

Effet synergique d'extraits de cannelle et de canneberge sur l'inhibition de l'adhésion d'*Escherichia coli* uropathogène aux cellules épithéliales de la vessie

Synergistic Effect of Cinnamon and Cranberry Extracts on the Inhibition of Uropathogenic *Escherichia coli* Adherence to Uroepithelial Cells

A. Leblanc · C. Blondeau · S. Holowacz · C. Langlois · L. Haddioui

© Lavoisier SAS 2019

Résumé L'effet inhibiteur des proanthocyanidines (PACs) de type A de la canneberge sur l'adhésion d'*Escherichia coli* aux cellules uroépithéliales est bien documenté. Cette adhésion étant une des étapes précoces des infections urinaires (IU), la canneberge est utilisée dans la prévention de ces infections. La cannelle étant une autre source alimentaire de PACs de type A, nous avons testé son potentiel antiadhésif dans un modèle in vitro de cellules épithéliales de vessie humaine (lignée cellulaire T24). Dans ce modèle, un extrait de cannelle de Ceylan standardisé à plus de 8 % de PACs de type A2 a inhibé l'adhésion d'*Escherichia coli*. L'effet observé était dépendant de la dose de PACs. Les tests effectués en association avec un extrait de canneberge ont montré un effet synergique entre les deux extraits associés en certaines proportions. Ces résultats suggèrent que la cannelle pourrait être utile dans la prise en charge des IU.

Mots clés Infections urinaires · Antibiotiques · Proanthocyanidines

Abstract The inhibitory effect of cranberry type-A proanthocyanidins (PACs) on the adhesion of *Escherichia coli* to uroepithelial cells is well known. As this adhesion is one of the early stages of urinary tract infections, cranberry is used for the prevention of these infections. Cinnamon, another food source of type-A PACs, was tested for its non-adhesion potential in an in vitro model of human bladder epithelial cells (T24 cell line). In this model, a Ceylon cinnamon extract standardized to contain more than 8% A2-

type proanthocyanidins (PACs) inhibited the adhesion of *Escherichia coli*. The effect observed was dependent on the dose of PACs. Tests carried out in combination with a cranberry extract have shown a synergistic effect between the two extracts combined in certain proportions. These results suggest that cinnamon may be useful in the management of urinary tract infections.

Keywords Urinary · Tract · Infection · Antibiotics · Proanthocyanidins

Introduction

Les infections urinaires (IU) sont causées par la prolifération anormale d'agents infectieux qui remontent dans les voies urinaires jusqu'à la vessie. Dans la grande majorité des cas, l'uropathogène responsable est une souche d'*Escherichia coli* [1]. En effet, il a été rapporté que 70 à 95 % des IU sans complications étaient d'abord provoquées par *Escherichia coli*, puis par *Staphylococcus saprophyticus* (5 à 15 %) et des bactéries aérobies à Gram négatif comme *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* (1 à 2 % [2]). La première étape de la colonisation est l'adhésion d'*Escherichia coli* à l'uroépithélium [1]. Le mécanisme implique des fimbriae, des appendices protéiques exprimés par *Escherichia coli* et les adhésines associées grâce auxquelles la bactérie se lie aux récepteurs situés sur les cellules uroépithéliales [1–3]. Le traitement de l'IU aiguë et/ou récurrente par antibiothérapie soulève actuellement de nombreuses questions en termes de santé, et la recherche d'alternative thérapeutique est active. Dans ce contexte, la canneberge a fait l'objet de nombreuses études.

La canneberge, utilisée depuis longtemps dans la prise en charge des IU, essentiellement en prophylaxie [3–5], a en effet été identifiée comme un inhibiteur dose-dépendant de

A. Leblanc (✉) · C. Blondeau · S. Holowacz · C. Langlois
Groupe PiLeJe, 37, quai de Grenelle,
F-75015 Paris cedex 15, France
e-mail : a.leblanc@pileje.com

L. Haddioui
Fonderephar, 35, chemin des Maraîchers,
F-31062 Toulouse cedex 09, France

l'adhésion d'*Escherichia coli* aux cellules uroépithéliales [3–14]. Cet effet inhibiteur est attribué aux proanthocyanidines (PACs) présentes en grande quantité dans la canneberge, qui empêchent la liaison des fimbriae aux récepteurs [7,8]. Les PACs sont des tanins condensés largement répandus dans l'alimentation (fruits, vin, thé, etc.) qui jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits et spécialement des vins. Il s'agit d'une famille de molécules variées puisqu'une trentaine de PACs dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées. Les PACs issues de la canneberge sont particulières, puisque ce sont des PACs de type A, contrairement à celles trouvées dans les autres sources de PACs qui sont de type B. Les PACs de type A se caractérisent par des doubles liaisons entre les unités monomériques, alors que les PACs de type B ne contiennent que de simples liaisons. Cette différence structurale confère une certaine rigidité aux PACs de type A et probablement une conformation particulière pouvant être importante pour la reconnaissance par les adhésines des bactéries et la formation et le passage des métabolites actifs dans les urines.

Il est intéressant de noter qu'aucun effet antiadhésif sur les bactéries présentes dans l'urine humaine n'a été observé après consommation de chocolat noir, raisin, pomme ou thé vert, sources de PACs contenant uniquement des liaisons de type B [9]. Les PACs de type B isolées de ces aliments n'avaient pas non plus d'activité *in vitro* significative.

La cannelle a été identifiée comme une autre source de PACs de type A (en plus des PACs de type B [15–17]) menant à l'hypothèse que cette plante pourrait avoir des effets semblables à ceux de la canneberge. Or, ses propriétés antiadhésives vis-à-vis des uropathogènes n'ont jamais, à notre connaissance, été testées. Dans cette étude *in vitro*, nous avons d'abord évalué si un extrait de cannelle standardisé avait la capacité d'inhiber l'adhésion d'*Escherichia coli* aux cellules épithéliales de la vessie avant d'évaluer si l'effet de cet extrait associé à celui d'un extrait de canneberge était additif ou synergique.

Matériel et méthodes

Extraits de canneberge et de cannelle

Un extrait aqueux de canneberge (*Vaccinium macrocarpon*) contenant 10 à 15 % de PACs (méthode DMAC ; lot n° BFR-0630182) a été obtenu auprès de CHR Hansen (France). L'extrait de cannelle utilisé est la fraction soluble d'une poudre d'écorce délipidée de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl (coproduit d'extraction au CO₂ supercritique ; origine de la matière première : Chine ; ChalCinn[®], PiLeJe Industrie, France ; lot n° D-10J23). L'extrait est standardisé à plus de 8 % de PACs de type A2 (BL-DMAC) et ne contient pas

d'huile essentielle. Pour les expériences, une extraction aqueuse de l'extrait de cannelle a été effectuée afin d'obtenir la fraction soluble titrée à 0,29 % de PACs.

Culture de cellules épithéliales de vessie et d'*Escherichia coli*

Les cellules uroépithéliales humaines, lignée cellulaire T24 (ATCC HTB-4 ; lot n° 2406038), ont été mises en culture dans un milieu RPMI supplémenté avec des acides aminés non essentiels (concentration finale : 1 %), de la glutamine (concentration finale : 1 %), des antibiotiques (concentration finale : 1 %) et du sérum fœtal de veau (concentration finale : 10 %) à 37 °C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 1 × 10⁵ cellules/ml ou 2 × 10⁵ cellules/ml dans des plaques de 24 puits.

L'*Escherichia coli* UTI89 (origine : souche clinique de pyélonéphrite humaine, Prof. Oswald, Toulouse, France) a été repiquée dans un milieu trypticase soja à 37 °C. Une suspension bactérienne à 55–58 % a été réalisée à 640 nm dans 5 ml d'eau distillée stérile ; 1 ml a été ajouté à 9 ml de bouillon trypticase soja additionné de 30 µl d'adénine tritiée (concentration finale approximative : 1 × 10⁷ cellules/ml). Puis le mélange a été incubé à 37 °C pendant 24 heures afin de permettre l'incorporation de l'adénine tritiée. Ensuite, les bactéries ont été centrifugées à 3 600 rpm pendant dix minutes à 5 °C, lavées trois fois dans du PBS afin d'éliminer le radiomarqueur non incorporé, puis suspendues dans un milieu McCOY 5A à raison d'une concentration de 1 × 10⁸ cellules/ml.

Test de cytotoxicité

Les effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales de la vessie ont été déterminés par un test XTT.

Les cellules épithéliales de la vessie ont été ensemencées à 2 × 10⁵ cellules/ml dans des plaques de microtitration : 96 puits à fond plat pendant 24 heures. Le milieu de culture (RPMI 1640) a ensuite été retiré et les plaques lavées au PBS. Les doubles dilutions d'extraits de cannelle (de 100 à 0,2 %, soit de 0,29 g de PACs/100 µl à 0,58 µg de PACs/100 µl) et d'extraits de canneberge (de 10 à 0,02 %, soit de 1 g de PACs/100 µl à 2 µg de PACs/100 µl) ont été testées ; le milieu a été utilisé comme témoin négatif et le phénol comme témoin positif. Cent microlitres de chaque concentration test ont été ajoutés à huit puits des microplaques contenant les cellules (2 × 10⁵ cellules/ml).

Après incubation à 37 °C pendant deux heures et un lavage au PBS, 100 µl de XTT (acide sodium 3'-[1-(phénylamino)-carbonyl]-3,4-tétrazolium]-bis(4-méthoxy-6-nitro) benzène-sulfonique hydraté ; 1 mg/ml)/coenzyme Q10 (0,2 mg/ml) ont été ajoutés dans chaque puits. Après trois heures d'incubation, 100 µl d'une solution

de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10 % ont été ajoutés. L'absorbance a été immédiatement mesurée à 450 nm (spectrophotomètre Polarstar, BMG, France). Le pourcentage de viabilité a été calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Viabilité} = \left(\frac{\text{IDO des échantillons traités} - \text{DO des échantillons non traités}}{\text{DO des échantillons non traités}} \right) \times 100$$

Le produit a été considéré comme cytotoxique en cas de viabilité inférieure ou égale à -30 %. Le test a été considéré comme valide avec une viabilité pour le témoin positif inférieure ou égale à -50 %.

Inhibition de l'adhésion

Une suspension bactérienne d'*Escherichia coli* à 1×10^8 bactéries/ml a été traitée pendant 30 minutes par les produits seuls ou associés. Deux témoins ont été utilisés pour la validation du test : témoin positif (5 mg/ml de phénol) et témoin négatif (cellules non traitées par les produits). Les extraits de canneberge et de cannelle ont été testés à trois concentrations et dose-équivalente de PACs à partir des concentrations non cytotoxiques (utilisation dans un milieu RPMI ; Tableau 1). Les neuf combinaisons ont été testées pour les trois concentrations afin d'évaluer l'effet additif ou l'effet synergique.

Le mélange d'*Escherichia coli* préincubé (500 µl) a été transféré sur les plaques contenant les cellules épithéliales de la vessie. Après deux heures de co-incubation, deux lavages au PBS ont été effectués afin d'éliminer les produits et les bactéries non adhérentes. Les cellules et bactéries adhérentes ont été incubées pendant 12 heures à 37 °C dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N à 0,1 % de SDS. Ensuite, 2 ml de liquide de scintillation ont été ajoutés pour mesurer la radioactivité.

Les résultats ont été exprimés sous la forme d'un pourcentage de l'effet inhibiteur d'adhésion (%) = $\left(\frac{\text{Moyenne CPM essai} - \text{Moyenne CPM témoin sans traitement}}{\text{Moyenne CPM témoin sans traitement}} \right) \times 100$.

Chaque essai a été réalisé quatre fois.

L'association des deux extraits a été considérée comme synergique lorsque l'effet inhibiteur d'adhésion était supérieur de 30 % minimum à la somme des effets individuels.

Les résultats ont été exprimés sous la forme moyenne \pm écart-type.

Tableau 1 Concentrations auxquelles les extraits de canneberge et de cannelle ont été testés		
PAC (µg)	Canneberge (%)	Cannelle (%)
0,205	$2,04 \times 10^{-6}$	$6,40 \times 10^{-5}$
0,041	$4,1 \times 10^{-7}$	$1,28 \times 10^{-5}$
0,0084	$8,2 \times 10^{-8}$	$2,56 \times 10^{-6}$

Résultats

Un test de cytotoxicité a été réalisé pour écarter l'hypothèse que l'effet des deux extraits de plantes sur l'adhésion pourrait être dû à un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales de la vessie. D'après les pourcentages de viabilité observés, l'extrait de cannelle n'était pas cytotoxique aux concentrations inférieures ou égales à 12,5 % et celui de canneberge ne l'était pas à des concentrations inférieures ou égales à 0,16 % ; les phénols ont inactivé 100 % des cellules.

Testés séparément, les extraits de canneberge et de cannelle ont tous deux inhibé l'adhésion d'*Escherichia coli* aux cellules épithéliales de la vessie, l'effet étant dépendant de la dose de PACs (Fig. 1). À la dose de 0,0084 µg, l'adhésion aux cellules épithéliales de la vessie a diminué de -14,71 % \pm 6,83 avec la cannelle et de -15,74 % \pm 6,08 avec la canneberge ; avec une dose de 0,041 µg, la diminution était de -19,55 % \pm 3,11 avec la cannelle et de -30,54 % \pm 2,69 avec la canneberge ; avec une dose de 0,205 µg, l'adhésion a diminué de -33,23 % \pm 2,85 avec la cannelle et de -53,29 % \pm 1,93 avec la canneberge.

Un effet synergique de la cannelle et de la canneberge a été observé avec cinq des neuf associations de concentrations de PACs testées (Tableau 2). L'effet était supérieur d'au moins 30 % à la simple somme des effets des ingrédients séparés pour les concentrations de PACs suivantes : canneberge 0,041 µg/cannelle 0,041 µg, canneberge 0,041 µg/cannelle 0,0084 µg, canneberge 0,0084 µg/cannelle 0,205 µg, canneberge 0,0084 µg/cannelle 0,041 µg, canneberge 0,0084 µg/cannelle 0,0084 µg. Un effet additif a été rapporté pour les quatre autres associations.

Discussion

Traiter les IU, en particulier récidivantes, sans induire de résistance est un problème crucial en pratique clinique. Les antibiotiques sont fréquemment prescrits et généralement efficaces. Cependant, une recolonisation bactérienne ou une réinfection à cause de la présence de réservoirs bactériens peuvent conduire à des récurrences [18]. De plus, les infections à répétition sont fréquentes : entre 25 et 35 % des femmes qui ont une IU connaîtront au moins un épisode de récurrence l'année suivante [19]. L'utilisation répétée d'antibiotiques est un facteur connu de développement de bactéries multirésistantes. En outre, un effet néfaste sur le microbiote vaginal et intestinal commensal a récemment été rapporté [1]. En raison de la fréquence des IU récidivantes, il est essentiel d'identifier des solutions alternatives efficaces aux antibiotiques. Dans cette étude, un extrait de cannelle standardisé en PACs de type A a inhibé l'adhésion d'*Escherichia coli* aux cellules épithéliales de la vessie, comme cela a été préalablement rapporté pour la canneberge.

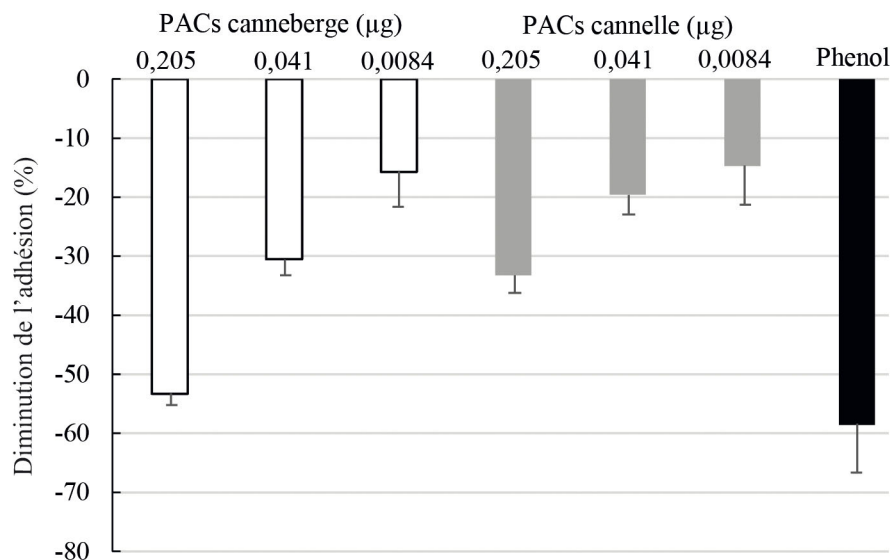


Fig. 1 Inhibition de l'adhésion d'*Escherichia coli* aux cellules épithéliales de vessie par des extraits de cannelle et de canneberge testés séparément. Les résultats correspondent à la valeur moyenne des quatre tests effectués (%) ± ET

Extrait/PAC	Cannelle		
	0,205 µg	0,041 µg	0,0084 µg
Canne- berge	0,205 µg -78,65 % ± 3,35	0,041 µg -67,29 % ± 1,19	0,0084 µg -63,84 % ± 2,80
	0,041 µg -77,14 % ± 3,35	-81,83 % ± 3,35	-79,37 % ± 5,39
	0,0084 µg -80,82 % ± 2,78	-72,71 % ± 5,08	-70,08 % ± 2,66

Diminution de l'adhésion (moyenne ± écart-type) comparée au témoin négatif ; en gras : effet synergique (inhibition au minimum 30 % supérieure à la somme des effets séparés) ; police non gras : effet additif

Ces propriétés antiadhésives pourraient contribuer à la prévention des IU. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui montre un tel effet avec un extrait de cannelle. Il est intéressant de noter que les tests effectués en association avec un extrait de canneberge montrent un effet synergique entre les deux extraits. L'effet synergique observé avec certaines concentrations de PACs était supérieur d'au moins 30 % à la simple somme des effets des ingrédients séparés. Si des études supplémentaires seront nécessaires pour étudier les mécanismes sous-jacents à cette synergie, une association canneberge–cannelle pourrait être une stratégie prometteuse pour limiter les IU et le recours aux antibiothérapies.

Par ailleurs, la cannelle a d'autres propriétés qui pourraient également être intéressantes en cas d'IU comme une action anti-inflammatoire [17,20–23]. Les données disponibles dans la littérature sur les effets antimicrobiens de la cannelle concernent principalement le transcinnamaldéhyde

présent essentiellement dans l'huile essentielle de cannelle. Il a été démontré qu'une supplémentation par voie orale de transcinnamaldéhyde réduisait la colonisation par une souche uropathogène d'*Escherichia coli* dans un modèle murin [21]. Utilisé comme agent de traitement des surfaces ou dans les solutions de remplissage des cathéters, le transcinnamaldéhyde pourrait limiter les IU chez l'homme contractées en milieu hospitalier [20]. S'il convient de noter que l'extrait de cannelle que nous avons testé ne contient pas d'huile essentielle, une étude récente a détecté la présence de transcinnamaldéhyde dans un extrait éthanolique [24].

Outre son action antiadhésive, la canneberge peut, elle aussi, réduire les symptômes des IU grâce à des mécanismes anti-inflammatoires, en supprimant les cascades inflammatoires en réponse à une invasion bactérienne [3]. La canneberge est également connue comme source importante d'antioxydants. Des études conduites dans des modèles animaux ont montré que les extraits de canneberge pouvaient

réduire la protéine C réactive et les cytokines pro-inflammatoires. Ici, l'effet synergique a été observé pour une propriété particulière de la canneberge et de la cannelle, à savoir leur action antiadhésive. Il serait intéressant de savoir si cette synergie existe aussi pour d'autres actions.

Nos résultats montrent pour la première fois un effet anti-adhésif d'un extrait de cannelle vis-à-vis d'*Escherichia coli* in vitro. Cet effet est synergique à celui d'un extrait de canneberge lorsqu'elles sont associées à certaines proportions de PACs. Si ces résultats se confirment dans d'autres études, la cannelle sera donc comme un candidat potentiel pour la prise en charge complémentaire ou alternative des IU.

Liens d'intérêts : A. Leblanc, C. Blondeau, S. Holowacz, C. Langlois et L. Haddioui déclarent être salariés du Groupe PiLèJe

Références

- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, et al (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 13:269–84
- Guay DRP (2008) Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs* 68:1169–205
- Vasileiou I, Katsargyris A, Theocharis S, et al (2013) Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutr Res* 33:595–607
- Costantini E, Giannitsas K, Illiano E (2017) The role of non-antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. *Curr Opin Urol* 27:120–6
- Luis Á, Domingues F, Pereira L (2017) Can cranberries contribute to reduce the incidence of urinary tract infections? A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of clinical trials. *J Urol* 198:614–21
- Di Martino P, Agniel R, David K, et al (2006) Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World J Urol* 24:21–7
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, et al (2000) A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Nat Prod* 63:1225–8
- Gupta K, Chou MY, Howell A, et al (2007) Cranberry products inhibit adherence of p-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. *J Urol* 177:2357–60
- Howell AB, Reed JD, Krueger CG, et al (2005). A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry* 66:2281–91
- Howell AB, Botto H, Combescure C, et al (2010) Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double-blind study. *BMC Infect Dis* 10:94
- Lavigne JP, Bourg G, Combescure C, et al (2008) In vitro and in vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect* 14:350–5
- Pinzón-Arango PA, Liu Y, Camesano TA (2009) Role of cranberry on bacterial adhesion forces and implications for *Escherichia coli*-uroepithelial cell attachment. *J Med Food* 12:259–70
- Sobota AE (1984) Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J Urol* 131:1013–16
- Tao Y, Pinzón-Arango PA, Howell AB, et al (2011) Oral consumption of cranberry juice cocktail inhibits molecular-scale adhesion of clinical uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Food* 14:739–45
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, et al (2003) Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J Mass Spectrom* 38:1272–80
- Mateos-Martín ML, Fuguet E, Quero C, et al (2012) New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 402:1327–36
- Rao PV, Gan SH (2014) Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evid Based Complement Alternat Med* 642942
- Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ (2001) Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 69:4572–79
- Liska DJ, Kern HJ, Maki KC (2016) Cranberries and urinary tract infections: how can the same evidence lead to conflicting advice? *Adv Nutr* 7:498–506
- Amalaradjou MAR, Narayanan A, Baskaran SA, et al (2010) Antibiofilm effect of trans-cinnamaldehyde on uropathogenic *Escherichia coli*. *J Urol* 184:358–63
- Narayanan A, Muyyarikkandy MS, Mooyottu S, et al (2017) Oral supplementation of trans-cinnamaldehyde reduces uropathogenic *Escherichia coli* colonization in a mouse model. *Lett Appl Microbiol* 64:192–7
- Parthasarathy HTS (2013) Evaluation of antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* against oral microflora. *Asian J Exp Sci* 27:13–6
- Sivapriya T, John S, Iyer PR (2014) Antibiotic efficacy of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) against urinary pathogens in type II diabetic men. *J Herbs Spices Med Plants* 20:421–6
- Schink A, Naumoska K, Kitanovski Z, et al (2018) Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. *Food Funct* 9:5950–64