales montrent une absence totale du *Candida* au niveau de la lumière vaginale. Le carvacrol est plus efficace que l'eugénol dans le traitement de la candidose vaginale puisque la majorité des animaux traités à l'eugénol sont restés infectés même si elles montrent une charge fongique significativement plus faible que la moyenne des témoins positifs.

Les travaux de Suresh et coll. (1997) sur l'effet antifongique de l'HE de *Santolina chamaecyparissus* dans le cas de la candidose vaginale expérimentale, ainsi que ceux de Mondello et coll. (2003) ont également montré que l'HE de l'arbre à thé est capable d'éradiquer la candidose vaginale expérimentale chez la rate. Cependant, la dose d'HE utilisée par ces auteurs reste trop forte (5%). Barnes (1989) et Blackwell. (1991) ont aussi mis au point un traitement antifongique topique à base de l'HE de l'arbre à thé contre la candidose vaginale chez la femme. Dans tous les cas cités, ces auteurs ont utilisé l'HE entière, ce qui, à notre avis, ne permet pas l'évaluation de son principe actif à cause de la complexité de ses composés. L'intérêt de ce travail est de démontrer l'effet anticandidosique des composés majoritaires purifiés de l'HE d'origan et de girofle *in vivo*.

Les doses journalières de carvacrol et d'eugénol utilisées dans les deux types de traitement, aussi bien prophylactique que thérapeutique, sont tellement faibles (0,2% et 0,4%) qu'aucun effet toxique n'a été observé au niveau de la muqueuse vaginale. De plus, ces composés naturels sont déjà utilisés depuis longtemps en pharmacie et en aromathérapie sans effets secondaires ou toxicité notable. Une autre propriété avantageuse pour ces molécules est leur volatilité, qui leur permet d'atteindre des régions inaccessibles, ce qui n'est pas le cas pour les autres composés antifongiques utilisés dans ce type d'infections (Chami et coll., 2004)

Ce travail montre que ces agents antifongiques naturels, le carvacrol et l'eugénol, pourraient être des molécules prometteuses pour le traitement et la prévention de la candidose vaginale, particulièrement dans le traitement préventif chez les patients atteints du SIDA.

V. Conclusion

L'activité antifongique *in vitro* des HE a fait l'objet de nombreuses études utilisant différentes HE et différentes familles de champignons. Les quelques travaux cités dans la littérature se sont consacrés à la mise en évidence *in vivo* de l'activité des huiles essentielles entières. L'objectif de notre travail était, dans un premier temps, de mettre en évidence l'activité anticandidosique *in vitro* de ces composés majoritaires purs d'HE d'origan et de girofle. Avec la méthode mise au point dans notre laboratoire, nous avons évité d'utiliser les détergents ou les solvants comme agents de dispersion car il s'est avéré que ces derniers inhibent cette activité antimicrobienne (Remmal et coll., 1993a et b). Plus tard, d'autres auteurs ont confirmé cet effet inhibiteur des détergents et des solvants (Hili et coll., 1997; Inouye et coll., 2001a)

Dans une première partie de ce travail, l'utilisation du carvacrol et de l'eugénol en traitement prophylactique chez la rate immunodéprimée a montré que, sur le plan microbiologique, le carvacrol est capable d'éradiquer la charge fongique vaginale des rates infectées et que l'eugénol réduit le nombre d'UFC dans les vagins des rates dix jours après l'inoculation. Le carvacrol paraît donc être plus efficace que l'eugénol en traitement prophylactique de la vaginite expérimentale, mais les deux composés semblent avoir un effet retard. Les résultats satisfaisants que nous avons obtenus pour la prophylaxie nous ont poussé à tester leur effet en traitement thérapeutique. En effet, dans la deuxième partie de ce travail, le carvacrol et l'eugénol ont été utilisés pour traiter l'infection vaginale pendant sept jours consécutifs et les résultats microbiologiques ont montré que le carvacrol est toujours capable d'éradiquer la maladie dans la plupart des cas. Le traitement à l'eugénol entraîne également une baisse significative de la charge fongique vaginale.

Pour les deux types de traitement, les résultats microbiologiques sont concordants avec les études histologiques puisque les observations au microscope sur des coupes de vagin montrent une abondance de *C. albicans* sous ses différentes formes dans la lumière vaginale chez des

animaux infectés mais non traités alors que pour les différents groupes traités au carvacrol ou à l'eugénol, *C. albicans* était indétectable.

Dans ce modèle expérimental, l'immunosuppression constitue un facteur favorable pour l'établissement de l'infection puisque les animaux infectés et immunodéprimés continuent d'être infectés tout au long de l'expérimentation, alors que chez les rates infectées mais non immunodéprimées, la guérison était spontanée. Les résultats du traitement aussi bien prophylactique que thérapeutique par la nystatine utilisée comme témoin de référence confirment la validité de ce modèle expérimental.

Les résultats de ce travail montrent que le carvacrol et l'eugénol pourraient constituer une nouvelle classe d'agents antifongiques possibles pour le traitement et la prévention d'infections superficielles provoquées par *C. albicans* chez les patients immunodéprimés et particulièrement ceux atteints du SIDA. Ces résultats pourraient être exploités aussi dans le traitement d'autres formes de candidoses superficielles et même dans le traitement des infections plus profondes telles que les candidoses systémiques. Et puisque ces composés majoritaires possèdent un plus large spectre d'action contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Rhayour et coll., 2003; Remmal et coll., 1993a et b) il serait intéressant d'explorer leurs effet sur d'autres manifestations pathologiques humaines. Cette évaluation de l'action antifongique du carvacrol et de l'eugénol est considérée comme un test préclinique très prometteur, Pour cela, nous avons jugé nécessaire de tester ces mêmes molécules sur une autre espèce mammifère, la souris.

Troisième partie

Evaluation de l'activité du carvacrol et de l'eugénol dans le traitement de la candidose vaginale chez la souris immunodéprimée

I. Introduction

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons montré que le carvacrol et l'eugénol sont efficaces, dans le traitement de la candidose vaginale expérimentale chez le rate (Chami et coll., 2004). Le but du présent chapitre est de tester l'efficacité de ces deux molécules dans le traitement de la candidose vaginale chez une deuxième espèce mammifère, la souris. Pour cela, nous avons adopté le modèle expérimental de candidose vaginale œstrogène dépendant provoquée chez la souris (Fidel et coll., 1993). Cette activité anticandidosique du carvacrol et de l'eugénol a été évaluée en utilisant un traitement thérapeutique chez la souris inoculée par voie intravaginale. Ce traitement a été comparé au traitement par la nystatine (témoin de traitement).

II. Matériel et méthodes

1. Animaux

1. 1. Conditions d'élevage

40 souris albinos de souche Swiss en provenance de l'élevage Déprés (Saint Doulchard France) âgées de 10 à 12 semaines et dont le poids variait entre 30 et 35g ont été utilisés. Les animaux ont été répartis par groupes de 4 dans des cages (480 x 270 x 200mm) et la photopériode est réglée à 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La température environnante de l'animalerie est maintenue entre 21°C et 24°C et l'alimentation se compose de comprimés fabriqués industriellement pour l'élevage des rongeurs et d'eau fournie *ad libitum* (annexe).

1.2 Préparation des animaux au pseudo œstrus

Puisque la vaginite chez les rongeurs n'est induite que dans des conditions de pseudoœstrus (Ryley and McGregor 1986), nous avons adopté le modèle expérimental de la candidose vaginale œstrogène dépendant (Fidel et coll., 1997). Toutes les souris sont maintenues en pseudoœstrus par une injection sous cutanée de 0,4 mg de benzoate d'œstradiol par animal (Intervet) deux jours avant l'inoculation, puis une fois par semaine après l'inoculation.

(Figure 6)

1.3. Immunosuppression des animaux

Sachant que la candidose vaginale, comme toutes les candidoses superficielles est fréquente chez les patients à système immunitaire défaillant. (Sobel et coll., 1998; Yamaguchi 1998), nous avons jugé important de travailler avec des souris immunodéprimées. Les animaux sont rendus immunodéprimés par une injection sous cutanée de 1mg/kg de dexaméthasone (Azium. Schering-Plough, vétérinaire). 24 h avant, 24h après puis trois jours après l'inoculation associée à la tétracycline en solution dans l'eau de boisson à la dose de 0,5g/l. Le traitement à la tétracycline commence 24 h avant l'infection et se poursuit jusqu'à la fin de l'expérimentation.

(Figure 11) L'utilisation de cette association est connue avec d'autres modèles pour l'induction de candidoses orale par Kamai et coll.(2001).

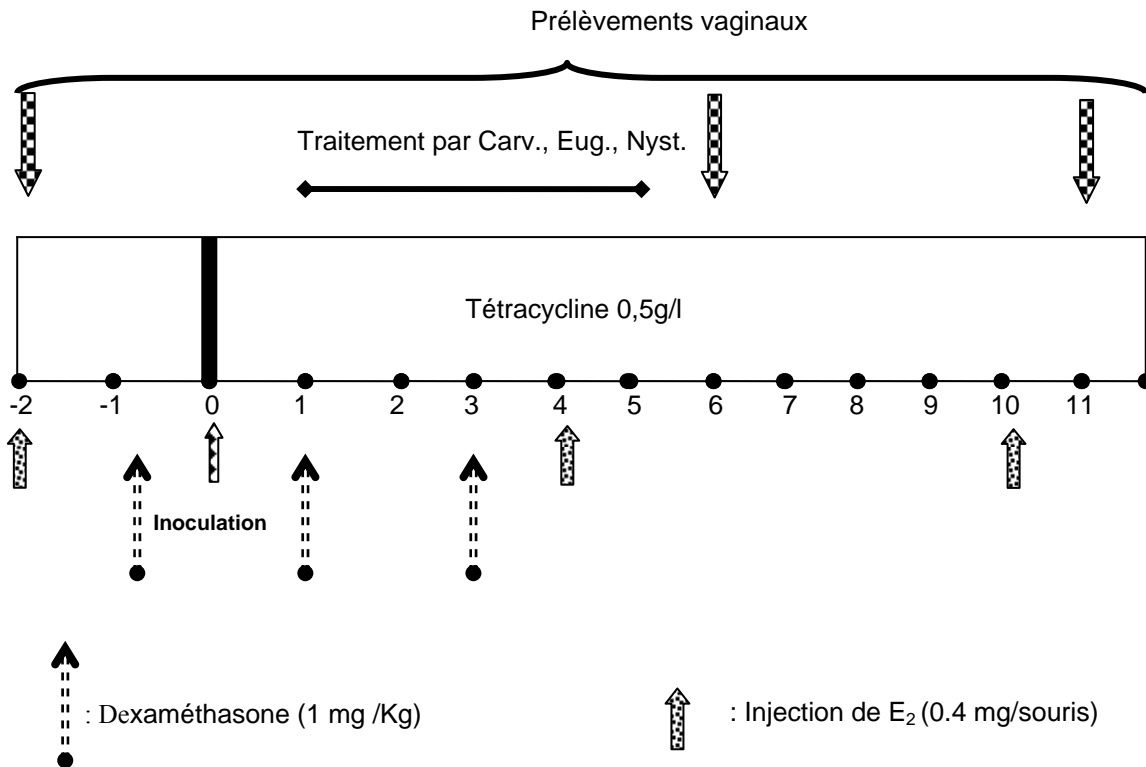


Figure 11: Diagramme schématique du modèle de la candidose vaginale chez la souris immunodéprimée.

2. Agents antifongiques

Le carvacrol, composé majoritaire de l'HE d'origan et l'eugénol, composé majoritaire de l'HE de girofle ont été fournis par Sigma

La nystatine, (mycostatine), a été fournie par Brystol Meyer Squibb.

3. Détermination de la CMI et de la CMF du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine.

La détermination de la CMI et de la CMF du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine sur la souche de *C. albicans* L1120 a été faite de la même façon que celle de la souche 1E111PV515 dans le chapitre précédent.

4. Microorganismes et conditions de croissance

La souche de *C.albicans* L1120 utilisée dans ce travail a été isolée dans le milieu hospitalier à partir de fèces d'un patient souffrant de candidose gastro-intestinale. Cette souche a montré une bonne virulence après plusieurs passages dans la souris.

4.1 Préculture

A partir d'un épuisement de *C. albicans* L1120 sur un milieu solide YEPG, une colonie de cellules est prélevée à l'aide d'un enseigneur et placée dans un erlenmeyer contenant 50 ml de milieu YPG liquide. Celui-ci est placé dans un bain Marie agitateur à 30°C pendant 18 heures. Afin d'éviter une contamination par les bactérie, du chloramphénicol à 0,05% (Poids / volume) est rajouté après stérilisation du milieu YPG liquide et solide.

4.2 Lavage des cellules

Un volume de 3ml de la préculture est sédimenté par centrifugation à 2000 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans du PBS égal au volume initial. Les cellules sont ainsi lavées 3 fois et resuspendues dans du PBS puis ajustées à un nombre final de $2,5 \cdot 10^7$ cellules /ml. (Fidel et coll., 1997; Stevens et coll., 2002)

4. 3 Comptage des cellules

Le comptage des cellules se fait sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Après dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la suspension de cellules lavées suivant la même technique utilisée dans le chapitre précédent.

5. Protocole de traitement

Avant l'inoculation, 40 souris sont partagées au hasard en cinq groupes de huit animaux chacun.

Groupe1:(n=8). Les animaux infectés mais non traités (témoin positifs), reçoivent 40µl de suspension d'agar à 0,6 % (sans aucun agent antifongique) deux fois par jour.

Groupe 2, 3, 4 (n=8 dans chaque groupe). Ces trois groupes d'animaux infectés reçoivent un traitement thérapeutique par voie intravaginale à l'aide d'un cône jaune à une dose de 40 µl d'une suspension de carvacrol, d'eugénol ou de nystatine. Ce traitement commence 24h après l'inoculation et se poursuit cinq jours après à raison de deux fois par jour.

Groupe5: (n=8). Animaux infectés mais non immunodéprimés (NID). Ce groupe a été utilisé afin d'étudier l'impact de l'immunosuppression sur le développement de l'infection. Ces animaux reçoivent 40µl d'agar à 0,6%.deux fois par jour.

6. Infection expérimentale

Deux jours avant l'inoculation, un prélèvement vaginal a été effectué pour tous les groupes d'animaux afin de confirmer l'absence de *C.albicans* dans leur cavité vaginale. Le prélèvement vaginal se fait en imbibant un coton tige stérile de PBS et en l'enroulant dans la cavité vaginale des souris. Le contenu du coton tige est ensuite suspendu dans 1ml de tampon phosphate (PBS) puis agité, et la détermination du nombre d' UFC de *C. albicans* est faite en duplicate selon la méthode de la goutte calibrée (Courvalin et coll., 1991).

Les souris sont inoculées par voie intravaginale par 20 µl de cellules lavées à $2,5 \times 10^7$ blastoconidies par millilitre. Ces cellules lavées ont été obtenues à partir d'une culture en début de la phase stationnaire. L'inoculation se fait à l'aide d'un cône jaune de pipette calibrée (Gilson)

7. Préparation des agents antifongiques pour le traitement vaginal

Pour le traitement vaginal par la nystatine, La poudre de nystatine est suspendue dans une solution visqueuse d'agar à 0,6%.

Pour le traitement vaginale par le carvacrol et l'eugénol, ces derniers dilués au 1/10^{ème} dans de l'agar à 0,2% sont dispersé dans une solution visqueuse d'agar à 0, 6%.

Le traitement est effectué par voie intravaginale par injection de 40 µl de carvacrol, d'eugénol, utilisés à 2 x CMI (approximativement 4,57mg/kg /jour) ou de nystatine utilisée à 10 x CMI

(approximativement 124µg/kg/jour). Le traitement a été fait à l'aide d'un cône jaune de pipette. Pour qu'il n'y ait pas de risque d'écoulement des agents antifongiques de la cavité vaginale, ces derniers sont mis en suspension dans une solution visqueuse d'agar à 0,6 % utilisée en tant qu'excipient.

8. Quantification du degré d'infection et détermination de l'efficacité du traitement

Cette quantification est évaluée par une méthode microbiologique. L'évaluation de la charge fongique vaginale est faite en 3 temps, 48 h avant l'inoculation, 24h après les cinq jours de traitement, et 5 jours après l'arrêt du traitement (Figure 11). Cette évaluation est faite à partir d'échantillons collectés en enroulant un coton tige stérile imbibé de PBS à travers toute la cavité vaginale, le contenu de ce coton tige est ensuite suspendu dans 1ml de PBS puis agité. La détermination du nombre d'UFC de *C.albicans* est faite après dilutions progressives au 1/10^{ème} de ce liquide de rinçage selon la méthode de la goutte calibrée (Courvalin et coll., 1991)

9. Tests statistiques

Les différences entre les groupes de traitement sont évaluées par le test t de Student. Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives (Schwartz 1984)

III. Résultats

1. Détermination de la CMI et la CML du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine pour la souche de *C. albicans* L1120

Le tableau VIII montre les valeurs des CMI et des CMF *in vitro* sur *C. albicans* L1120 en milieu liquide avec la taille de l'inoculum de 10^6 UFC

Agents antifongiques	CMI	CMF
Carvacrol	0,1% (10^3 µg/ml)	0,1% (10^3 µg/ml)
Eugénol	0,1% (10^3 µg/ml)	0,1% (10^3 µg/ml)
Nystatine	5 UI (5,44 µg/ml)	5 UI (5,44 µg/ml)

Tableau VIII: Valeurs des CMI et des CMF du carvacrol, de l'eugénol et de la nystatine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage (v/v) et en µg/ml pour le carvacrol et l'eugénol ou en unités internationales/ml et en µg/ml pour la nystatine

Les concentrations utilisées pour le traitement des animaux sont 2x CMI pour le carvacrol et l'eugénol. La nystatine utilisée à 10 x CMI sert de traitement de référence.

2. Résultats microbiologiques après le traitement thérapeutique

Deux jours avant l'inoculation, l'évaluation de la charge fongique vaginale de tous les groupes d'animaux a été faite montrant une absence totale de *C. albicans* chez tous les groupes d'animaux.

Six jours après l'inoculation, l'évaluation de la charge fongique chez le groupe des témoins positifs (infectés non traités) a montré 100% de cultures positives, avec une valeur moyenne du log des UFC de $3,74 \pm 0,38$ ($6,37 \times 10^3$) (Tableau IX). Concernant le groupe des animaux traités par le carvacrol, 25% des animaux seulement sont restés infectés et leur charge fongique est significativement plus faible que celle des témoins positifs avec une valeur moyenne du log des UFC de $2,74 \pm 0,02$ ($5,6 \times 10^2$). Pour ce qui est du groupe d'animaux traités à l'eugénol, 37,5% (3/8) des animaux sont restés infectés avec une charge fongique légèrement plus faible que celle des témoins (Log UFC = $3,27 \pm 0,66$). La nystatine a permis une guérison de tous les

animaux. Concernant le groupe d'animaux infectés mais non immunodéprimé, 75% des animaux présentent une charge fongique nulle, 25% des animaux sont restés infectés mais avec un degré significativement plus faible que celui des témoins positifs ($2,82 \pm 0,03$).

Après le traitement de cinq jours aux différents agents antifongiques, les souris sont restées sous observation pendant cinq jours afin de voir comment va évoluer cette infection. L'évaluation de leur charge fongique le jour J11 après l'infection a montré que pour le groupe des témoins positifs, 87,5% des animaux sont restés infectés, leur charge fongique vaginale est proche du début de l'expérience (Tableau IX), autrement dit, la valeur moyenne du log des UFC est de $3,69 \pm 0,55$. Quant au groupe d'animaux traités par le carvacrol, un seul animal est resté infecté avec une charge fongique d'une valeur en log d'UFC de 2,64 ($4,4 \times 10^2$). Pour les animaux traités à l'eugénol, le pourcentage d'animaux infectés est le même, avec la même charge fongique qu'au jour 6. Pour les animaux qui ont été traités par la nystatine, 25% des animaux ont montré une charge fongique positive de $3,18 \pm 0,58$. Concernant le groupe des souris non immunodéprimées, le nombre d'animaux infectés est resté le même,

	Jour 6			Jour 11		
	<u>Animaux infectés (%)</u>	<u>Log UFC ± SEM</u>	<u>Pourcentage de réduction des UFC/témoin</u>	<u>Animaux infectés (%)</u>	<u>Log UFC ± SEM</u>	<u>Pourcentage de réduction des UFC/témoin</u>
Control (1)	8/8 (100)	3,74 ± 0,38	na	7/8 (87,5)	3,69± 0.55	na
Carvacrol (2)	2/8 (25)	2,74± 0,02*	91,21%	1/8 (12,5)	2,64*	95,75%
Eugénol (3)	3/8 (37,5)	3,27±0,66	51,18%	3/8 (37,5)	3,22± 0,38	74,88%
Nystatine (4)	0/8 (0)	0	na	2/8 (25)	3,18± 0,58	69,09%
Group 5 # (NID)	2/8 (2)	2,81± 0,13*	89,33%	2/8 25)	3,65±0,25	na

Tableau IX. Résultats Microbiologiques du traitement thérapeutique par le carvacrol, l' eugénol ou la nystatine de la candidose vaginale chez la souris.

Les souris sont inoculées par voie intravaginale avec $2,5 \times 10^5$ cellules de *C. albicans* (L1120); Les agents antifongiques sont administrés 2 fois par jour pendant 5 jours consécutifs débutant 24h après l'inoculation. Les prélèvements vaginaux ont été faits 24 h après la fin du traitement (J6) puis cinq jours après (J11). * Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives. na : non applicable

VI. Discussion

Tous les modèles de la vaginite expérimentale décrit par Fidel et coll. (1997) et (2000), Guelardi et coll. (1998); Stevens et coll (2002); Karen et coll (2002), utilisent des souris immunocompétantes en état de pseudoœstrus provoqué. Les résultats de l'expérience que nous avons menée sur la candidose vaginale chez le rat nous ont poussé à améliorer ce modèle chez la souris en provoquant l'immunosuppression par un traitement à la dexaméthasone associée à la tétracycline en vue d'éviter la guérison spontanée chez le groupe des témoins positifs.

Pour le choix du germe, nous avons utilisé une souche de *C. albicans* après confirmation de sa virulence après plusieurs passages dans la souris. Quant à la taille de l'inoculum, nous avons choisi celle utilisée par les auteurs ayant testé chez la souris l'action antifongique d'autres molécules sur la candidose vaginale ($2,5 \times 10^7$ cellules /ml) (Fidel et coll., 1997; Guelardi et coll., 1998; Stevens et coll., 2002).

Nous avons constaté que durant toute l'expérience, et pour tous les groupes d'animaux immunodéprimés, aucune guérison spontanée n'a été observée lors du prélèvement du sixième jour (Tableau IX). Cependant, un seul cas de guérison spontanée a été constaté au bout de onze jours alors que chez les animaux non immunodéprimés, 75% des animaux se sont débarrassés de l'infection. Ce résultat montre d'une part, que l'immunosuppression que nous avons apporté à ce modèle était indispensable pour reproduire la candidose vaginale chez la souris. D'autre part, ce modèle de l'immunosuppression par l'association cortisone tétracycline nous rappelle les conditions favorisant l'infection vaginale chez la femme (Bodey, 1993; Spinillo et coll., 1999).

L'utilisation de la nystatine à une forte concentration (10 x CMI) était voulue dans le but d'obtenir un maximum d'efficacité de cet agent antifongique au bout de cinq jours.

Néanmoins, le prélèvement vaginal, après 11 jours, a montré pour ce groupe d'animaux 25% de récurrence. Ceci est probablement dû à des germes qui étaient suffisamment incrustés dans des zones vaginales non accessibles avec lesquelles la nystatine n'a pas de contact. Ces germes auraient probablement recolonisé la muqueuse vaginale après l'arrêt du traitement, d'où la récurrence. D'ailleurs, les résultats histologiques du traitement de la candidose buccale expérimentale par la nystatine chez le rat montrent la présence du *Candida* sous sa forme mycélienne dans les replis de la face dorsale de la langue sur des animaux microbiologiquement guéris (Chami et coll., 2004). Ce qui explique la récurrence fréquente de la candidose après traitement par la nystatine.

Le traitement à l'eugénol a été efficace puisque 5/8 des animaux sont guéris au bout de cinq jours de traitement, après lesquels aucune récurrence n'a été constatée. Cependant, les souris qui sont restées infectées ont une charge fongique plus faible que celle des témoins positifs mais encore persistante à 11 jours.

L'évaluation microbiologique après cinq jours de traitement par le carvacrol a montré que ce dernier a conduit à la guérison de 6/8 des animaux. Les deux animaux restants montrent une charge fongique significativement plus faible que celle des témoins positifs ($P < 0,05$), le pourcentage de réduction en UFC étant de 91,21%. Ceci témoigne d'une grande efficacité. Cinq jours après l'arrêt du traitement, le prélèvement vaginal a montré que sur les deux souris infectées restantes; une seule est restée infectée avec un pourcentage de réduction d'UFC de 95,75% ce qui montre une efficacité du carvacrol même après l'arrêt du traitement. Il faut aussi noter qu'aucune récurrence n'a été observée chez les six animaux guéris par le traitement. On peut expliquer l'absence de récurrence suite au traitement à l'eugénol et au carvacrol par le fait que ce sont des molécules volatiles qui peuvent agir dans des régions non accessibles par les autres agents antifongiques, d'autant plus que l'environnement vaginale est relativement clos et peut être saturé par ces molécules à l'état gazeux.

V. Conclusion

Dans cette troisième partie du travail, l'utilisation du carvacrol et de l'eugénol en traitement thérapeutique de la candidose vaginale chez la souris immunodéprimée, pendant cinq jours consécutifs, a montré que sur le plan microbiologique, le carvacrol est capable d'éradiquer la charge fongique vaginale pour 6/8 des animaux. L'eugénol étant un peu moins efficace est capable de guérir 5/8 des animaux, néanmoins, La charge fongique des trois animaux infectés, restants est resté proche de celle des témoins positifs. Le traitement par la nystatine semble être efficace puisque la charge fongique des animaux est nulle. Cependant, cinq jours après l'arrêt du traitement, un prélèvement vaginal de tous les groupes d'animaux a montré que le carvacrol est très efficace sans récurrence, l'eugénol est un peu moins efficace mais également sans récurrence. Au contraire, le prélèvement vaginal des souris traitées par la nystatine a montré une récurrence chez 2/8 des animaux.

L'immunosuppression que nous avons ajouté à ce modèle a joué un rôle important puisque pour les animaux non immunodéprimés, la guérison était spontanée chez 6/8 des animaux alors que pour les animaux immunodéprimés, 7/8 d'entre eux continuent d'être infectés tout au long de l'expérience

Les résultats de ce travail montrent que le traitement par l'eugénol est partiellement efficace sans récurrence et que le traitement au carvacrol est très efficace. Ces deux molécules pourraient donc constituer une base pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antifongiques naturels qui peuvent être utilisées chez l'Homme contre les infections rebelles aux agents antifongiques couramment utilisés. Des études plus poussées de toxicité aiguë et chronique sont envisagées, de même qu'une étude pharmacocinétique pour mieux adapter les conditions de traitement. Nous pensons également développer d'autres modèles de candidoses superficielles telles que les candidoses cutanées et gastro-intestinales et des candidoses profondes telles que la candidose systémique et l'ostéomyélite.

Conclusion générale

Notre laboratoire travaille sur l'investigation scientifique de l'activité antimicrobienne des HE depuis plusieurs années en utilisant différentes méthodes. Dans une première partie de ce travail, nous avons testé l'activité antifongique d'une vingtaine d'HE de chémotypes différents sur trois souches de *S. cerevisiae* en utilisant une méthode standardisée et améliorée dans notre laboratoire. Les résultats obtenus ont montré que les HE qui ont l'activité fongicide la plus importante sont celles qui possèdent un composé majoritaire phénolique. Notre choix s'est porté sur les HE agissant à une faible concentration car notre objectif était de tester *in vivo* leur activité antifongique sur des modèles animaux sans se heurter à des problèmes de toxicité et en utilisant des doses thérapeutiquement acceptables. Sur le plan fondamental, les HE d'origan et de girofle ont été utilisées pour montrer leur mécanisme d'action fongicide. Les résultats que nous avons obtenus confirment l'altération de la membrane déjà décrite par plusieurs laboratoires dont le notre. Ces résultats supposent, en plus, une forte altération de la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* et ceci en s'appuyant sur une visualisation par la microscopie électronique à balayage.

Sur le plan appliqué, nous pensons que les HE et leurs composés majoritaires phénoliques peuvent servir dans la prévention et le traitement de certaines maladies infectieuses localisées. Ceci nous a encouragé à tester l'activité fongicide des HE *in vivo* en insistant sur leurs composés majoritaires pures qui, à notre avis, sont responsables de la grande part de cette activité. Le modèle de la candidose vaginale chez le rat et la souris immunodéprimés nous a paru convenable pour évaluer l'efficacité thérapeutique des HE. D'autant plus que, la vaginite est une maladie très répandue chez la majorité des femmes dans le monde entier, d'autant plus que c'est l'une des premières manifestations cutanéomuqueuses chez la femme séropositive pour le VIH.

Cette évaluation de l'activité du carvacrol et de l'eugénol peut être considérée comme un test préclinique prometteur. Les résultats obtenus dans ce travail sur ces deux molécules

pourraient constituer une base pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antifongiques naturels qui peuvent être utilisés chez l'Homme contre les infections rebelles aux antifongiques classiques. Ces résultats pourraient être exploités aussi dans le traitement d'autres formes de candidoses superficielles et profondes. Il serait également intéressant d'exploiter leurs effets sur des maladies bactériennes puisque des travaux effectués, actuellement, dans notre laboratoire ont montré que ces composés ont une action bactéricide sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ayant montré un grand degré de multirésistance.

Afin de mieux adapter les conditions de traitement, des études pharmacocinétiques sont envisagées, de même qu'une étude poussée de toxicité aigue et chronique.

Références bibliographiques

- **Agatensi I., Franchi F., Mondello F., et al.** (1991) Vaginopathic and photolytic *Candida* species in outpatients attending gynaecology clinic. *J. Clin. Pathol.* 44: 826-28.
- **Alcamo E.** (1997) Fundamentals of microbiology (5ème edition): *The fungi* pp: 429-461. Adison Wilsey Longman Inc.
- **Ali-Shtayeh M.S., Al-Nuri M.A., Yaghmour R.M. and Faidi Y.R.** (1997) Antimicrobial activity of *Micromeria nervosa* from the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol.* 58: 143-147
- **Allegrini J. et Siméon De Buochberg M.** (1972) Une technique d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles. *Prod. Probl. Pharm.* 27: 891-897.
- Al-Moghrabi N.M., Al- sharif I.S. and Aboussekhra A.** (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 cell cycle checkpoint gene is required for optimal repair of U V-induced pyrimidine dimmers in both G1 and G2 /M phases of the cell cycle. *Nucl. A. Res.* 29: (10) 2020-2025
- **Anonyme.** (1995). *Mucosal immunology update*, vol. 3, p. 1–15. Official publication of the Society for Mucosal Immunology. Raven Press, New York.
- **Arras G. and Usai M.** (2001) Fungitoxic activity of essential oils against four post harvest citrus pathogens. chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food. Prot.* 64:1025-1029.
- **Arathoon E.G., Gotuzzo E., Noriega L.M., Berman R.S., Dinubile M.J. and Sable C.A.** (2002) Randomized double blind, multicenter study of caspofungin versus Amphotericin B for treatment of oropharyngeal and oesophageal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:451-457.
- **Atkinson B., Bouthet C., Bocanegra R., Correa A., Luther M. and Graybill J.** (1995) Comparison of fluconazole, amphotericin B and flucitocyne in the treatment of immunocompromised mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 631-640.
- **Aviles P., Falcoz C., Guillen M.J., San Roman R., Gomez De Las Heras F. and Gargallo- Viola D.** (2001) Correlation between in vitro and *in vivo* activities of GM237354, a new sordarin derivative against *Candida albicans* in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model and influence of proteine binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2746-2754.
- **Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J.** (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene toward *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food. Microbiol.* 21: 33-42.
- **Barnett J.A., Payne R.W. and Yarrow D.** (1990) *Yeasts: characteristics and identification* (2nd ed) Cambridge University Press. Cambridge.

- **Barnes B.** (1989) The development of topical applications containing tea tree oil for vaginal conditions. In *Modern Phytotherapy - The Clinical Significance of Tea Tree Oil and Other Essential Oils*. Proceeding of conference in Sidney, September 17 1989, Vol. 1, pp. 27-35. Australian Tea tree oil industry Association, Coraki, Australia.
- **Bartroli J., Turmo E., Alguero M., Boncompte E., Vericat M.L., Garcí'a-Rafanell J. and Forn J.** (1995) Synthesis and antifungal activity of new azole derivatives containing an *N*-acylmorpholine ring. *J. Med. Chem.* 38: 3918–3932.
- **Beck-Sague C. and Jarvis W.R.** (1993) Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United states. 1980-1990. National nosocomial infections surveillance system. *J. Infect. Dis.* 167: 1247-1251.
- **Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-Alaoui M. et Ayadi A.** (1986) Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Pl. Med. Phytother.* 20(2): 155-167.
- **Bennett J.E.** (1990) *Antimicrobial agents: antifungal agents* in Gilman A.G, Rail T.W, Nies A.S and Taylor P (ed). Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 8th Ed, Pergamon Press Inc.Elmsford. NY.
- **Bennis S., Chami F.,Chami N., Rhayour K., Tantaoui Laraqui A. and Remmal A.** (2004b) Eugenol induces damage of bacterial and fungal envelope. *Moroccan Journal of Biology.* 1: 33-39.
- **Bennis S, Chami F,Chami N,Bouchikhi T. and Remmal A** (2004a) Surface alteration of *Saccharomyces crervisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 38 : 454-458.
- **Benyahya M., Senaud J. and Bohatier J.** (1992) Colonisation et dégradation de fragments de paille de blé par les ciliés du rumen *Epidinium*, *Entodinium* et *Isotricha*: étude en microscopie électronique. *An. Sci. Nat. Paris.*13: 103-119.
- **Berraoud L., Bessière J.M. and Tantaoui-Elaraki A.** (1991) Chemical composition of the essential oils of selected plant materials used in Moroccan cuisine. *Al Birunya Rev. Mar.Pharm.* 7: 49-69.
- **Bergonzelli G.E., Donnicola D., Porta N. and Corthesy-Theulaz I.E.** (2003) Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3240-46.

- **Beylier-Maurel M.F.** (1976) Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 58:283-286.
- **Bisschop M.P.J.M., Merkus J.M.W.M., Scheygrond JH., Van Custem J. and Van de Kuy A.** (1979) Treatment of vaginal candidiasis with ketoconazole, a new orally active antimycotic. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 9: 253-259.
- **Blackwell A.L.** (1991) Tea tree oil and anaerobic bacterial vaginosis. *Lancet* 337: 300.
- **Bodey G.P.** (ed). (1993) *Candidiasis pathogenesis diagnosis and treatment*. 2nd ed Raven Press new york N.Y.
- **Bolard J.** (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 864: 257-304.
- **Boonchird C. and Flegel T.W.** (1982) *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Can. J. Microbiol.* 28: 1235-1241.
- **Boulos L.** (1983) *Medicinal plants of North Africa*. Ed Reference Publications Inc Michigan.
- **Bratjburg J., Powderly W.G., Cobayashi G.S. and Medoff G.** (1990) Amphotericin B. Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:183-188.
- **Burnie J.P., Odds F.C., Lee W., Webster C. and Williams J.** (1985) Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. *Br. Med. J.* 290: 746-748.
- **Burt S** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 223-253.
- **Bykov V.L.** (1991). Velocity of *Candida albicans* invasion into host tissues. *Mycoses.* 34 (7-8): 293-296.
- **Caccioni D.R., Guizzardi M., Biondi D.M., Renda A. and Ruberto G.** (1998) Relationship between volatile components of *citrus* fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food. Microbiol.* 18: 73-79.
- **Cain T.K. and Rank R.G.** (1995) Local Th1-like responses are induced by intravaginal infection of mice with the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 63:1784–1789.
- **Carson C.F. and Riley T.V.** (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J.Bacteriol.* 78: 264 -269.
- **Carson C.F., Cookson B.D., Farrelly H.D. and Riley T.V.** (1995) Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 421 -424.

- **Cassone A., Boccanera M, Adriani D, Santoni G, De Bernadis F.** (1995) Rats clearing a vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antibody-mediated resistance to vaginal reinfection. *Infect. Immun.* 63: 2619-24.
- **Chaffin W.L., Lopoez –Ribot J.L., Casanova M., Gozalbo D. and Martinez J.P.** (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification Fonctions, and Expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180.
- **Challacombe S.J.** (1990) *Immunology of oral candidiasis*, pp: 104-123. In L.P Samaranayake and Mac Farlane T.W Ed Oral candidiasis. Wright, London united Kingdom.
- **Chami F., Chami N., Bennis S., Trouillas J. and Remmal A.** (2004). Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(5):909-14.
- **Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J. and Remmal A.** (2004). Antifungal treatment of oral candidiasis in the immunosuppressed rats by carvacrol and eugenol. *Braz. J. Infect. Dis.* 8: 217-227.
- **Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F.** (1999) *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:130-35.
- **Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.P. and Goldtein F.** (1991) Aspects théoriques et thérapeutiques in *Bactericidie* : Caillon J and Drugeon H. Dénombrement des bactéries vivantes In Maloine Edn Paris, pp. 127-136.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G.** (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tee tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88(1): 170-175.
- **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G.** (2001). Determining the antimicrobial actions of Tea tree oil. *Molecules.* 6: 87-91
- **DeBernadis F., Boccanera M., Adriani D., Spreghini E., Santoni G. and Antonio C.** (1997) Protective Role of Antimannan and anti Aspartyl proteinase antibody in an Experimental Model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect. Immun.* 65: 3399-3405.
- **DeBernadis F., Agatensi L., Ross I.K., Emerson G.W., Lorenzini R., Sullivan P.A. and Cassone A.** (1990) Evidence for a role for secreted Aspartyl proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.* 161: 1276-1283.

- **DeBernadis F., Mondello F., Scaravelli G., Pachi A., Girolamo A., Agatensi L. and. Cassone A.** (1999) High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus infected women. *J. Clin. Microbiol.* 37(5): 1376-1380.
- **De Billerbeck V. G., Roques C., Vanière P. et Marquier P.** (2002) Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes.* X (3) : 248-251.
- **Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. and Mazza G.** (2002).Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, *cilantro coriander* and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food. Microbiol.* 74: 101-109.
- **Deslauriers N., Coulombe C., Care B. et Goulet P.J.P.** (1995) Topical application of corticosteroid destabilizes the host parasit relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 11: 45-55.
- **De Tourris H., Magnin G. et Pierre F.** (1998) Gynécologie et Obstétrique (Manuel illustré) 7^{ème} Edition Masson pp 93
- **Didry N., Dubreuil L, Pinkas M.** (1994) Activity of thymol, carvacrol, cinamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta. Helv.* 69: 25-28.
- **Duchene D., Touchard F. and Peppas N.A.** (1993) Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive system of drug administration. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 14: 283-318.
- **Dupont B.F., Dromer M.D.F. and Improvisi M.D.L.** (1996) The problem of azole resistance in *Candida*. *J. Mycol. Med.* 6, Suppl. II: 12-19
- Fidel P.L and Sobel J.D.** (1996) Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 335-348.
- **Fidel P L., Cutright J L.and Sobel J.** (1997) Efficacy of D0870 treatment of experimental *Candida* vaginitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1455-1459.
- **Fidel P.L., Jessica Cutright J.R. and Steele C.** (2000). Effects of Reproductive Hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.* 68: 651-657.
- **Flattery A.M., Abruzzo G.K., Charles J.G., Jeffrey G.S and Bartizal K** (1996) New Model Of Oropharyngeal and Gastrointestinal Colonization by *Candida albicans* in CD41 T-Cell-Deficient Mice for Evaluation of Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1604-1609.
- **Franchomme P.** (1981) L'aromatologie à visée anti-infectieuse. *Phytomedecine.* 1: 25-47.
- **Fromtling R.A.** (1988) Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 187-219.

- **Gaspari A.A., Burns R., Nasir A., Ramirez D., Barth R.K. and Haidaris C.G.** (1998) CD86(B7-2), but not CD80(B7-1), expression in the epidermis of transgenic mice enhances the immunogenicity of primary cutaneous *Candida albicans* infections. *Infect. Immun.* 66:4440-4449.
- **Ghannoum M.A.** (1997) Future of antimycotic therapy. *Dermatol. Ther.* 3: 104-111.
- **Georgopapadakou N.H. and Walsh T.J.** (1996) Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 279-291.
- **Goa K.L. and Barradell L.B.** (1995) Fluconazole. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. *Drugs.* 50: 658-690.
- **Graybill J.R.** (1996) The future of antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.* 22 (Suppl. 2): S166-S178.
- **Grillot R. et Noël T.** (1999) *Antifongiques et antifongigramme*. Option/Bio Supplément au n° 224, 26: 1-16.
- **Graybill J.R., Montalbo E., Kirkpatrick W.R., Luther M.F., Revancar S.G. and Patterson T.F.** (1998) Fluconazole versus *Candida Albicans*: A complex relationship. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 2938-2942.
- **Ghelardi E., Tavanti, A., Lupetti A., Celandroni F., Boldrini E., Campa M. and Senesi S.** (1998) Control of *Candida albicans* Murine Vaginitis by Topical Administration of Polycarbophil-Econazole Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2434-2436.
- **Guhad FA. and Hau J.** (1999) Animal models for fungal infections. *Infect. Dis. Rev.* 1 (3):182-188.
- **Gupta A.K., Sauder D.N. and Shear N.H.** (1994) Antifungal agents: an overview. *I. J. Am. Acad. Dermatol.* 30: 677-698.
- **Hammer K.A., Carson C.F. and Riley TV.** (1998) *In vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 591-595.
- **Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V.** (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86: 985-990.
- **Hammer K.A., Dry L., Johnson M., Michalak E.M., Carson C.F. and Riley T.V.** (2003) Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral. Microbiol. Immunol.* 18: 389-392.

- **Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V.** (2004) Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53(6): 1081-5
- **Hammond S.M.** (1977) *Biological activity of polyene antibiotics*, pp. 106-164. In G. P. Ellis and G. B. West (ed.), *Progress in medicinal chemistry*, vol. 14. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York.
- **Han Y., Riesselman M.H. and Cutler G.E.** (2000) Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3(IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect. Immun.* 68: 1649-1654.
- **Hau J., Andersen L.L.I., Nielsen B.R. and Poulson O.M.** (1989) Laboratory animal models. *Scand. J. Lab. Ani. Sci.* 16(suppl1): 7-9.
- **Hay R., Baran R., Moore M. and Wilkinson J.** (1988) *Candida onychomycosis*: an evaluation of the role of *Candida* species in nail diseases. *Br. J. Dermatol.* 188: 47-58.
- **Hazen E.L. and Brown R.** (1950). Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science.* 112:423.
- **Herent P., Stynen D., Hernando F., Fruit J. and Poulain D.** (1992) Retrospective evaluation of two latex agglutination test for detection of circulating antigens during invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2158-2164.
- **Herreros E., Martinez C.M., Almela J., Marriot M.S., Gomez de las Heras F. and Gargallo Viola D.** (1998) Sordarins: *in vitro* activities of new antifungal derivatives against pathogenic yeast, *Pneumocystis carinii*, and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2863-2869.
- **Herreros E., Martinez A., Almela M J., Jimenez E., Lozano S Perrez M.J F. and Gargallo Viola D.** (2000) Abstr 40th Intersci Conf. *Antimicrob. Agents Chemother.* Abstract. 1691.
- **Hili P., Evans C.S. and Veness R.G.** (1997) Antimicrobial action of essential oils: The effect of dimethylsulfoxid on the activity of cinnamon oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 269-75.
- **Hitchcock C.A.** (1993) Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 1039-1047.
- **Hostetter M.K.** (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. With epithelial and endothelial cells. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 29-42.
- **Hulin V., Mathot A., Mafart P. and Dufossé L.** (1998) Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sci. Aliments* 18: 563-582.

- **Imam N., Carpentier C.C., Mayer K.H., Fisher A.Stein.M. and Danforth S.H.** (1990) Hierarchical pattern of mucosal *Candida* infections with HIV- seropositive women. *Am. J. Med.* 89: 142-146.
- **Inouye S., Tsuruoka T., Uchida K. and Yamaguchi H.** (2001a) Effect of Sealing and Tween on the Antifungal Suceptibility Testing of Essential Oils. *Microbiol. Immunol.* 45(3): 201-208.
- **Inouye S., Yamaguchi H. and Takizawa T.** (2001b) Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. infect. Chemother.* 7: (4) 251-254.
- **Janssen A.M., Chin N.L.J., Scheffer J.J.C. and Baerheim-Svendsen A.** (1986) Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific.* 8: 289-292.
- **Janssen A.M., Scheffer J.J.C. and Baerheim Svendsen A.** (1987) Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. *Planta. Med.* 53: 395-398.
- **Jones J.H., Russel C., Young C. and Owen D.** (1976) Tetracycline and the colonization and infection of the mouths of germ free and conventionalized rats with *Candida albicans*. *J.Antimicrobial.Chemother.*2: 247-253.
- **Jones J.H. and Adams D.** (1970) Experimentally induced acute oral candidiasis in the rat. *Br. J. Dermatol.* 83: 670.
- **Jones J.M.** (1990) Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 32-45.
- **Kamai Y., Kubota M., Kamai Y., Hosokawa T., Fukuoka T and Filler S.G.** (2001) New model of oropharyngeal candidasis in mice. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45: 3195-3197.
- **Karen L., Wozniak F L., Wormley J. and Fidel PL J.** (2002) *Candida* –specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infect. Immun.* 70(10): 5790-5799.
- **Kato T., Lijima H., Ishihara K., KanetoT., Hirai K, Naito Y. and Okuda K.** (1990) Antibacterial effect listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. coll.* 31(4): 301-307.
- **Kao A.S., Brandt M.E., Pruitt W.R., Conn L.A., Perkins B.A. and Stevens S.D.** (1999) The epidemiology of candidemia in two United states cities: Results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 29: 164-70.

- **Kauffman C.A. and Carver P.L.** (1997) Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments. *Drugs* 53: 539–549.
- **Kauffman C.A.** (1996) Role of azoles in antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.* 22: 148-153.
- **Kellner W. and Kober W.** (1954) Moglivhkeiten der verwendung atherischer ole zur Raumdesinfektion *Arzeimittelforsch.* 4: 319-325.
- **Kennedy M.J. and Volz P.A.** (1985) Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. *Sabouraudia*.23: 265-73.
- **Kent H.L.** (1991) Epidemiology of vaginitis. *Am. J. Obst. Gynecol.* 165: 1168-1175.
- **Kerridge D.** (1993) *Fungal dimorphism: A sideways look* pp.3-10 in Vanden Bosscheh, Odds F.C and Kerridge D (ed), *Dimorphic fungal in biology and medicine*. Plenum Press, New York, N.Y.
- **Kirkpatrick C.H.** (1994) Chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31: S14–S17.
- **Kreger-Van Rij.** (1987) *The yeasts: A taxonomic study*; Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- **Knoblock K., Pauli A., Iberl., N. et al.** (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil. Res.* 1: 119-128.
- **Koltin Y. and Hitchcock C.A.** (1997) Progress in the search for new triazole antifungal agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 176-182.
- **Kusamichi M., Monodane T., Tokunaga M. and Koike H.** (1990) Influence of surrounding media on preservation of cell wall ultrastructure of *Candida albicans* revealed by low temperature scanning electron microscopy. *J. Electron. Microsc.* 39: 477-486.
- **Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcok A. and Coventry M.J.** (1998) The synergetic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum*) against acid tolerant food microflora. *Lett. Appl. Micribiol.* 26: 209-214.
- **Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.J.** (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol* 91 (3): 453-62.
- **Lane T. and Garcia G.R.** (1991) Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses.* 34: 217-220.
- **Lattaoui N.** (1989) Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de 3 espèces de Thym à profils chimiques différents ; Thèse de 3ème cycle, option Microbiologie, E.N.S Takadoum Rabat.

- **Lee K.H., Huang E.S., Pagana J.S. and Geissman T.A.** (1971) Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. *Cancer. Res.* 31: 1649-1654.
- **Lima E.O., Gompertz O.F., Giesbrecht A.M. and Paulo M.O.** (1993) *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from plants against dermatophytes. *Mycoses.* 36: 333-336.
- **Mac Donald T.M., Beardon P.H., McGilchrist M.M. et al.** (1993) The risks of symptomatic vaginal candidiasis after oral antibiotic therapy. *Q. J. Med.* 86: 419-424.
- **McRipley R.G., Erhard P.I., Schwind R.A. et al.** (1979) Evaluation of vaginal antifungal formulation *in vivo*. *Post. Med. J.* 55: 648-6.
- **Mallea M., Soler M., Anfosso F. and Charpin J.** (1979) Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathol. Biol.* 27: 597-60.
- **Manohar V., Ingram C., Gray J.D., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D. and Preuss H.G.** (2001). Antifungal activities of *origanum* oil against *Candida albicans*. *Mol. Cel. Biochem.* 228: 111-117.
- **Martinez A., Ferrer S., Santos I., Jimenez E., Sparrow J., Regardera J., Gomez De Las Herras. and Gargallo-Viola D.** (2001) Antifungal activities of two new Azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of Oral and Vulvovaginal Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3304-3309.
- **Martoja R. et Martoja-Pierson M.** (1967) *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et Cie, Paris, pp.159
- **Matthews R.** (1993) Early diagnosis of systemic candidial infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 809-812.
- **Meingassner J.G., Georgopoulos A. and Patoschka M.** (1975) Intravaginal infection of the rat with *trichomonas vaginalis* and *Candida albicans*. An experimental model for chemotherapy. *Tropnmed. Parasitol.* 26(4): 395-8.
- **Miyakawa Y., Mabuchi T., Kagaya K. and Fukazawa Y.** (1992) Isolation and characterization of a species –specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 894-900.
- **Mondello F., De Bernadis F., Girolamo A., Salvatore G. and Cassone A.** (2003) *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1223-1229.
- **Montes-Belmont R. et Carvajal M.** (1998) Control of *Aspergillus flavus* in maiz with plant essential oils and their components. *J. food. Prot.* 61: 616-619.
- **Morris J.A., Khetry A. and Seitz E.W.** (1978) Antimicrobial activity of aroma chemical and essential oils. *J. Amer. Oil. Chem.* 56: 595-603.

- **Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C. and Silva G.** (2000) Antibacterial activity of plant extract and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. *Br. J. Microbiol.* 31: 247-256.
- **Nenoff P., Haustein U.F., Brandt W.** (1996) Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. *Skin. Pharmacol.* 9: 388-394.
- **Nielsen P.V. and Rios R.** (2000) Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food. Microbiol.* 60: 219-229.
- **Nohmanbhoy F., Steele C., Yano J. and Fidel P.L.Jr.** (2002) Vaginal and oral epithelial cell and *Candida* activity. *Infect. Immun.* 70: 7081-7088.
- **Odds F.C.** (1977) Cure and relapse with antifungal therapy. *Proc. R. Soc. Med.* 70 (Suppl. 4): 24 -28
- **Odds F.C.** (1993). Resistance of yeasts to azoles derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 463-471.
- **Odds F.C.** (1988) *Candida and Candidosis* In: Odds F.C ed. A review and bibliography 2nd edn. London : Baillière Tindall, united Kingdom.42-59.
- **Ohno T., Kita M, Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K. and Imanishi J.** (2003) Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 8: 207-215.
- **Pappu-katikanen L.D., Rao K.P. and Banister E.** (1990) Gastrointestinal colonization with yeast species and *Candida* septicemia in very low birth weigh infants. *Mycoses.* 33: 20-23.
- **Paris M. et Hurabielle.** (1981) *Abrégés de matière médicale. Pharmacognosie* Tome 1. Ed Masson. Paris. France.
- **Parr M.B. and Parr E.L.** (1990) Antigen recognition in the female reproductive tract. Uptake of intraluminal protein tracers in the mouse vagina. *J. Reprod. Immunol.* 17:101–114.
- **Parr M.B., Kepple L. and Parr E.L.** (1991) Langerhans cells phagocytose vagina epithelial cells undergoing apoptosis during the murine estrous cycle. *Biol. Reprod.* 45:252–2.
- **Parr M.B. and Parr E.L.** (1994) *Mucosal immunity in the female and male reproductive tracts*, p. 677–689. In P. L. Ogra, J. J. Mestecky, and M. E.Lamm (ed.), *Handbook of mucosal immunity*. Academic Press, Inc., SanDiego, Calif.

- **Pellecuer J., Jacob M., Simeon De Bouchberg M.** (1980) Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant. Med. Phytother.* 14: 83-98.
- **Perez C., Agnese A.M. and Cabrera J.L.** (1999) The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): Chemical composition and antimicrobial activity tests. *J. Ethnopharmacol.* 66: 91-96.
- **Pfaller M.A., Jones R.N., Messer S.A., Edmond M.B. and Wenzel R.P.** (1998) National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans* frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the Scope Program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 327-332.
- **Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R.J. and Diekema D.J.** (2003) Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole –resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5729-5731.
- **Piens M A.** Les antifongiques. (2003). Cours Magistrale. Faculté de Médecine De Lyon France. - **Burt S** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 223-253.
- **Pittet D., Monod M., Suter P.M., Frenk E. and Ackenthaler R.** (1994) *Candida* colonization and subsequent infection in critically ill surgical patients. *Ann. Surg.* 220: 751-8.
- **Poulain D., Faille C., Michalski J.C. and Camus D.** (1990) Anticorps monoclonaux anti-*candida albicans*: de la biologie cellulaire aux marqueurs du comportement pathogène. *Med. Sc.* 6: 526-533.
- **Poulain D. et Feuilhad de Chauvin.** (1995) *Candidoses et levures* diverses Editions techniques-Encycl. Med. Chir. (Paris- France), Maladies infectieuses. 8-602-A-10:1-12.
- **Prasad R., Kapoor K.** (2004) Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242: 215-248.
- **Rangel Frausto M.S., Wiblin T., Blumberg H.M., Saiman L., Patterson J., Rinaldi M. et al.** (1999) National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin. Infect. Dis.* 29: 253-258.
- **Reagan D.R., Pfaller M.A., Hollis R.J. and Wenzel R.P.** (1995) Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* infection causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. *Diagn Microbiol. Infect. Dis.* 21: 191-4.

- **Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. and Ettayebi, M.** (1993a) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 1179-184.
- **Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A. and Ettayebi M.** (1993b) *J. Essent. Oil. Res.* Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *J. Pharm. Belg.* 48: 352-356.
- **Remmal A.** (1994) Activités antibactériennes et antivirales des huiles essentielles d'origan, de girofle et de thym. Thèse de doctorat d'état ès-sciences naturelles. Faculté des sciences Dhar El Mehraz. Fés
- **Rex J.H., Rinaldi M.G. and Pfaller M.A.** (1995) Resistance of *Candida* species to fluconazole (Minireview). *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1-8.
- **Reynolds J.E.F.** (1996) Martindale – *the Extra Pharmacopoeia* 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.
- **Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui Elaraki A., Sendide K. and Remmal A.** (2003) The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oil s and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil. Res.* 15:286-292.
- **Richardson K., Brammer, K.W., Marriot M.S. et al.** (1985). Activity of UK-49, 858, a bis triazole derivative, against experimental infection with *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 832-835.
- **Ross S.A., El-Keltawi N.E. and Megalla S.E.** (1980) Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. *Fitoterapia* 51: 201–205.
- **Roulier G.** (1992). Les huiles essentielles pour votre santé; Traité pratique d'aromathérapie: Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Ed Dangles. France.
- **Rustchenko-Bulgac E. and Howard D.** (1993). Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 139:1195-1207.
- **Ryder NS. and Favre B.** (1997) Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 8: 275-386.
- **Ryley J F. and McGregor S.** (1986) Quantification of vaginal *Candida albicans* infections in Rodents. *J. Med. Vet. Mycol.* 24: 455- 460
- **Salgueiro L.R., Cavaleiro C., Pinto E Pina-Vaz C Rodrigues A G., Palmeira A.,Tavares C., Costa-de Oliveira S., Goncalves M J. and Martinez-de- Oliveira J.** (2003). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. *PLanta Med.* 69: 871-874.

- **Samaranayake L.P. and Scully.C.** (1989) *Oral candidiasis in HIV infection*. Lancet ii: 1491-1492.
- Samaranayake Y.H. and Samaranayake L.P.** (2001) Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 398-429.
- **Sarbach R.** (1962). Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères. Etude des propriétés antibactériennes de 54 huiles essentielles. Thèse de doctorat d'université. Rennes.
- **Santangelo R., Paderu P., Delmas G., Chen Z-W., Mannino R., Zarif L. and S.Perlin D.** (2000) Efficacy of Chochleate-Amphotericin B in a mouse Model of Systemic Candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2356-2360.
- **Sauvage C.** (1974) L'état actuel de nos connaissances sur la flore du maroc. Colloque du CNRS n° 235, la flore du bassin Méditerranéen. Paris.
- **Sawaya B.P., Briggs J.P. and Schnermann J.** (1995) Amphotericine B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. *J. Am. Soc.Nephrol.* 6: 154-164.
- **Scudamore J.A., Tooley P.J.H. and Allcorn R.J.** (1992) The treatment of acute and chronic vaginal Candidosis. *Br. J. Clin. Prac.* 46: 260-263.
- **Scully C., El-Kabir M. and Samaranayake L.P.** (1994) *Candida* and Oral candidosis: a review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 5:125-157.
- **Schwartz D.** (1984). *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes* Flammarion Médecine Sciences, Paris, pp. 153.
- **Schwartz R., Davi R. and Hilton T.J.** (1992) Effect of temporary cements on the bond strength of a resin cement. *Am. J. Dent.* 5: 147-150.
- **Shapiro S., Meier A. and Guggenheim B.** (1994) The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral. Microbiol. Immunol.* 9: 202-208.
- **Sheehan D.J., Hitchcock C.A., and Sibley.C.M.** (1999) Current emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(1): 40-79.
- **Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M. and Al-Ahdal M.N.** (1996) Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci. Res.* 24: 185-186.
- **Simeon de Buochberg M.** (1976) Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de ses constituants. Thèse de doctorat d'Etat és Sciences Pharmaceutiques. Montpellier.

- **Skandamis P.N. and Nychas G.J.E.** (2001) Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1011-22.
- **Sobel J.D. and Muller G.** (1983) Comparison of ketoconazole, Bay N7133, and Bay L9139 in the treatment of experimental vaginal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 434-436.
- **Sobel J.D. and Muller G.** (1984a) Comparison of itraconazole and ketoconazole in the 4-436. treatment of experimental candidal vaginitis. *Antimicrob. Agents.Chemother.* 26: 266-267.
- **Sobel J.D. and Muller G.** (1984b) Ketoconazole in prevention of experimental candidal vaginitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 281-282.
- **Sobel J.D., Muller G and McCormick J.F.** (1985) Experimental chronic vaginal candidosis in rats. *Sabouraudia.* 23: 199-206.
- **Sobel J D.** (1988) Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 544: 547-557.
- **Sobel J D.** (1992). Pathogénese and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 14: S148-S153.
- **Sobel J D., Hesegawa F., De Bernadis F., Adriani G., Pellegrini A., Cassone P L., Fidel C., Haidaris A G., Gigliotti D., Harmsen S., Fujita K., Yamamoto K., Makimura K., Shibuya K, Uchida K and Yamaguchi H.** (1998) Selected animal models: Vaginal candidosis, *Pneumocytosis pneumonia*, *dermatophytosis* and *trichosporonosis*. *Med. Mycol.* 36: 129-136.
- Sourai P.G.** (1989). Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry: a review. *Odontostomatol. Proodos.* 43(5): 399-408.
- **Spinillo A.Z., Capuzzo E., Acciano S. et coll.** (1999). Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180: 14-17.
- **Stevens D A., Calderon L., Martinez M., Clemons K V., Wilson S J. and Selitrennikoff C P.** (2002) Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida* vaginitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 361-364.
- **Suresh B., Sriram S., Dhanaraj S.A., Elango K. et chinna swamay K.** (1997). Anticandidosis activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J. Ethnopharmacol.* 55: 151-159.

- **Suhr K.I. and Nielsen P.V.** (2003) Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* 94: 665-674.
- **Tantaoui-Elaraki A., Errifi A., Benjilali B. and Lattaoui N.** (1992) Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista Italiana.* 6: 13-23.
- **Tantaoui-Elaraki A., Lattaoui N. and Errifi A.** (1993a) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonetti*, *T. zygis* and *T. satureioides*. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 45-53.
- **Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H. and Errifi A.** (1993b) Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 535-545.
- **Ultee A., Kets E.P.W. and Smid E.J.** (1999) Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4606-4610.
- **Ultee A., Bennik M.H.J. and Moezelaar R.** (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1561-1568.
- **Utz J.P.** (1972). Flucytosine. *N. Engl. J. Med.* 286: 777-778.
- **Valnet J** (1990) *Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes*. 11^{ème} Maloine edition. Paris
- **Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P. et Cilapraz J.** (1978) L'aromatogramme: nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant. Med. Phytother.* 1: 43-52. 1992
- **Vanden Bosshe H., Marichal P., Odds F.C., Le Jeune L. and Coene M.C.** (1992) Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2602-2610.
- **Vaudry W.L., Tierney A.J. and Wenman W.M.** (1988) Investigation of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *J. infect. Dis.* 158:1375-9.
- **Varel V.H** (2002) Live stock manure odor abatement with plant derived oils and nitrogen conservation with urease inhibitors: A review 1. *J. Anim. Sci.* 80: E1-E7.
- **Vazquez J.A., Arganoza M.T., Boikov D., Vaishampayan J.K. and Akins R.A.** (2000). *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev Iberoam. Micol.* 17: 60-63.
- **Vigne P.** (1987) La France et ses productions aromatiques végétales actuelles. *Parfums, Cosmétiques, Arômes.* 78: 97-103.

- Villanueva A., Gotuzzo E., Arathoon E., Noriega L.M., kartsonis N.A., Lupinacci R.J., Smietana J.M., Di Nubile M.J. and Sable C.A. (2002) A randomized double- blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal Candidiasis. *Am. J. Med.* 113:294-299.
- Viollon C., Leger D. et Chaumont J.P. (1993) Activités antagonistes *in vitro* de certains composés volatils naturels vis-à-vis de germes de la flore vaginale. *Plant. Med. Phytother.* 26: 17-22.
- Viollon C. and Chaumont J.P. (1994) Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 128: 151-153.
- Walsh S.E., Maillard J.Y., Russel A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. and Bartolo R.G. (2003) Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94: 240-247.
- Willocks L., Leen C.L.S., Brettile R.P., Urquhard D., Russel T.B. and Milne L.J.R. (1991) Fluconazole resistance in AIDS patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 937-939.
- Walsh S.E., Maillard J.Y., Russel A. D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. and Bartolo R.G. (2003) Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94: 240-247.
- Walsh T., Lee J., Lecciones J. et al (1991). Empiric therapy with amphotericin B in febrile granulocytopenic patients. *Rev. Infect. Dis.* 13: 496-503.
- Walsh T.J., Hathorn W.W., Sobel J.D et al. (1991) Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in cancer patients with invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1026-1031.
- Walsh T.J., Finberg R.W., Arndt C., Hiemenz J., Shwartz C., Boudensteiner D. et al (1999) Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia National Institut of Allergy and Infectious Diseases. Mycoses Study Group. *N Engl. J. Med.* 340: 764-771.
- Wang F., Yang D., Ren S., Zhang H. and Li R. (1999) Chemical composition of essential oil from leaves of *listea cubeba* and its antifungal activities. *Zhong. Yao. Cai.* 22(8): 400-402.
- Warren N.G. and Shadomy H.G. (1991) *Yeast of medical importance*. In: Balows A, Hausler W.J, Herrman K.L, Isenberg H.D, Shadomy H.J. (1991). eds. *Manuel of clinical microbiology*, 5th edn. Washington: ASM, 617-629.
- Willocks L., Leen C.L.S., Brettile R.P., Urquhard D., Russel T.B. and Milne L.J.R. (1991) Fluconazole resistance in AIDS patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 937-939.

- **Wira C.R., Richardson J. and Prabhala R.** (1994) *Endocrine regulation of mucosal immunity: effect of sex hormones and cytokines on the afferent and efferent arms of the immune system in the female reproductive tract*, p.705–718. in *Ogra P.L, Mestecky J.J and Lamm M.E. (ed.), Handbook of mucosal immunity*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- **Yoshida M.** (2004) Guidelines for management of deep mycoses in neutropenic patients. *Nippon Ishinki Gakkai Zasshi*. 45: 209-215.
- **Wu T., Samaranayake L.P., Cao B.Y. and Wang J.** (1996) *In vitro* proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J. Med. Microbiol.* 44: 311-316.
- **Youssef R.T. and Tawil G.G.** (1980) Antimicrobial activity of volatile oils. *Die. Pharm.* 35: 698-701.