



HAL
open science

Le mycobiome oral : méthodes de culture des principales espèces fongiques

Jade Varley

► **To cite this version:**

Jade Varley. Le mycobiome oral : méthodes de culture des principales espèces fongiques. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03098200

HAL Id: dumas-03098200

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03098200>

Submitted on 5 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**LE MYCOBIOME ORAL : METHODES DE CULTURE
DES PRINCIPALES ESPECES FONGIQUES**

Année 2020

Thèse n°42-57-20-27

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nice
Le 02/09/2020 par

Jade VARLEY

Née le 04/09/1992 à Aubagne (13)
Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE (Diplôme d'État)

Examineurs :

Madame le Professeur
Madame le Professeur
Monsieur le Docteur
Madame le Docteur

Marie-France BERTRAND
Isabelle PRECHEUR
Yordan BENHAMOU
Anne LANDREAU

Président du jury
Directeur de thèse
Assesseur
Assesseur

CORPS ENSEIGNANT

56^{ème} section : DEVELOPPEMENT, CROISSANCE ET PREVENTION

Sous-section 01 : ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE ET ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE

Professeur des Universités : Mme MANIERE-EZVAN Armelle
Professeur des Universités : Mme MULLER-BOLLA Michèle
Maître de Conférences des Universités : Mme JOSEPH Clara
Maître de Conférences des Universités Associé : Mme OUEISS Arlette
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme AIEM TORT-ALVAREZ Elody
Assistant Hospitalier Universitaire : Mr CAMIA Julien
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme MASUCCI Caterina

Sous-section 02 : PREVENTION, EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE, ODONTOLOGIE LEGALE

Professeur des Universités : Mme LUPI Laurence
Maître de Conférences des Universités Associé : Mme BORSA Leslie
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme FRENDO Marie
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme MERIGO Elisabetta

57^{ème} section : CHIRURGIE ORALE ; PARODONTOLOGIE ; BIOLOGIE ORALE

Sous-section 01 : CHIRURGIE ORALE ; PARODONTOLOGIE ; BIOLOGIE ORALE

Professeur des Universités : Mme PRECHEUR-SABLAYROLLES Isabelle
Maître de Conférences des Universités : Mr BENHAMOU Yordan
Maître de Conférences des Universités : Mr COCHAIS Patrice
Maître de Conférences des Universités : Mme DRIDI Sophie Myriam
Maître de Conférences des Universités : Mme RAYBAUD Hélène
Maître de Conférences des Universités : Mme VINCENT-BUGNAS Séverine
Maître de Conférences des Universités : Mme VOHA Christine
Assistant Hospitalier Universitaire : Mr BORIE Gwenaël
Assistant Hospitalier Universitaire : Mr CHARBIT Mathieu
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme FISTES Elene-Maria

58^{ème} section : REHABILITATION ORALE

Sous-section 01 : DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE, PROTHESES, FONCTION-DYSFONCTION, IMAGERIE, BIOMATERIAUX

Professeur des Universités : Mme BERTRAND Marie-France
Professeur des Universités : Mr BOLLA Marc
Professeur des Universités : Mme BRULAT-BOUCHARD Nathalie
Professeur des Universités : Mme LASSAUZAY Claire
Professeur des Universités : Mr MAHLER Patrick
Professeur des Universités : Mr MEDIONI Etienne
Professeur des Universités Emérite : Mr ROCCA Jean-Paul
Maître de Conférences des Universités : Mr ALLARD Yves
Maître de Conférences des Universités : Mr CEINOS Romain
Maître de Conférences des Universités : Mme EHRMANN Elodie
Maître de Conférences des Universités : Mr LAPLANCHE Olivier
Maître de Conférences des Universités : Mr LEFORESTIER Eric
Maître de Conférences des Universités : Mme POUYSSEGUR-ROUGIER Valérie
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme ABID Sarah
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme AZAN Cindy
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme BECQUART Mathilde
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme DEMARTY Laure
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme GROSSI Vanina
Assistant Hospitalier Universitaire : Mr LAMBERT Gary
Assistant Hospitalier Universitaire : Mr LONJON Jean-Baptiste
Assistant Hospitalier Universitaire : Mr PARNOT Maximilien

Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la probité dans l'exercice de La Médecine Dentaire.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon Devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'Humanité.

Respectueux et reconnaissant envers les Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Remerciements aux membres du jury,

A Madame le Professeur Marie-France BERTRAND

Docteur en chirurgie dentaire
Docteur de l'université de Nice Sophia-Antipolis
Professeur des universités, Praticien hospitalier

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et je vous en remercie. Vous avez été un soutien pour moi, tout au long de mon cursus. Merci pour votre écoute et votre recherche de solutions pour m'accompagner dans des moments difficiles. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude et de mon respect.

A Madame le Professeur Isabelle PRECHEUR-SABLAYROLLES

Docteur en chirurgie dentaire
Docteur de l'université de Nice Sophia-Antipolis
Professeur des universités, Praticien hospitalier

Vous m'avez accompagnée et soutenue au cours de ce travail. Je vous suis très reconnaissante d'avoir dirigé cette thèse avec soin. J'ai beaucoup appris grâce à vous et je vous en remercie. Je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon respect et profonde estime.

A Monsieur le Docteur Yordan BENHAMOU

Docteur en chirurgie dentaire
Docteur de l'université de Nice Sophia-Antipolis
Maitre de Conférences des Universités, Praticien hospitalier

C'est pour moi un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury et je vous en remercie. Veuillez trouver dans cette thèse l'expression de mon respect.

A Madame le Docteur Anne LANDREAU

Pharmacienne
Maitre de Conférences – HDR de l'Université d'Angers

Je vous remercie pour votre investissement et votre accompagnement tout au long de ce travail. Cette thèse n'aurait pas pu naître sans vous. Merci pour votre rigueur de travail et votre disponibilité.

Dédicaces

A ma Maman, qui a toujours su me pousser à être la meilleure version de moi-même. Ta force et ta joie de vivre sont des valeurs que j'admire. Toujours prête à faire la fête, à être de bonne humeur, merci pour ton énergie sans failles, et merci aussi de ne pas toujours me ménager. Merci de m'avoir guidée et motivée pour que j'arrive aujourd'hui, après quelques turbulences, à mon statut de Docteur !

To my Daddy, always so sweet with me, loving and caring. I can share everything with you, and it makes me feel good to talk to you. You are so supportive and our relationship as father-daughter is amazing. Thank you for always believing in me and making me feel strong. Your investment as a father and the love you give us are exceptional qualities. Merci à Riri, d'avoir toujours été là pour nous, une oreille attentive. Merci pour les conseils pendant les années d'adolescence, ta présence et ton amour.

To my big sister, tu as toujours été mon modèle. J'aime ta détermination à toute épreuve, ton courage. Tu as fait la personne que je suis par ton soutien et ton amour. J'espère toujours garder notre complicité et partager des moments de bonheurs ensemble. Je suis fière de la personne que tu es, je t'aime. And to my little sister Maëlle, tu es si forte, drôle et belle, je crois en toi et je serai toujours là pour toi.

Mon Julien, mon amour, qui a su me supporter pendant ces longs mois, toujours avec humour et bienveillance. J'ai une chance immense de partager mon quotidien avec toi, tu sais rendre la vie si belle. J'aime tout de toi, ta gentillesse, ta façon d'être, ta douceur et ton attention envers moi. Je t'aime à la folie, pour toujours.

Sommaire

1. INTRODUCTION.....	8
2. REVUE DE LA LITTERATURE.....	10
2.1. Les champignons microscopiques ou micromycètes	10
2.1.1. Généralités sur les micromycètes.....	10
2.1.2. Classification morphologique des micromycètes.....	11
2.1.3. Pouvoir pathogène des micromycètes	13
2.1.4. Les antifongiques.....	13
2.1.5. Utilisations industrielles des micromycètes.....	16
2.2. Le mycobiome buccal	16
2.2.1. Généralités sur mycobiome buccal	16
2.2.2. Levures : <i>Candida albicans</i> et autres <i>Candida</i>	17
2.2.3. Levures autres que <i>Candida</i> : <i>Saccharomyces</i>	19
2.2.4. Champignons filamenteux : dermatophytes (<i>Trichophyton</i>)	20
2.2.5. Champignons filamenteux : les moisissures (<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>).....	20
2.2.6. Autres champignons filamenteux (<i>Rhizomucor</i>)	21
2.3. Principes du diagnostic au laboratoire des infections fongiques, appliqués aux prélèvements buccaux	21
2.3.1. Examen direct à l'état frais	21
2.3.2. Culture <i>in vitro</i>	22
2.3.3. Spectrométrie de masse et MALDI-TOFF	22
2.3.4. Biologie moléculaire	23
2.3.5. Examens complémentaires	23
2.4. Objectif de ce travail	24
3. MATERIEL ET METHODES	25
3.1. Les souches testées	25
3.1.1. Souches de référence et souches sauvages	25
3.1.2. Souches sélectionnées	25
3.2. Les milieux de culture utilisés	26
3.2.1. Le milieu gélosé YPDA.....	26
3.2.2. Le milieu gélosé casitone	26
3.2.3. Le milieu liquide YEP	27
3.3. Les inhibiteurs testés.....	27
3.3.1. Les antifongiques testés : amphotéricine B et fluconazole	28
3.3.2. Bain de bouche à la chlorhexidine : Eludril™	28
3.3.3. Saponines de marronnier d'Inde et de solidage.....	29
3.3.4. Dentifrice fluoré	32
3.4. Cultures sur milieu solide	32

3.4.1.	Objectifs des cultures sur milieu solide : isolements, étalements et entretien des souches	32
3.4.2.	Préparation des inoculums	33
3.4.3.	Test d'inhibition en milieu solide : test de diffusion en disque sur gélose	33
3.5.	Cultures en milieu liquide	34
3.5.1.	Objectifs des cultures en milieu liquide	34
3.5.2.	Préparation des inoculums	34
3.5.3.	Test de filamentation et d'inhibition en milieu liquide	35
4.	RESULTATS	37
4.1.	Synthèse des tests réalisés	37
4.2.	Résultats obtenus avec les levures	42
4.2.1.	<i>Candida albicans</i> ATCC902008	42
4.2.2.	<i>Candida glabrata</i> ATCC901085	43
4.2.3.	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	47
4.2.4.	<i>Candida tropicalis</i> , souche sauvage	48
4.2.5.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , souche sauvage	49
4.2.6.	Synthèse des résultats obtenus avec les levures	53
4.3.	Résultats obtenus avec les champignons filamenteux	56
4.3.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	56
4.3.2.	<i>Fusarium sp.</i> , souche sauvage	71
4.3.3.	<i>Penicillium sp.</i> , souche sauvage	78
4.3.4.	<i>Rhizomucor sp.</i> , souche sauvage	84
4.3.5.	<i>Trichophyton rubrum</i> , souche sauvage	84
4.3.6.	Synthèse des résultats obtenus avec les champignons filamenteux	87
5.	DISCUSSION	88
5.1.	Les souches testées	88
5.2.	Les inhibiteurs testés	88
5.3.	Résultats obtenus	89
5.3.1.	Résultats obtenus avec les levures	89
5.3.2.	Résultats obtenus avec les champignons filamenteux	90
5.4.	Perspectives	91
6.	CONCLUSIONS	92
7.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93
8.	LISTE DES TABLEAUX	95
9.	LISTE DES FIGURES	96

1. INTRODUCTION

Selon la classification phylogénétique du vivant, la flore microbienne buccale peut contenir des représentants microscopiques de trois domaines ainsi que de celui des virus. Parmi les procaryotes, dans le domaine des *Bacteria*, plusieurs centaines d'espèces bactériennes peuvent coloniser l'écosystème oral, y compris des bactéries très petites (*ultra-small bacteria*) qui sont des parasites obligés des autres bactéries. Dans le domaine des *Archaea*, qui sont aussi des procaryotes, quelques espèces peuvent être identifiées dans des écosystèmes anaérobies stricts. Dans le domaine des *Eucaryota*, quelques parasites et surtout des champignons microscopiques ou mycètes peuvent aussi coloniser l'écosystème oral. Enfin, des virus et des phages, qui sont des virus de bactéries, sont aussi des colonisateurs réguliers de l'écosystème oral. Tous ces germes constituent le microbiome buccal, qui rassemble le bactériome, le mycobioime et le virome buccal. Des analyses sur des échantillons de flore orale ont montré que, chez un même sujet, la flore variait en fonction des écosystèmes : salive, dos et côtés de la langue, palais dur et palais mou, intérieur des joues, gencive, sulcus ainsi que les dents et les biomatériaux. Des profils microbiens différents sont observés chez les adultes en bonne santé bucco-dentaire, les enfants, les personnes âgées et les malades immunodéprimés.

Les analyses génomiques avec séquençage et alignement de séquences ont permis de créer des arbres phylogénétiques et d'identifier de nouvelles espèces non cultivables de bactéries et de champignons, ainsi que des virus. Ces travaux ont montré comparativement aux espèces non cultivables, celles cultivables n'étaient pas forcément abondantes, ni systématiquement présentes chez tous les sujets dans les infections bucco-dentaires. Dans les lésions carieuses, par exemple, les genres *Streptococcus spp.* (dont *Streptococcus mutans*), *Lactobacillus spp.* et *Actinomyces spp.* ne représentent souvent que moins de 5 %, voire moins de 1 % des bactéries identifiées. Il en est de même pour les bactéries « parodontogènes présomptives », microaérophiles (*Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, etc.), anaérobies strictes (*Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, etc.) et mobiles (*Treponema spp.*) qui colonisent les poches parodontales.

D'autre part, les analyses génomiques couplées à des analyses protéomiques ont aussi révélé des interactions métaboliques entre bactéries-bactéries et bactéries-mycètes. Par exemple, le mycète *Candida albicans* est responsable de la majorité des candidoses orales, mais l'association *C. albicans*-*S. mutans* a été retrouvée dans des caries à progression rapide de l'enfant et dans des péri-implantites.

Enfin, ces analyses ont aussi montré que la présence et le rôle des mycètes étaient très sous-estimés, à l'exception de *C. albicans* qui est à la fois le champignon le plus souvent isolé dans la bouche et le plus facile à cultiver au laboratoire. D'autres espèces et d'autres genres oraux fongiques peuvent être plus difficiles à isoler car ils poussent lentement et avec difficulté sur les milieux de culture. Il s'agit

par exemple d'autres espèces de *Candida* (*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida spp.*), et d'espèces des genres *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Trichophyton*.

Dans le cadre d'un projet global de développer des antifongiques « verts » pour les produits d'hygiène bucco-dentaire, il apparaissait intéressant d'évaluer l'impact d'un extrait naturel, le Bucovia, sur le mycobiome oral. C'est pourquoi des tests d'inhibition *in vitro*, en milieu solide et liquide, ont été réalisés sur dix souches de champignons représentatives de l'écosystème oral : quatre souches de référence et six souches sauvages. En parallèle de l'extrait Bucovia, deux antifongiques d'origine synthétique, un bain de bouche issu du commerce, une molécule naturelle et un dentifrice ont également été évalués.

Cette étude pilote a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice dirigé par le Pr Pierre Marty.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. Les champignons microscopiques ou micromycètes

2.1.1. Généralités sur les micromycètes

Les champignons ou mycètes sont des eucaryotes. Ils appartiennent au règne des *Fungi*, qui est différent du règne des autres eucaryotes tels que les plantes, les animaux et les parasites. Selon les espèces, les champignons peuvent avoir une reproduction asexuée par simple mitose, une reproduction sexuée par fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle, ou les deux. Pour la reproduction, sexuée ou asexuée, il faut que l'appareil végétatif, appelé thalle, ait accumulé suffisamment de cytoplasme.

En Mycologie, le mot "spore" est un terme descriptif d'un corps "rond" par opposition à un filament. Le mot spore peut désigner :

- soit une cellule stérile de quelques μm de long,
- soit une cellule sexuée, un gamète mâle ou femelle,
- soit une forme de résistance en vue de la conservation de l'espèce. Transportées par l'eau, le vent, et les animaux (Surtout les insectes), les spores jouent un rôle majeur dans la dissémination des champignons.

Les micromycètes, encore appelés champignons microscopiques ou champignons inférieurs, sont des micro-organismes unicellulaires, contrairement aux champignons dits macromycètes qui sont les champignons macroscopiques pluricellulaires. Les micromycètes sont généralement des saprophytes qui vivent dans le milieu extérieur sur des substrats organiques en décomposition. Ils peuvent coloniser les plantes et les animaux, et parfois provoquer des maladies appelées mycoses (Anofel, 2016). Les médicaments destinés à traiter les mycoses sont les antifongiques. Il n'existe pas de vaccin contre les champignons pathogènes.

Les champignons pathogènes pour l'homme sont généralement aérobies, avec une température optimale de croissance entre 20 et 37°C et un pH optimal de 7. Ils prolifèrent dans les écosystèmes humides comme les muqueuses ou les zones de macérations des grands et petits plis. En général, la lumière inhibe leur croissance. Les champignons pathogènes synthétisent de nombreuses protéines, enzymes et toxines, et pour certains des antibiotiques. Les enzymes fongiques leur permettent de dégrader et d'utiliser pour leur développement de nombreuses substances qu'ils prélèvent dans le milieu extérieur. Toxines et antibiotiques sont des facteurs de

virulence qui contribuent à leur pouvoir pathogène chez l'Homme et à la compétition avec les bactéries endogènes pour coloniser les mêmes écosystèmes.

Certaines espèces de micromycètes peuvent être cultivées au laboratoire de Mycologie à partir de tout type de prélèvement : peau, sang, liquide pleural, etc. Cependant, les études récentes basées sur la génomique montrent que la plupart des champignons qui colonisent les biofilms cutanés et muqueux ne peuvent pas être identifiés avec les méthodes d'imagerie ni être cultivés *in vitro* (Anofel, 2016).

2.1.2. Classification morphologique des micromycètes

Les micromycètes sont visibles au microscope optique sur prélèvement de liquides biologiques ou de tissus. Selon leur morphologie, ils sont classés en trois groupes : les levuriformes, les filamenteux, et les dimorphiques (Tableau 1).

2.1.2.1. Les champignons levuriformes

Les champignons levuriformes se présentent comme des petites cellules rondes ou ovales, qui se divisent par bourgeonnement (Tableau 1). Le thalle est formé :

- soit de cellules isolées, plus ou moins bourgeonnantes, les levures,
- soit de cellules attachées les unes aux autres, mais sans communications entre elles, faciles à séparer, qui ont un aspect de pseudo-filaments, les filaments pseudo mycéliens.

Les filaments pseudo mycéliens peuvent former de longues chaînes, parfois ramifiées.

Les blastospores sont des spores asexuées produites par bourgeonnement : c'est le mode de reproduction des levures par bourgeonnement.

Les chlamydospores sont des grosses cellules arrondies asexuées : c'est la forme de résistance dans le milieu extérieur (Anofel, 2016; Bouchara et al., 2010).

Tableau 1. Classification des micromycètes selon leur morphologie : principaux genres susceptibles de coloniser les écosystèmes humains et quelques espèces importantes en pathologie humaine (D'après Anofel, 2016)

Levures		Filamenteux		Dimorphiques	
Genres	Espèces	Genres	Espèces	Genres	Espèces
<i>Aureobasidium</i>	<i>A. pullulans</i>	<u>Dermatophytes :</u> <i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>Coccidioides</i>	<i>C. immitis</i> <i>C. posadasii</i>
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	<i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i>	<i>Histoplasma</i>	<i>H. capsulatum</i> <i>H. duboisii</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Trichophyton</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>Pneumocystis</i> ⁴	<i>P. jiroveci</i>
<i>Galactomyces</i>	<i>Galactomyces sp.</i>	<u>Moisissures :</u> <i>Aspergillus</i> ¹	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. terreus</i>		
<i>Malassezia</i>	<i>M. furfur</i>				
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. mucilansosa</i>				
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Fusarium</i> ¹	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>		
		<i>Penicillium</i> ¹	<i>P. marneffeii</i>		
		<u>Autres :</u> <i>Absidia</i> ² <i>Alternaria</i> ³ <i>Cladosporium</i> ³ <i>Epicoccum</i> <i>Geotrichum</i> ¹ <i>Mucor</i> ² <i>Rhizomucor</i> ² <i>Rhizopus</i> ² <i>Scedosporium</i> ¹ <i>Scopulariopsis</i> ¹	<i>A. corymbifera</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>C. carrionii</i> <i>E. nigrans</i> <i>G. candidum</i> <i>M. circinelloides</i> <i>R. pusillus</i> <i>R. oryzae</i> <i>S. apiospermum</i> <i>S. brevicaulis</i>		

¹ Hyalohyphomycètes : champignons à filaments cloisonnés hyalins ; ² zygomycètes : filaments non cloisonnés :

³ phaeohyphomycètes : filaments cloisonnés pigmentés ; ⁴ classification incertaine, ne contient pas d'ergostérol membranaire

2.1.2.2. Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux se développent en formant des filaments (Ou hyphes), ramifiés ou non, qui adhèrent les uns aux autres pour former un mycélium (Ou thalle). Ils ont une reproduction sexuée ou asexuée, avec accroissement de la masse par simple croissance et division des filaments. Les groupes importants sont les dermatophytes et les moisissures (Tableau 1) (Anofel 2016 ; Chabasse et al., 2002 ; Chabasse et al., 2004).

2.1.2.3. *Les champignons dimorphiques*

Enfin, les champignons dimorphiques forment des filaments et des spores lorsqu'ils sont dans l'environnement (Sol, eau), mais ils prennent l'aspect de levures lorsqu'ils infectent l'homme (Tableau 1). Ce sont des mycètes habituellement responsables de mycoses tropicales (Anofel, 2016).

2.1.3. Pouvoir pathogène des micromycètes

Il existe plus d'un million d'espèces de champignons microscopiques, dont 100 environ sont peuvent être pathogènes pour l'homme. Les champignons font partie des flores qui colonisent la peau et les muqueuses en formant des biofilms protecteurs, associés à des bactéries, des parasites et des virus endogènes. Chez les personnes en bonne santé, ils peuvent provoquer des infections superficielles de la peau, des muqueuses, des cheveux et des ongles, chroniques et souvent difficiles à éradiquer, mais sans gravité. Cependant, chez les personnes immunodéprimées, les champignons sont des pathogènes opportunistes, qui donnent des infections systémiques souvent mortelles malgré le traitement antifongique.

2.1.4. Les antifongiques

Les antifongiques utilisés en thérapeutique peuvent présenter deux modes d'action : l'action peut être fongicide, c'est-à-dire qu'elle induit la mort cellulaire par destruction de la paroi membranaire, ou bien fongistatique, qui va empêcher la reproduction des champignons par blocage de la division cellulaire (Braunwald et al., 2002).

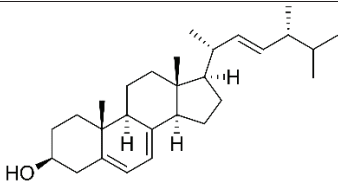
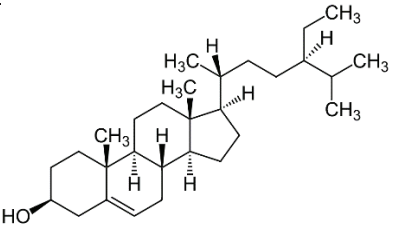
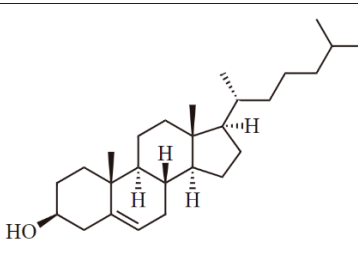
Les principales familles d'antifongiques utilisés contre les mycoses buccales (Candidoses orales) sont des polyènes et des azolés.

2.1.4.1. *Rôle de l'ergostérol membranaire*

De nombreux champignons contiennent des stérols dans leur membrane cellulaire (Ergostérol), comme les plantes (Phytostérols) et les animaux (Cholestérol) (Tableau 2). Les deux principales familles d'antifongiques indiquées contre les candidoses orales sont les polyènes et les azolés, qui agissent contre l'ergostérol membranaire. C'est donc une cible utile pour les médicaments antifongiques, car l'homme ne synthétise pas d'ergostérol mais du cholestérol. D'autre part, les

bactéries n'ont pas de stérols membranaires et les antifongiques dirigés contre la synthèse de l'ergostérol n'ont pas d'action antibactérienne.

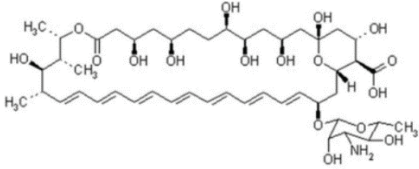
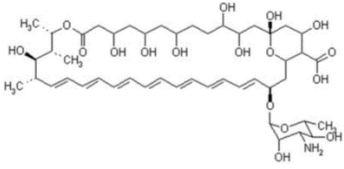
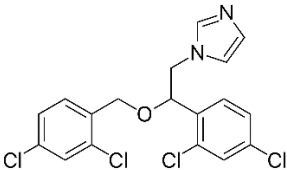
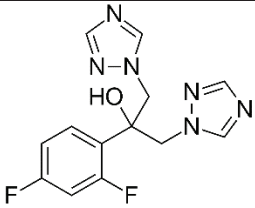
Tableau 2. Structure de l'ergostérol (Micromycètes), de phytostérol (Plantes) et du cholestérol (Animaux). La cible des principaux antifongiques est l'ergostérol membranaire des micromycètes. (D'après Wikipédia consulté le 15/06/2020)

Ergostérol	
Exemples de phytostérol : Beta-sitostérol	
Cholestérol	

2.1.4.2. Les polyènes

Les polyènes se fixent à l'ergostérol de la membrane cellulaire fongique. Cette fixation provoque la formation de canaux perméables aux cations de type K^+ et cette fuite d'ions provoque la mort de la cellule fongique. Les polyènes sont les antifongiques les plus anciens, pour lesquels il n'y a pas de résistance ni de contre-indication. Certains polyènes peuvent être prescrits par les chirurgiens-dentistes pour traiter les candidoses orales : ce sont l'amphotéricine B et la nystatine (Tableau 3). Utilisés sous forme de suspension buvable, ils sont pris en bain de bouche car sont très peu résorbés par la muqueuse digestive et toxiques par voie orale. C'est pourquoi, dans le traitement des candidoses orales, il faut faire durer le temps de contact de l'antifongique avec la muqueuse buccale. L'amphotéricine B liposomale sous forme injectable (Ambisome®) est réservée au traitement des malades immunodéprimés (Leucémies, greffes) qui souffrent d'infections fongiques profondes (Anofel, 2014).

Tableau 3. Les antifongiques indiqués pour le traitement des candidoses orales, chez des personnes qui ne présentent pas de facteurs de risque d'immunodépression. (D'après Wikipédia consulté de 15/06/2020)

Dénomination commune internationale et formulation galénique (Nom commercial)	Structure chimique
Polyènes :	
Amphotéricine B (Fungizone 10 % suspension buvable)	
Nystatine (Mycostatine 100.000 unités/mL, suspension buvable)	
Azolés :	
Miconazole (Daktarin 2 % gel buccal; Loramyc comprimés gingivaux muco-adhésifs)	
Fluconazole (Trifulcan 10mg/mL suspension buvable)	

2.1.4.3. Les azolés

Les antifongiques azolés dérivent du miconazole : fluconazole, isavuconazole, itraconazole, posaconazole, et voriconazole. Comme les polyènes, les azolés agissent aussi sur l'ergostérol, mais en amont, sur sa synthèse. Les azolés recommandés pour le traitement des candidoses orales par les chirurgiens-dentistes sont le miconazole et le fluconazole (Tableau 3). L'itraconazole, le voriconazole et le posaconazole, ainsi que les échinocandines (Caspofungine, anidulafungine), autre classe d'antifongiques plus récente, sont destinés à la prise en charge des candidoses dans un contexte d'immunodépression (Anofel, 2014).

2.1.5. Utilisations industrielles des micromycètes

Certaines levures sont importantes dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Par exemple *Saccharomyces cerevisiae*, encore appelée levure de boulangerie, est utilisé comme ferment alimentaire car il transforme l'amidon en gaz carbonique (Pain) et le glucose en alcool (Vin, bière). (D'après Wikipédia, consulté le 01/07/2020). D'autre part, l'ergostérol est un précurseur de la vitamine D, que l'homme ne sait pas synthétiser. Les aliments ainsi transformés sont enrichis en ergostérol, source indirecte de vitamine D indispensable à l'homme (Emilie Tissandié et al., 2006).

Dans l'industrie pharmaceutique, certains antibiotiques sont obtenus à partir de cultures de champignons microscopiques. Par exemple, les antibiotiques de type pénicilline sont issus de *Penicillium notatum* et *Penicillium chrysogenum*, et la griséovulfine un immunosuppresseur à partir de *Penicillium griseofulvum* (Phillip G. miles et al., 2004).

2.2. Le mycobiome buccal

2.2.1. Généralités sur mycobiome buccal

Plus de 800 espèces bactériennes et 100 phylotypes fongiques peuvent coloniser la bouche et contribuer à la formation du biofilm oral. La plupart des bactéries et des micromycètes ne peuvent être cultivés, mais contrairement aux bactérie le rôle des micromycètes oraux est très peu étudié (Wade 2010). La principale espèce orale cultivable est *Candida albicans*, mais l'écosystème oral peut contenir d'autres espèces de *Candida*, telles que *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, etc. D'autres genres de micromycètes importants dans la fore orale sont *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Trichophyton* and *Wallemia* (Tableau 4) (Ghannoum et al., 2010; Limon et al., 2017).

Il existe un équilibre entre le biofilm et l'hôte, notamment grâce à la salive, une alimentation équilibrée et l'hygiène bucco-dentaire. Cet équilibre limite la prolifération microbienne et le biofilm oral endogène protège l'hôte contre les pathogènes opportunistes (Lof et al., 2017 ; Bowen et al., 2018; Liu et al., 2019). C'est pourquoi les bains de bouche, par exemple, ne doivent pas déséquilibrer le biofilm oral (Wade, 2010). De nombreux sujets sains sont porteurs de *C. albicans*, sous sa forme morphologique de levure. Lorsque les conditions lui deviennent favorables, *C. albicans* peut former

des filaments ou hyphes, qui sont la forme virulente et toxique de ce champignon responsable de candidoses orales (Ghannoum et al., 2010).

Tableau 4. Classification selon leur morphologie des principaux genres et espèces de micromycètes cultivables susceptibles de coloniser l'écosystème oral (D'après Ghannoum et al., 2010; Limon et al., 2017).

Levures		Filamenteux	
Genres	Espèces	Genres	Genres
<i>Aureobasidium</i>	<i>A. pullulans</i>	<u>Dermatophytes :</u> <i>Trichophyton</i>	<i>T. rubrum</i>
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>	<u>Moisissures :</u> <i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	<i>C. glabrata</i>		<i>A. flavus</i>
	<i>C. krusei</i>		<i>A. nidulans</i>
	<i>C. parapsilosis</i>		<i>A. terreus</i>
	<i>C. tropicalis</i>		
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>
<i>Galactomyces</i>	<i>Galactomyces sp.</i>	<i>Penicillium</i>	<i>P. marneffeii</i>
<i>Malassezia</i>	<i>M. furfur</i>		
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. mucilanos</i>	<u>Autres :</u> <i>Alternaria</i>	<i>A. corymbifera</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>C. carrionii</i>
	<i>S. boulardii</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>E. nigrum</i>
		<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>
		<i>Rhizomucor</i>	<i>R. pusillus</i>
		<i>Wallemia</i>	<i>W. sebi</i>

2.2.2. Levures : *Candida albicans* et autres *Candida*

Les *Candida* sont des levures cosmopolites responsables d'infections très fréquentes. Ils sont très résistants dans le milieu extérieur, ce qui nécessite l'application stricte des protocoles d'hygiène en milieu de soin. Les *Candida* ont la particularité de fermenter de nombreux sucres. Ils dégradent aussi la kératine, ce qui leur permet de surinfecter des lésions orales hyperkératinisées du type lichen plan, kératoses frictionnelles ou leucoplasies. Cela augmente le risque de cancérisation des lésions.

Il existe plus de 80 espèces de *Candida*, dont au moins dix potentiellement pathogènes pour l'Homme : *C. albicans*, le plus souvent isolé, *C. glabrata* (Qui colonise souvent les prothèses dentaires), *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* (Qui est naturellement résistant au fluconazole) et *C. auris* (Qui est d'identification récente, encore très rare,

mais résistant à tous les antifongiques) (Institut Pasteur, 2013 ; Sonia Silva et al., 2012, John, Osei Sekyere, 2018).

Les *Candida* font souvent partie des flores endogènes digestives et vaginales, avec *Geotrichum candidum*. Toutes ces espèces peuvent être isolées dans la flore orale, et leur rôle pathogène est à discuter dans chaque cas, surtout chez l'immunodéprimé. Il n'y a pas assez de données scientifiques concernant *C. auris* (K Hirota, 2017).

Les candidoses superficielles aiguës ou chroniques peuvent se développer au niveau :

- oral ;
- digestif : candidoses oesophagiennes (HIV), gastriques, intestinales, ano-rectales;
- unguinal : onyxis, périonyxis;
- cutanée : intertrigo des grands plis et des petits plis ;
- génito-fessier chez les nourrissons.

Les candidoses profondes surviennent chez les malades immunodéprimés. Elles sont de mauvais pronostic :

- candidoses muco-cutanées chroniques ;
- candidoses viscérales ;
- septicémie à *Candida*.

Les candidoses orales (Figure 1 ci-dessous) sont classées en :

- candidoses aiguës : pseudo-membraneuses (« muguet ») ou érythémateuses ;
- candidoses chroniques : pseudo-membraneuses (« muguet »), érythémateuses atrophiques (multifocales) ;
- candidose hyperplasique ou pseudo tumorale (nodulaire) ;
- candidose chronique en foyer : deux lésions médianes (glossite losangique de Brocq et ouranite) et deux lésions latérales symétriques (chéilite angulaire sur la face externe et leucoplasie rétro-commissurale sur la face interne).

Figure 1. Exemples de candidoses orales (Clichés du Pr I. Prêcheur).



Homme de 36 ans. Antécédents : HIV. Candidose aiguë orale et oesophagienne.



Femme de 58 ans. Antécédents : anémie, diabète type 2. Glossite et chéilite angulaire (Perlèche).



Homme de 49 ans. Sans antécédent notable. Candidose nodulaire sous une prothèse partielle amovible inadaptée.



Homme de 53 ans. Antécédents : HIV, hépatite C, tabac, alcool, héroïne. Leucoplasie rétro-commissurale surinfectée par *Candida albicans*

2.2.3. Levures autres que *Candida* : *Saccharomyces*

Très présentes dans l'alimentation (Fruits, légumes, pain, etc.), les levures du genre *Saccharomyces* ont un pouvoir pathogène très faible. On les retrouve principalement à l'état commensal dans la flore digestive car elles sont utilisées comme agents de fermentation, en particulier *S. cerevisiae* pour fabriquer la bière et le pain, et *S. boulardii*, qui est utilisée comme probiotique en traitement des diarrhées.

Seules trois conditions peuvent conduire à un passage de la levure dans le sang et les urines : une mauvaise utilisation d'anti-diarrhéiques, un déséquilibre de la flore intestinale et/ou un état général très affaibli ou immunodéprimé (Bouchara et al., 2010).

2.2.4. Champignons filamenteux : dermatophytes (*Trichophyton*)

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux cosmopolites, responsables d'infections très communes. Ils ne font pas partie de la flore cutanée normale, mais comme ils dégradent la kératine ils peuvent être responsables de dermatophyties superficielles :

- peau : herpès circiné, eczéma marginé de Hébra, acromies, pied d'athlète ;
- ongles : onychomycoses ;
- cheveux : teigne, teigne tondante ;
- poils : sycosis de la barbe.

La transmission est directe (Interhumaine, animaux, sol) ou indirecte (Brosses à cheveux, peignes, bonnets, etc). Le traitement repose en général sur la griséfuline per os pendant plusieurs semaines, car le traitement local est inefficace (Chabasse et al., 2004).

2.2.5. Champignons filamenteux : les moisissures (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*)

Parmi les champignons filamenteux, les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans la nature. En général, l'infection se déclare chez des sujets immunodéprimés et résulte de l'inhalation de spores. Les aspergilloses s'expriment souvent sous forme de pneumonies suivies d'une dissémination viscérale. Le traitement repose sur des antifongiques par voie intraveineuse, mais les aspergilloses ont un mauvais pronostic en raison du terrain immunodéprimé. Il existe des formes orales destructives, qui donnent des ulcères nécrotiques jaunes ou noirs (Chabasse et al., 2002).

Les *Fusarium* sont des champignons cosmopolites très répandus dans la nature. Certaines espèces peuvent être à l'origine de maladie des plantes (fusarioses), mais aussi de production de mycotoxines qui contaminent les aliments et créent ainsi des infections opportunistes chez l'animal et l'homme qui les consomment (mycotoxicose). Les manifestations pathologiques sont variées : kératites (après un traumatisme), onychis des mains ou des pieds, mycétomes (en zone tropicales), colonisations des lésions de brûlures étendues. Des cas d'infections profondes se retrouvent chez les patients dialysés ou atteints d'hémopathies malignes (Chabasse et al., 2002).

Les *Penicillium* sont également des champignons filamenteux très répandus dans la nature. On les retrouve dans les sols, les denrées alimentaires et sur les matières organiques. Ces champignons sont à l'origine de dégradation des aliments, mais ils servent aussi à la fabrication de fromages et d'antibiotiques de type pénicilline. Ils sont fréquemment impliqués dans des contaminations de laboratoire. Les implications pathologiques de ces champignons sont rares. En effet, une seule espèce (*P. marneffei*) est à l'origine d'infections systémiques chez le patient immunodéprimé (atteint de VIH essentiellement) (Chabasse et al., 2002).

2.2.6. Autres champignons filamenteux (*Rhizomucor*)

Le genre *Rhizomucor* contient trois espèces, mais seule *Rhizomucor pusillus* (qui est l'espèce type) est un pathogène opportuniste. Chez les patients leucémiques en particulier, ce champignon peut causer des mycoses rhinofaciales, cérébrales, pulmonaires et généralisées, engendrant une possible nécrose des tissus infectés. *Rhizomucor pusillus* est un champignon thermophile (température maximale de 54°C), il se développe dans des milieux qui créent de la chaleur comme le compost. La nécessité d'une température élevée rend difficile son étude en laboratoire (Chabasse et al., 2002).

2.3. Principes du diagnostic au laboratoire des infections fongiques, appliqués aux prélèvements buccaux

2.3.1. Examen direct à l'état frais

La flore microbienne buccale est prélevée sur écouvillon sec conservé et transporté au laboratoire de Parasitologie-Mycologie à température ambiante. Le prélèvement oral est remis en suspension dans du sérum physiologique stérile directement ou passé au colorant si nécessaire pour faciliter la visualisation des éléments fongiques (May-Grünwald-Giemsa (MGG), bleu de toluidine, solution de lugol à 2%, bleu au lactophénol, noir chlorazole ou rouge congo). Les champignons pathogènes ont souvent une morphologie différente *in vivo* (Dans les prélèvements) et *in vitro* (En culture). L'examen en microscopie optique permet aussi le comptage des cellules fongiques, pour différencier un champignon endogène, avec des cellules peu nombreuses, d'un champignon pathogène, qui prolifère activement dans la lésion prélevée.

2.3.2. Culture *in vitro*

Les cultures *in vitro* sont indispensables pour faire des isollements et des étalements. Les isollements permettent d'avoir des colonies fongiques isolées pour la numération des cellules vivantes (*Colony forming units* ou CFU), pour l'identification macroscopique, et/ou par MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*, cf. ci-dessous § 2.3.3.), et éventuellement pour l'identification à partir de caractères biochimiques. L'analyse de la fermentation des sucres par *C. albicans* s'appelle un auxanogramme. Les étalements permettent de réaliser des antifongigrammes, car il existe de plus en plus de résistances aux antifongiques, sauf pour l'amphotéricine B et la nystatine.

Les cultures de champignons sont souvent très longues, parfois jusqu'à plusieurs semaines. En effet, les champignons microscopiques ont une croissance lente *in vitro* et *in vivo*, et les traitements antifongiques sont aussi très longs. Un milieu de culture classique des champignons est le milieu de Sabouraud (ou YPDA), qui contient du glucose, de la peptone, de l'agar (Pour les milieux solides gélosés) dilués dans de l'eau. Le milieu de Sabouraud contient souvent un antibiotique, le chloramphénicol, pour inhiber les bactéries du prélèvement et de l'actidione pour inhiber les champignons contaminants en suspension dans l'air (Bouchara et al., 2010).

Il existe de nombreux milieux spéciaux, qui favorisent la filamentation ou l'apparition de spores, par exemple (Chabasse et al., 2002). L'examen des cultures en microscopie optique permet de voir rapidement s'il s'agit d'une levure (filaments pseudo mycéliens, cellules bourgeonnantes) ou d'un champignon filamenteux septé ou non. L'examen microscopique permet aussi de reconnaître les organes de fructification : spores, asques, chlamydo-spores, etc (Chabasse et al., 2002 ; Chabasse et al., 2004 ; Bouchara et al., 2010).

2.3.3. Spectrométrie de masse et MALDI-TOFF

Le MALDI-TOF (qui signifie en anglais *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*) est une technique d'identification fongique basée sur la mesure des masses de protéines de surface des champignons. Cet outil permet une identification rapide, précise et standardisée des microorganismes après culture par spectrométrie de masse. C'est une technique fiable pour une grande majorité des champignons filamenteux, pour lesquels de nombreux travaux ont été réalisés. Le principe est basé sur l'interaction de radiations électromagnétiques avec la matière. Il existe deux méthodes pour analyser le spectre obtenu :

- le comparer à une base de données spectrales ;
- estimer la masse moléculaire des pics obtenus correspondant aux masses de protéines et les comparer avec des masses théoriques obtenues à partir de génomes séquencés (Méthode limitée par le nombre de génomes séquencés) (Bouchara et al., 2010).

2.3.4. Biologie moléculaire

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une méthode d'amplification par duplication de séquences d'ADN ou d'ARN à partir d'une faible quantité de matériel génétique. Pour parvenir à l'identification de l'espèce, elle peut être suivie :

- d'un séquençage, mais la technique est très coûteuse ;
- d'autres techniques comme celle des puces à ADN, qui, après hybridation du produit d'amplification sur des sondes nucléotiques spécifiques, permet une révélation à l'œil nu par colorimétrie.

Le typage moléculaire, quant à lui, permet de déterminer le mode de transmission (origine endogène ou exogène du champignon) et de différencier un portage chronique d'une même souche ou bien la réinfection successive par différentes souches en cas de candidose récidivante. Il passe le plus souvent par l'étude du polymorphisme de séquences nucléotidiques identifiées, comme par exemple la technique MLST (*MultiLocus Sequence Typing*), hautement discriminante et reproductible car les séquences MLST de nombreuses souches sont disponibles dans une base de données (Bouchara et al., 2010).

2.3.5. Examens complémentaires

Selon les cas, il peut être nécessaire de recourir au sérodiagnostic, à des tests immunologiques cutanés, par exemple avec de la candidine, ou à des examens anatomo-pathologiques sur des biopsies ou des frottis. Ces examens anatomo-pathologiques permettront de préciser :

- les rapports entre les champignons et les tissus (Superficiels ou profonds) ;
- les réactions de défense des tissus (Infiltrat inflammatoire, granulome) ;
- le rôle pathogène d'un champignon opportuniste, avec la recherche de filaments pseudo mycéliens ou de spores, par exemple.

En conclusion, le diagnostic clinique des mycoses est souvent difficile, quand il faut différencier un champignon endogène d'un champignon pathogène, identifier un champignon

responsable d'une mycose profonde lors d'une fièvre ne cédant pas aux antibiotiques, ou diagnostiquer un champignon exotique rare.

2.4. Objectif de ce travail

Cette revue de la littérature montre que le rôle des champignons microscopiques dans le mycobiome oral est centré sur *C. albicans* et que les autres champignons, minoritaires et difficiles à cultiver, sont très peu étudiés. Ce travail avait pour objectif d'observer l'activité de différents principes actifs antifongiques ou des extraits végétaux potentiellement antifongiques sur des souches fongiques susceptibles de coloniser la muqueuse orale, en les testant en milieu solide et liquide.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Les souches testées

3.1.1. Souches de référence et souches sauvages

Pour la réalisation de nos tests, nous avons sélectionné deux types de souches fongiques :

- Des souches ATCC (American Type Culture Collection), qui sont disponibles dans le commerce. Ce sont des souches de référence dont la pureté et l'identification sont contrôlées, ce qui assure la reproductibilité des protocoles dans un même laboratoire et entre différents laboratoires, y compris au niveau international.

- Des souches sauvages qui ont été isolées et identifiées, à partir d'échantillons biologiques prélevés chez des malades, par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice.

- Une souche LMA (Laboratoire Mycologique d'Angers), qui est une souche stable génétiquement.

D'après le système de classification décrit par Linné, les abréviations qui caractérisent les souches bactériennes, fongiques et les plantes décrites dans ce travail sont les suivantes :

- sp. signifie *species* en latin, c'est-à-dire « espèce » au singulier, et s'emploie après le nom de genre et signifie « espèce non précisée » ;

- spp. signifie *species plurimae* en latin, et désigne plusieurs espèces non identifiées ou encore non décrites dans un genre ;

- ssp. ou encore subsp. signifie *sub-species* en latin et désigne une sous-espèce.

3.1.2. Souches sélectionnées

Les souches sélectionnées pour ce travail représentent des espèces cultivables potentiellement présentes lors d'infections fongiques de la muqueuse orale. Nous avons débuté les expérimentations sur des souches de levures :

- *Candida albicans*, souche ATCC n°902008,
- *Candida glabrata*, souche LMA n°901085,
- *Candida parapsilosis*, souche ATCC n°22019,
- *Candida tropicalis*, souche sauvage,
- *Saccharomyces cerevisiae*, souche sauvage.

Puis les tests ont été élargis à des souches de champignons filamenteux :

- *Aspergillus fumigatus*, souche ATCC n°0204305,
- *Rhizomucor sp.*, souche sauvage,
- *Penicillium sp.*, souche sauvage,
- *Fusarium sp.*, souche sauvage,
- *Trichophyton rubrum*, souche sauvage.

3.2. Les milieux de culture utilisés

3.2.1. Le milieu gélosé YPDA

Le milieu YPDA signifie *Yeast extract – Peptone – Dextrose – Agar*. Il est également appelé milieu de Sabouraud (D'après le nom du microbiologiste qui l'a créé). Il s'agit d'un milieu d'isolement des champignons filamenteux et levures qui a la caractéristique d'inhiber la croissance bactérienne de par son pH acide (pH=6).

Le milieu YPDA est composé de :

- Peptone 1g / 100 mL
- Glucose massé 2g / 100 mL
- Agar-agar 1,5g / 100 mL
- Eau distillée 100 mL

3.2.2. Le milieu gélosé casitone

Le milieu casitone est le milieu de référence utilisé lors de tests de sensibilités aux antifongiques, en particulier par méthode de diffusion. Il permet une lecture franche des résultats.

Le milieu casitone est composé de :

- Bacto casitone 9 g
- Extrait de levure (Yeast-extract) 5 g
- Citrate de sodium ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 10 g
- Glucose 20 g
- Dihydrogenophosphate de sodium dedocahydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 6,70 g
- Agar-agar 18 g
- Chloramphénicol 0,5 g
- Eau distillée 1000 mL

Les poudres sont incorporées à l'eau distillée stérile dans un bécher dans lequel on place un agitateur magnétique. Le bécher est disposé sur une plaque chauffante qui comporte deux molettes : une pour activer l'agitation (l'agitateur dans le bécher va tourner afin d'obtenir une préparation homogène), et une pour activer le chauffage. La préparation monte en température jusqu'à ébullition puis elle est placée dans un contenant refermable qui sera autoclavé 20 mn à 115°C. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Petri, sous hotte, qui sont ensuite conservées à 4°C.

3.2.3. Le milieu liquide YEP

Le milieu YEP signifie Yeast Extract – Peptone. Il s'agit d'une variation du milieu YPD, sans dextrose. La source de carbone alternative est le glucose. Il est utilisé car il est riche en nutriments essentiels pour la croissance des levures, tels que du carbone, du nitrogène, des minéraux et des vitamines. Ce milieu est recommandé pour la culture de microorganismes aérobies. Ce milieu est utilisé pour favoriser la filamentation des champignons (Chevalier et al., 2018).

Le milieu YEP est composé de :

- Extraits de levure (Yeast extract) 11 mg / mL (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)
- Peptone 22 mg / mL (mcf)
- N-acetyl- α -D-Glucosamine (GlcNac) à 2 % soit 2 g / 100 mL (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)

Le volume total de YEP souhaité étant de 250 mL, nous procédons à un calcul des quantités nécessaires des trois composants qui se présentent sous forme de poudre :

- $11 \text{ mg} \times 250 \text{ mL} = 2,75 \text{ g}$ d'extrait de levures
- $22 \text{ mg} \times 250 \text{ mL} = 5,5 \text{ g}$ de peptone
- $(2 \text{ g} \times 250 \text{ mL}) / 100 \text{ mL} = 5 \text{ g}$ de GlcNac.

De même que pour le milieu gélosé casitone, les poudres sont incorporées à l'eau distillée stérile sous agitateur, puis le milieu est autoclavé. Le flacon sera directement conservé à 4°C après refroidissement.

3.3. Les inhibiteurs testés

Dans le but de développer des antifongiques "verts" pour les produits d'hygiène bucco-dentaire, nous avons testé l'effet de l'extrait Bucovia sur plusieurs souches fongiques. En parallèle, deux

antifongiques utilisés comme contrôles positifs (Amphotéricine B et fluconazole), un bain de bouche commercial à la chlorhexidine également utilisé comme contrôle positif (Eludril™). Une saponine d'origine végétale issue du marronnier d'inde, l'escine, a également été évaluée en comparaison aux solidagosaponines contenues dans l'extrait Bucovia. Des études précédentes ont permis de déterminer *in vitro* et *in vivo* la concentration efficace des solidagosaponines à 0,3 %. Cette concentration a été utilisée sur les autres inhibiteurs afin d'avoir des résultats comparables. Par manque de temps, les cinq inhibiteurs n'ont pas tous été testés sur chaque souche fongique.

3.3.1. Les antifongiques testés : amphotéricine B et fluconazole

L'amphotéricine B, un polyène (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), et le fluconazole, un imidazolé (Arrow, Lyon, France), se présentent sous forme de poudre. Pour les tests d'inhibition en milieu liquide, nous avons dilué l'amphotéricine B et le fluconazole dans le milieu YEP pur pour obtenir une concentration de 0,3 % (Poids/volume), ce qui équivaut à 0,3 g / 100 mL.

3.3.2. Bain de bouche à la chlorhexidine : Eludril™

Les antiseptiques de synthèse utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire sont surtout des bisbiguanides (Chlorhexidine, hexétidine), des phénols (Triclosan) et des ammoniums quaternaires (Chlorure de cétyl piridinium) (Gunsolley, 2010). Eludril (Pierre Fabre, Castres, France) est un bain de bouche qui contient deux principes actifs antiseptiques, la chlorhexidine et un alcool, le chlorobutanol (Tableau 5).

Tableau 5. Composition du bain de bouche Eludril 0,5 mL / 0,5 g pour 100 mL, solution pour bain de bouche (Pierre Fabre, Castres, France).

Substances actives, pour 100 mL :	Quantité :
Digluconate de chlorhexidine	0,100 g
Sous-forme de solution de digluconate de chlorhexidine	0,5 mL
Chlorobutanol hémihydraté	0,5 g

Autres composants : Glycérol, éthanol à 96 %, docusate de sodium, lévomenthol, solution alcoolique d'huile essentielle de menthe, eau purifiée, rouge cochenille A (E124).

Pour les tests d'inhibition en milieu liquide, nous avons dilué Eludril qui est liquide. Le dosage en chlorhexidine étant de 0,5 g / 100 mL (0,5 %), nous avons réalisé la formule suivante :

$$\text{Concentration}_{\text{solution mère}} / \text{Concentration}_{\text{solution fille}} = \text{Volume}_{\text{solution fille}} / \text{Volume}_{\text{solution mère}}$$

La concentration de la solution mère était de 0,5 g /100 mL, celle de la solution fille était de 0,3 g / 100 mL. Le volume total voulu d'extrait souhaité étant de 1 mL (Volume solution fille), alors le volume de solution fille à prélever était de :

$$0,5 / 0,3 = 1,66 \text{ d'où } V_{\text{fille}} / V_{\text{mère}} = 1,66 \rightarrow V_{\text{mère}} = 1 / 1,66 = 0,6 \text{ mL}$$

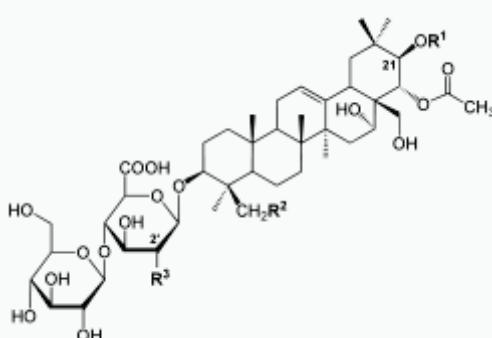
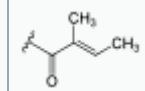
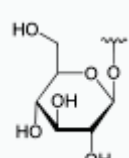
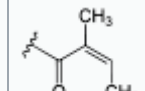
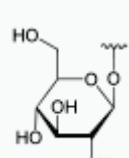
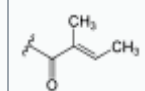
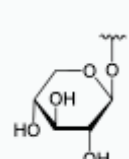
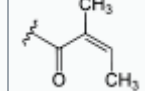
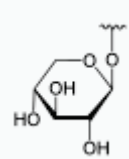
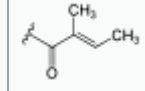
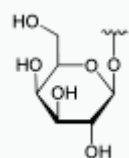
Pour obtenir un extrait de chlorhexidine concentré à 0,3%, nous avons donc dilué 600 µL de bain de bouche dans 400 µL de milieu YEP pur.

3.3.3. Saponines de marronnier d'Inde et de solidage

3.3.3.1. Saponines de marron d'Inde : l'escine

L'escine ou aescine est un mélange des saponines extrait du fruit du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.) (Figure 2). Les saponines sont des molécules naturellement produites par des plantes ou des animaux, douées de propriétés tensioactives (Bruneton, 2016). L'escine, dotée de propriétés antiinflammatoires, est traditionnellement utilisée contre les aphtes et les ulcérations buccales (Bruneton, 2016). L'escine est une poudre (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Pour les tests en milieu liquide, nous avons dilué la poudre d'escine dans le milieu YEP pur à une concentration de 0,3 %.

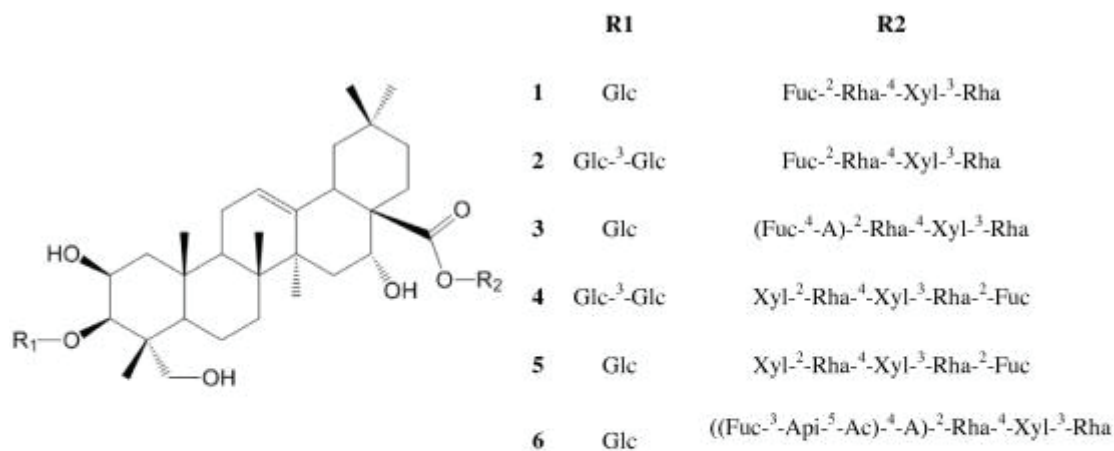
Figure 2. Saponines des escines Ia, Ib, IIa, IIb et IIIa d'*Aesculus hippocastanum* (L.) (D'après Wikipédia, consulté le 20.05.2020)

Escine	Structure chimique	R ¹	R ²	R ³	Pourcentage dans la β-escine
Ia			OH		24 %
Ib ³			OH		17 %
IIa			OH		13,5 %
IIb			OH		6 %
IIIa			H		1,5

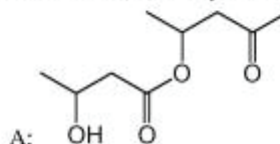
3.3.3.2. Saponines de solidage

Il existe plusieurs espèces de solidage, une plante de la famille des *Asteraceae*. Nous avons travaillé avec des saponines de *Solidago virgaurea* L., encore appelée verge d'or. *S. virgaurea* est traditionnellement utilisé comme diurétique et anti-inflammatoire (Bruneton, 2016). *S. virgaurea* contient un mélange de six saponines (Figure 3) (Laurençon et al., 2013).

Figure 3. Les six saponines de *Solidago virgaurea ssp. alpestris* (L.) (D'après Laurençon et al., 2013).



Glc: β -D-glucose, Xyl: β -D-xylose, Rha: α -L-rhamnose, Fuc: β -D-fucose, Api: β -D-apiose, Ac: acetylresidue



In vitro, des études ont montré qu'un extrait aqueux de *S. virgaurea*, sans être antifongique *stricto sensu*, avait la propriété d'inhiber la conversion levures-filaments de *C. albicans* et l'adhérence de *C. albicans* sur lui-même, sur des bactéries orales (*Streptococcus salivarius*) et sur des cellules épithéliales humaines en culture (Chevalier et al., 2012; Chevalier et al., 2019). Cet extrait a été nommé Bucovia™ (Givaudan, Vernier, Suisse) et utilisé à 0,3 % final comme principe actif dans un dentifrice fluoré expérimental. Dans une étude clinique randomisée en double aveugle *versus* contrôle sur 66 sujets sains, 33 sujets dans chaque groupe ont utilisé le dentifrice avec ou sans Bucovia deux fois par jour pendant 8 semaines. Cette étude a montré une diminution de la biomasse bactérienne totale, de *C. albicans* et de *Streptococcus mutans* chez les sujets qui ont utilisé le dentifrice avec Bucovia (Prêcheur et al., 2020).

Pour les tests d'inhibition en milieu liquide, nous avons dilué l'extrait Bucovia pour obtenir une concentration de 0,3 % dans le milieu final, en utilisant la même formule de calcul que pour Eludril. La concentration initiale de Bucovia est de 100 % :

$$C_{\text{mère}} / C_{\text{fil}} = 100/0,3 = 333 ; V_{\text{fil}} / V_{\text{mère}} = 333 \text{ d'où } V_{\text{mère}} = 1/333 = 0,003 \text{ mL} = 3 \mu\text{L}$$

Pour obtenir 1 mL de Bucovia à 0,3 %, nous avons dilué 3 μ L de Bucovia dans 997 μ L de milieu YEP pur.

3.3.4. Dentifrice fluoré

Le fluor a un effet antibactérien intrinsèque (Attiguppe et al., 2019), c'est pourquoi nous avons fait des tests d'inhibition en milieu liquide avec un dentifrice fluoré (Colgate Total™, Colgate Palmolive Company, Piscataway, NJ, USA). Nous l'avons utilisé à 0,3 % final (Poids / volume) dans de l'eau distillée.

3.4. Cultures sur milieu solide

3.4.1. Objectifs des cultures sur milieu solide : isolements, étalements et entretien des souches

3.4.1.1. *Isolements*

Le premier objectif des cultures sur milieu solide en boîte de Petri est de faire des isolements à partir d'un échantillon à tester, par exemple de la salive ou un écouvillonnage buccal remis en suspension dans du NaCl à 0,85 %. L'isolement permet d'obtenir des colonies isolées faciles à repiquer pour faire des subcultures sur milieu solide ou en milieu liquide. D'après l'aspect et la taille des colonies, les isolements permettent de voir s'il y a un ou plusieurs types de colonies dans un échantillon biologique, ou s'il y a des contaminants dans une culture pure.

3.4.1.2. *Étalements*

Le second objectif des cultures en milieu solide est de faire des étalements à partir d'une suspension pure de colonies isolées pour tester la sensibilité de la souche à des inhibiteurs. Par exemple, les étalements permettent de mettre en évidence un cercle d'inhibition de la croissance fongique autour d'un disque imbibé d'un actif à tester.

3.4.1.3. *Entretien*

Les cultures sur milieu solide permettent de cultiver et d'entretenir des souches conservées à -80°C, à -20°C ou sous forme lyophilisées, pour effectuer les tests.

3.4.2. Préparation des inoculum

3.4.2.1. *Principes de la préparation des souches fongiques*

Le repiquage d'une souche à partir d'une colonie isolée permet d'obtenir des champignons en phase de croissance. Pour cela, les souches étaient repiquées sur milieu YPDA puis incubées à 37°C. En fonction de la souche, levure ou champignon filamenteux, la durée de croissance n'était pas la même. Pour une levure comme *Candida*, le repiquage était fait 24 h avant le test alors que pour un champignon filamenteux il fallait compter au minimum 48 h.

Après croissance des chacune des souches sur milieu YPDA, une suspension fongique à une concentration donnée est préparée, appelée inoculum.

3.4.2.2. *Préparation de la suspension de levures*

Une colonie de 2mm de diamètre est mise en suspension dans une ampoule de NaCl à 0,85 % et ajustée afin d'obtenir une concentration finale d'inoculum correspondant à McFarland 5 (Oxoid, Basingstoke, Royaume uni).

3.4.2.3. *Préparation de la suspension fongique des champignons filamenteux*

Chaque boîte de Petri est raclée avec deux fois 10 mL d'eau distillée stérile. La suspension obtenue est centrifugée pendant 5 mn à 1500 tours/mn afin de séparer les filaments des spores. Les filaments fongiques sédimentent au fond du tube alors que les spores restent en suspension dans l'eau. Le surnageant contenant les spores est ajusté à une concentration correspondant à une DO (Densité Optique) entre 0,6 et 1 à 630nm pour les champignons du genre *Aspergillus* et *Penicillium* et à 450nm pour le genre *Trichophyton*. La lecture des DO est réalisée au spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France).

Afin d'obtenir la suspension finale, l'inoculum est ensuite dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau stérile.

3.4.3. Test d'inhibition en milieu solide : test de diffusion en disque sur gélose

Pour les tests en milieu solide, Eludril et Bucovia ont été dilués dans différents solvants. Eludril a été testé pur, dilué dans de l'eau et dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Bucovia a été testé à une concentration de 0,3 % dilué dans du DMSO, dans de l'eau stérile ou dans un mélange des deux à égales proportions (50 %-50 %).

Pour ce test, 9mL de chacun des inoculum sont déposés sur une boîte de Petri. Après dépôt, les boîtes sont agitées par rotation pendant deux fois dix secondes afin d'être imprégnées la suspension fongique, puis l'excès d'inoculum est retiré. Pour finir, les boîtes de Petri sont séchées pendant 15 min dans une étuve à 37°C.

25µL de chacune des solutions d'extraits ou de molécules à tester sont déposés sur des disques en papier buvard de 12mm de diamètre. Chacun des disques est déposé directement sur la boîte de culture inoculée par chacune des souches fongiques. Il s'agit d'un test de sensibilité par diffusion de l'inhibiteur dans la gélose. Il s'établit un gradient centrifuge de concentration décroissante autour du disque. Pour un test pilote, les résultats des tests d'inhibition peuvent être lus sous forme qualitative (Effet inhibiteur -, + ou ++) ou quantitative par mesure du diamètre d'inhibition en mm.

3.5. Cultures en milieu liquide

3.5.1. Objectifs des cultures en milieu liquide

Les tests que nous avons réalisés en milieu liquide avaient plusieurs objectifs :

1. Observer le développement fongique et l'évolution macroscopique en tubes Eppendorf, à l'œil nu.
2. Observer le développement fongique et les éventuelles altérations morphologiques au microscope optique à différents temps de culture.
3. Evaluer l'action antifongique ou non d'un inhibiteur par comptage des cellules fongiques au microscope optique (Technique de la cellule Kova).
4. Evaluer l'action antifongique ou non d'un inhibiteur par mesure de la DO de la suspension fongique.
5. Comparer l'action de différents extraits sur une même souche fongique.

Par analogie avec l'impact de *Bucovia* sur *C. albicans*, une des questions posées était de savoir si les inhibiteurs testés (y compris le *Bucovia*) permettaient d'inhiber la transition levures-pseudofilaments (Hyphes) pour les autres levures qui forment des hyphes et pour les champignons filamenteux.

3.5.2. Préparation des inoculum

La méthode de récupération des colonies fongiques est la même que pour les tests d'inhibition en milieu solide. Néanmoins, une fois les DO ajustées, les suspensions fongiques sont diluées au

1/10^{ème} dans le milieu YEP afin d'obtenir la concentration finale en inoculum. De plus, les inhibiteurs sont préparés directement dans le milieu YEP à la concentration finale souhaitée (0,3 %) (Cf. § 3.3.).

3.5.3. Test de filamentation et d'inhibition en milieu liquide

3.5.3.1. *Observation macroscopique du développement fongique en tubes Eppendorf*

Le test de filamentation en milieu liquide s'effectue dans des tubes Eppendorf. Ce sont des petits tubes coniques que l'on peut fermer avec un bouchon et qui permettent d'observer un culot à l'œil nu. Le volume total de culture liquide dans le tube Eppendorf est de 900 µL, composé de 600 µL d'inoculum dilué dans le milieu YEP et de 300 µL d'inhibiteur à tester. Nous avons réalisé un contrôle négatif avec le tube ne contenant que le milieu YEP inoculé et un contrôle positif avec le tube contenant le milieu YEP inoculé et l'amphotéricine B ou le fluconazole. Le développement fongique a été observé à l'œil nu à différents temps de croissance (En jours).

3.5.3.2. *Observation du développement fongique et les altérations morphologiques au microscope*

Une fois le temps d'incubation respecté, le contenu des tubes Eppendorf a été mélangé au vortex puis nous avons prélevé 10 µL d'inoculum déposés sur une cellule Kova, pour observer les cellules fongiques au microscope (Leica DMLB 30T, Leica microsystemes, Nanterre, France). L'observation au microscope a permis d'observer la morphologie des levures et des filaments à différents temps de croissance, ainsi que les altérations morphologiques provoquées par les différents inhibiteurs.

3.5.3.3. *Evaluation de l'effet inhibiteur par comptage des cellules fongiques à la cellule Kova*

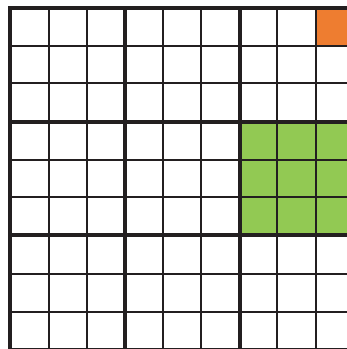
Les cellules Kova sont des plaquettes en plastique alvéolées qui comportent 10 puits de comptage (Figure 4) (Kova international, Garden Grove, USA).

Figure 4. Cellule Kova



La cellule Kova est un outil qui permet de déterminer la concentration cellulaire d'une culture, c'est-à-dire le nombre de cellules par unité de volume. La méthode est la suivante : on dépose 10 μL de culture dans un puits de comptage puis on l'observe au microscope optique. Le microscope permet d'observer le quadrillage à l'intérieur du puit : il est composé de neuf grands carrés, eux-mêmes divisés en neuf carrés plus petits (Figure 5). En fonction du nombre de cellules fongiques que l'on observe, on va compter soit les cellules fongiques des neuf grands carrés du puits s'il y a peu de cellules, soit les cellules d'un seul grand carré (Comportant neuf petits carrés) si elles sont nombreuses, soit les cellules d'un seul petit carré si elles sont très nombreuses.

Figure 5. Organisation d'une cellule Kova et méthode de comptage. Le carré orange représente un petit carré et le vert un grand carré. Il faut compter le nombre de cellules fongiques par carré. La concentration cellulaire est extrapolée à partir du comptage réalisé. Le nombre N est égal au nombre de cellules fongiques comptées



	Peu de cellules	Cellules nombreuses	Cellules très nombreuses
Comptage sur	9 grands carrés	1 seul grand carré	1 seul petit carré
Concentration cellulaire	N cellules / μL	N x 10 cellules / μL	N x 100 cellules / μL

Pour le protocole, pour chaque culture nous avons réalisé un comptage au temps à T0 puis à différents temps en fonction de l'espèce de levure ou de champignon filamenteux testés.

3.5.3.4. *Mesure des DO*

Les DO ont été mesurées à 620 nm pour les levures et 450 nm pour les champignons filamenteux, avec de l'eau pour faire le blanc. Les DO ont été mesurées aux temps de comptage à la cellule Kova, afin d'avoir un autre élément de comparaison entre les cultures.

4. RESULTATS

4.1. Synthèse des tests réalisés

Le Tableau 6 pages suivantes présente la synthèse des tests réalisés. Les tests ont été réalisés en duplicat pour l'inoculum, les antifongiques et chacun des extraits. Concernant le test à la cellule Kova, le comptage du nombre de spores a été effectué en double par deux opérateurs distincts.

Tableau 6. Synthèse des tests réalisés en fonction des souches testées et des inhibiteurs testés. Observation à la cellule Kova : observation morphologique et comptage des cellules fongiques à T0 (Inoculum de départ) et après un (J1), deux (J2), trois (J3) ou sept jours (J7) d'incubation. Mesure de la densité optique (DO) avec l'inoculum de départ (T0) et après 4 h (T4) et 24 h (T24) d'incubation. DMSO : dyméthylsulfoxyde.

Souches testées	Cultures sur milieu solide : inhibiteurs testés	Cultures en milieu liquide, sans inhibiteur = inoculum		Cultures en milieu liquide, avec inhibiteurs	
		Observation à la cellule Kova	DO à T0, T4 et T24	Observation à la cellule Kova	DO à T0, T4 et T24
• Levures :					
<i>Candida albicans</i> ATCC 902008	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% eau/DMSO	Non	Non	Non	Non
<i>Candida glabrata</i> LMA 901085	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% eau/DMSO	Oui -Test : observation et numération des cellules à T0, T4 et T24 - Remarque : <i>C. glabrata</i> ne filamente pas	Oui - Test : mesure à T4 et T24	Oui (Photos) Eludril 0,3% Escine 0,3% Bucovia 0,3% - Test : observation et numération des cellules à T0, T4 et T24	Oui (Photos) Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3% - Test : mesure à T4 et T24
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% eau/DMSO Dentifrice Colgate 0,3 %	Non	Non	Non	Non
<i>Candida tropicalis</i> sp.	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur	Non	Non	Non	Non

Tableau 6 (Suite). Synthèse des tests réalisés en fonction des souches testées et des inhibiteurs testés. Observation à la cellule Kova : observation morphologique et comptage des cellules fongiques à T0 (Inoculum de départ) et après un (J1), deux (J2), trois (J3) ou sept jours (J7) d'incubation. Mesure de la densité optique (DO) avec l'inoculum de départ (T0) et après 4 h (T4) et 24 h (T24) d'incubation. DMSO : dyméthylsulfoxyde.

Souches testées	Cultures sur milieu solide : inhibiteurs testés	Cultures en milieu liquide, sans inhibiteur = inoculum		Cultures en milieu liquide, avec inhibiteurs	
		Observation à la cellule Kova	Mesure des DO à T0, T4 et T24	Observation à la cellule Kova	Mesure des DO à T0, T4 et T24
<i>Candida tropicalis</i> sp. (suite)	Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% eau/DMSO Dentifrice Colgate 0,3 %	Non	Non	Non	Non
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% eau/DMSO Dentifrice Colgate 0,3 %	Oui - Test : observation et numération des cellules à T0, T4 et T24	Oui - Test : mesure à T0, T4 et T24	Oui Fluconazole 0,3 % Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3 % -Test : Observation et numération des cellules à T0, T4 et T24	Oui Fluconazole 0,3 % Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3 %
• Champignons filamenteux :					
- Dermatophyte :					
<i>Trichophyton rubrum</i> sp.	Non	Oui - Test 1 : comptage du nombre de spores à T0 - Test 2 : comptage du nombre de spores et des filaments à T0	Non	Oui Fluconazole 0,3 % Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3 % - Test 1 : observations à J7 - Test 2 : ajout d'un inhibiteur : l'amphotéricine B ; Observation des tubes à J9	Non

Tableau 6 (suite). Synthèse des tests réalisés en fonction des souches testées et des inhibiteurs testés. Observation à la cellule Kova : observation morphologique et comptage des cellules fongiques à T0 (Inoculum de départ) et après un (J1), deux (J2), trois (J3) ou sept jours (J7) d'incubation. Mesure de la densité optique (DO) avec l'inoculum de départ (T0) et après 4 h (T4) et 24 h (T24) d'incubation. DMSO : diméthylsulfoxyde.

Souches testées	Cultures sur milieux solides : inhibiteurs testés	Cultures en milieu liquide, sans inhibiteur = inoculum		Cultures en milieu liquide, avec inhibiteurs	
		Observation à la cellule Kova	Mesure des DO à T0, T4 et T24	Observation à la cellule Kova	Mesure des DO à T0, T4 et T24
- Moisissures					
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3 % eau + DMSO	Oui - Test 1 : comptage du nombre de spores à J0 et du nombre de spores et de filaments à J1 et J2 - Test 2 : comptage du nombre de spores à J0 et du nombre de spores et de filaments à J2 et J4	Non	Oui Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3 % - Test 1 : comptage du nombre de spores et de filaments à J1 et J2 - Test 2 : ajout d'inhibiteurs Amphotéricine B 0,3 % Fluconazole 0,3 % Comptage du nombre de spores et de filaments à J2 et J4	Non
<i>Fusarium</i> sp.	Non	Oui - Test 1 : comptage des spores à T0, observations à J2, comptage des spores et filaments à J7 - Test 2 : comptage du nombre de spores à J0, du nombre de spores et filaments à J3	Non	Oui Fluconazole 0,3 % Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3 % - Test 1 : observations à J2, comptage des spores et filaments à J7 - Test 2 : ajout d'un inhibiteur : Amphotéricine B 0,3% comptage à J3 du nombre de spores et de filaments	Non

Tableau 6 (fin). Synthèse des tests réalisés en fonction des souches testées et des inhibiteurs testés. Observation à la cellule Kova : observation morphologique et comptage des cellules fongiques à T0 (Inoculum de départ) et après un (J1), deux (J2), trois (J3) ou sept jours (J7) d'incubation. Mesure de la densité optique (DO) avec l'inoculum de départ (T0) et après 4 h (T4) et 24 h (T24) d'incubation. DMSO : diméthylsulfoxyde.

Souches testées	Cultures sur milieux solides : inhibiteurs testés	Cultures en milieu liquide, sans inhibiteur = inoculum		Cultures en milieu liquide, avec inhibiteurs	
		Observation à la cellule Kova	Mesure des DO à T0, T4 et T24	Observation à la cellule Kova	Mesure des DO à T0, T4 et T24
<i>Penicillium</i> sp.	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% Eau/DMSO Dentifrice Colgate 0,3 %	Oui - Test 1 : observation des cellules (pas de filaments) à J2 et J7 - Test 2 : comptage du nombre de cellules à J0, observations à J3	Non	Oui Fluconazole 0,3 % Eludril 0,3 % Escine 0,3 % Bucovia 0,3 % - Test 1 : observation des cellules (Pas de filaments) à J2 et J7 - Test 2 : ajout d'un inhibiteur : Amphotéricine B observation des cellules à J3	Non
- Autre champignon filamenteux :					
<i>Rhizomucor</i> sp.	Amphotéricine B Eludril pur Eludril 0,3 % Bucovia pur Bucovia 0,3 % Bucovia 0,3 % DMSO Bucovia 0,3% Eau/DMSO Dentifrice Colgate 0,3 %	Non	Non	Non	Non

4.2. Résultats obtenus avec les levures

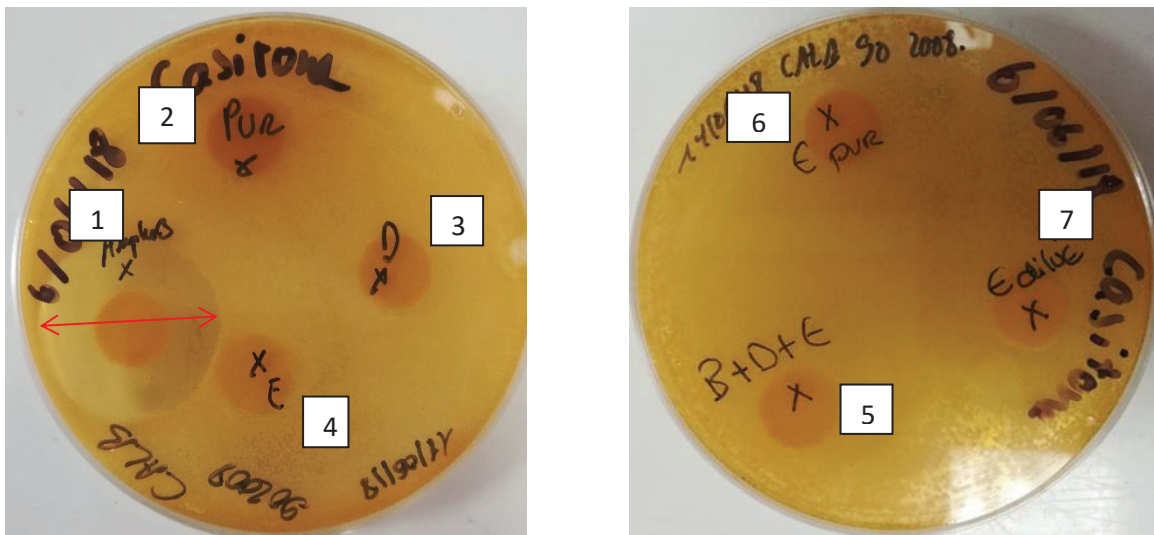
4.2.1. *Candida albicans* ATCC902008

4.2.1.1. *Candida albicans* : test d'inhibition sur milieu solide

Nous avons testé *C. albicans* sur milieu solide casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO (Figure 6).

Le disque contrôle positif imbibé d'amphotéricine B montre un cercle d'inhibition important. En revanche, aucune inhibition n'est visible au niveau des disques contenant l'extrait de *Solidago virgaurea* (Bucovia), que ce soit l'extrait pur, dilué dans de l'eau stérile ou dans du DMSO, ni autour des disques contenant l'Eludril (dilué ou pur).

Figure 6. *Candida albicans* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) amphotéricine B (Contrôle positif), 2) Bucovia pur, 3) Bucovia dilué à 0,3% dans du DMSO, 4) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau stérile. A droite: 5) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, 6) Eludril pur, 7) Eludril dilué à 0,3 % dans de l'eau. Il existe une inhibition visible autour du disque d'amphotéricine B (Barre rouge).



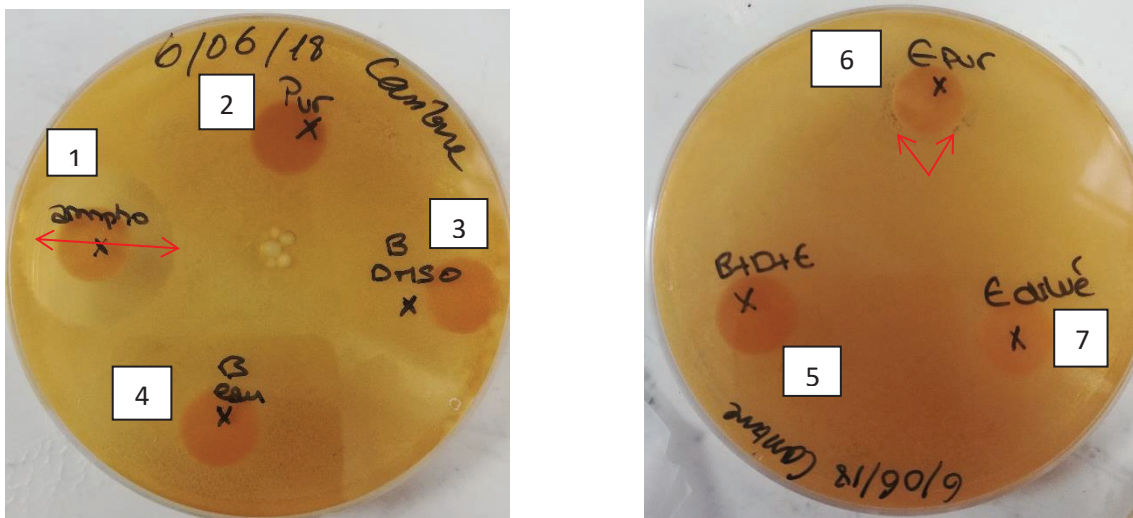
4.2.2. *Candida glabrata* ATCC901085

4.2.2.1. *Candida glabrata* : test d'inhibition sur milieu solide

Nous avons testé *C. glabrata* sur milieu solide casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO (Figure 7).

Les résultats observés avec *C. glabrata* sont similaires à ceux observés avec *C. albicans*. Le contrôle positif (Amphotéricine B) montre un cercle d'inhibition important. On note une activité très légère et à distance du disque contenant le bain de bouche antiseptique à la chlorhexidine (Eludril). Aucune inhibition n'est visible au niveau des disques contenant l'extrait de *Solidago virgaurea* (Bucovia) pur, dilué dans de l'eau stérile ou dans du DMSO.

Figure 7. *Candida glabrata* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) amphotéricine B (Contrôle positif), 2) Bucovia pur, 3) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO, 4) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau. A droite: 5) Bucovia dilué à 0,3% dans de l'eau et du DMSO, 6) Eludril pur, 7) Eludril dilué à 0,3 % dans de l'eau.



4.2.2.2. *Candida glabrata* : test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé *C. glabrata* en milieu liquide YEP avec les inhibiteurs suivants : Eludril, escine et Bucovia, tous dilués à 0,3 % dans du YEP.

Observation macroscopique des tubes Eppendorf

Sur le plan visuel, aucun dépôt n'était visible au fond des tubes Eppendorf. La multiplication cellulaire semblait plus importante dans le tube qui ne contenait que l'inoculum de *C. glabrata* dans le milieu YEP. Il semblerait qu'il y ait eu une diminution du nombre de cellules dans le tube contenant le bain de bouche à la chlorhexidine.

Observation de la morphologie des cellules fongiques à la cellule Kova à T0, T4 et à T24

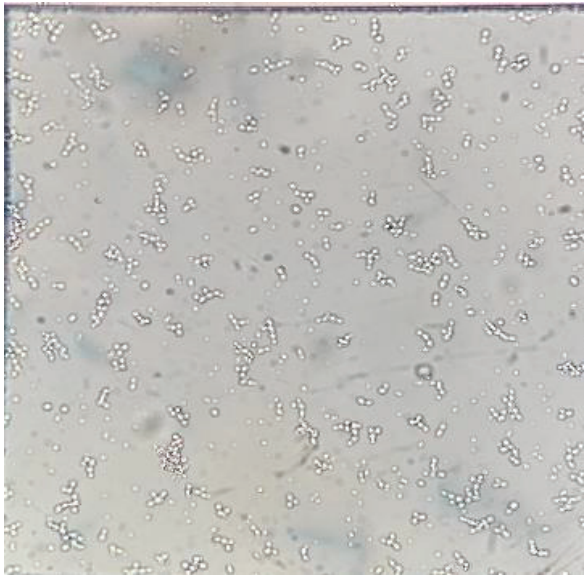
C. glabrata est une espèce qui ne filamente pas, c'est pourquoi il est impossible de chercher un effet contre le développement des hyphes en utilisant cette souche.

A T0, nous avons observé des levures arrondies, en nombre similaire dans chaque tube.

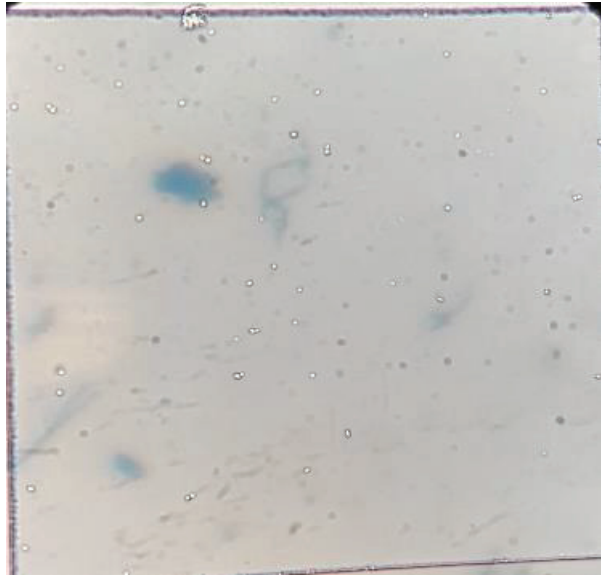
A T4, on pouvait distinguer certaines cellules bourgeonnantes.

A T24, dans le contrôle négatif (Sans inhibiteur), les cellules de *C. glabrata* mises en culture s'agrégeaient entre elles pour former des amas de cellules. Dans le contrôle positif (Antiseptique : Eludril dilué à 0,3 %), la culture contenait beaucoup moins de cellules, sans amas, ce qui confirme l'effet inhibiteur de la chlorhexidine contre *C. glabrata*. Enfin, les cultures contenant des saponines (Escine et Bucovia diluées à 0,3 %) présentaient des amas mais les cellules semblaient être plus petites que dans le contrôle négatif (Figure 8).

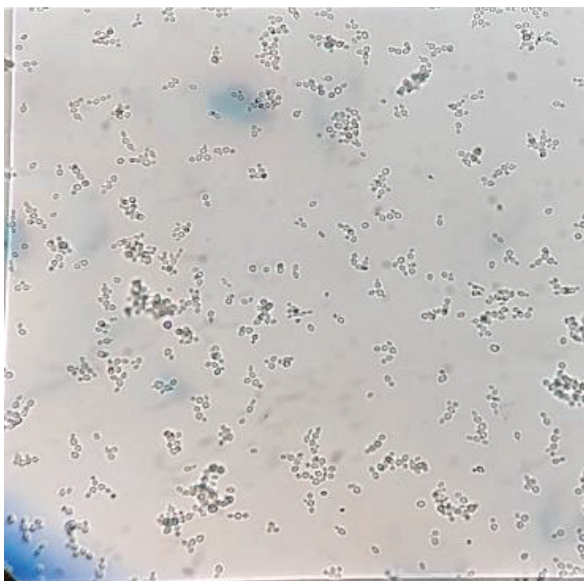
Figure 8. *Candida glabrata* : tests d'inhibition en milieu liquide après 24 h d'incubation. En présence de saponines, les cellules de *C. glabrata* semblaient être plus petites que dans le contrôle négatif. Objectif x 40.



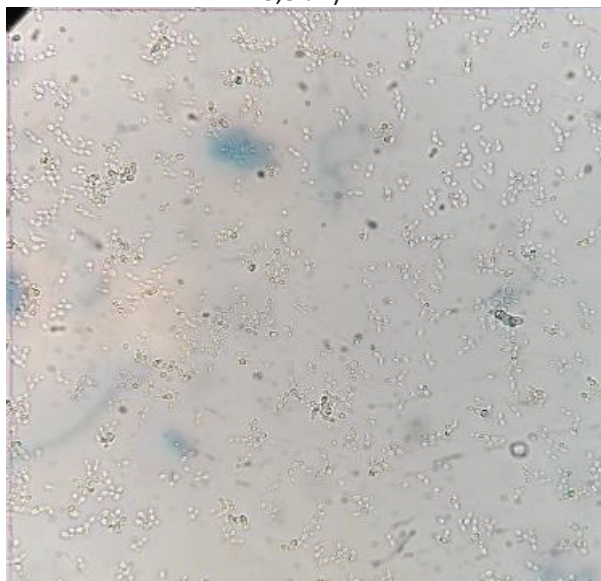
Candida glabrata
contrôle négatif sans inhibiteur



Candida glabrata
contrôle positif avec de la chlorhexidine
(Bain de bouche antiseptique Eludril dilué à
0,3 %)



Candida glabrata
Saponines : escine à 0,3 %



Candida glabrata
Saponines : extrait de *Solidago virgaurea*
(Bucovia à 0,3 %)

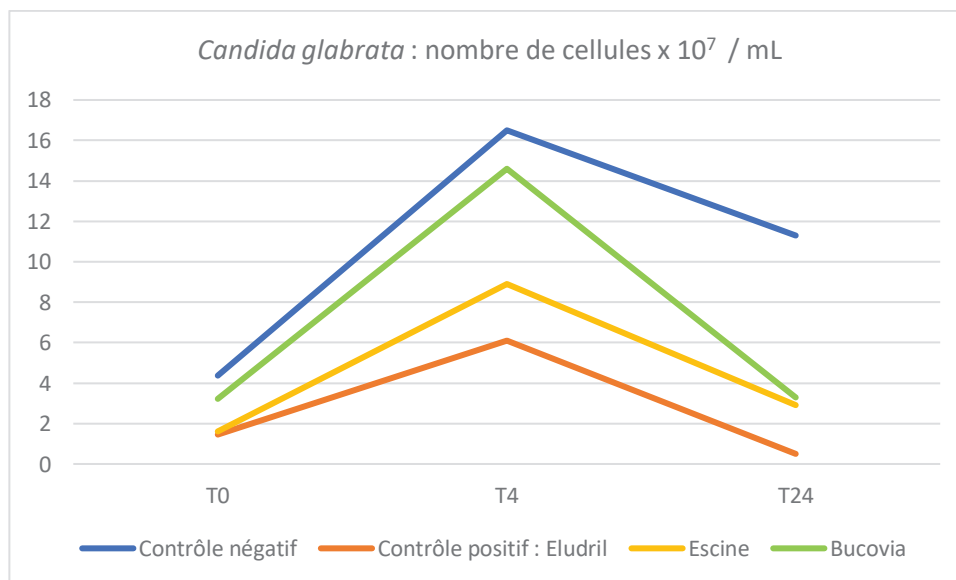
Comptage des cellules fongiques à la cellule Kova à T0, T4 et à T24

Le comptage à la cellule Kova des cellules de *C. glabrata* en présence d'inhibiteurs est détaillé dans le Tableau 7 et Figure 9.

Tableau 7. *Candida glabrata* incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova (en nombre de cellules / mL) et mesure de la DO (deux mesures de DO par test d'inhibition).

<i>Candida glabrata</i>	Nombre de cellules/ mL			Densité optique	
	T0	T4	T24	T4	T24
Contrôle négatif sans inhibiteur	$4,37 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^8$	$1,13 \cdot 10^8$	0,1047 0,1017	0,38 0,44
Contrôle positif : bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril dilué 0,3 %)	$1,46 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	0,1002 0,1024	0,10 0,10
Saponines : escine diluée 0,3 %	$1,61 \cdot 10^7$	$8,9 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	0,0981 0,0903	0,19 0,24
Saponines : solidagosaponines (Bucovia) diluée 0,3 %	$3,22 \cdot 10^7$	$1,46 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^7$	0,1173 0,1142	0,45 0,40

Figure 9. *Candida glabrata* incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova.



Mesure de la DO à T4 et à T24

Les DO à 620 nm ont été mesurées à T4 et à T24, avec deux mesures par test d'inhibition. Les résultats sont détaillés dans le Tableau 7 ci-dessus.

Dans le contrôle négatif sans inhibiteur, de T0 à T4 le nombre de cellules a augmenté d'un facteur 10 et il est resté stabilisé à cette valeur à T24. Pourtant, la DO a augmenté de T4 à T24, ce qui pourrait correspondre à une augmentation de la taille des cellules.

Dans le contrôle positif avec de la chlorhexidine, le nombre de cellules a augmenté légèrement de T0 à T4, puis il a diminué d'un facteur 10 de T4 à T24. Par contre, la DO est restée stable de T4 à T24, ce qui pourrait correspondre aussi à une augmentation de la taille des cellules. Ce résultat suggère qu'à cette concentration, Eludril est un bain de bouche antiseptique qui a un effet fongicide contre *C. glabrata* (Δ T4-T24 : 10^7 - 10^6)

Avec l'escine, le nombre de cellules est resté stable de T0 à T4 et à T24, ce qui suggère un effet fongistatique sur *C. glabrata*. La DO a augmenté légèrement de T4 à T24, ce qui suggère aussi l'hypothèse d'une augmentation de la taille des cellules.

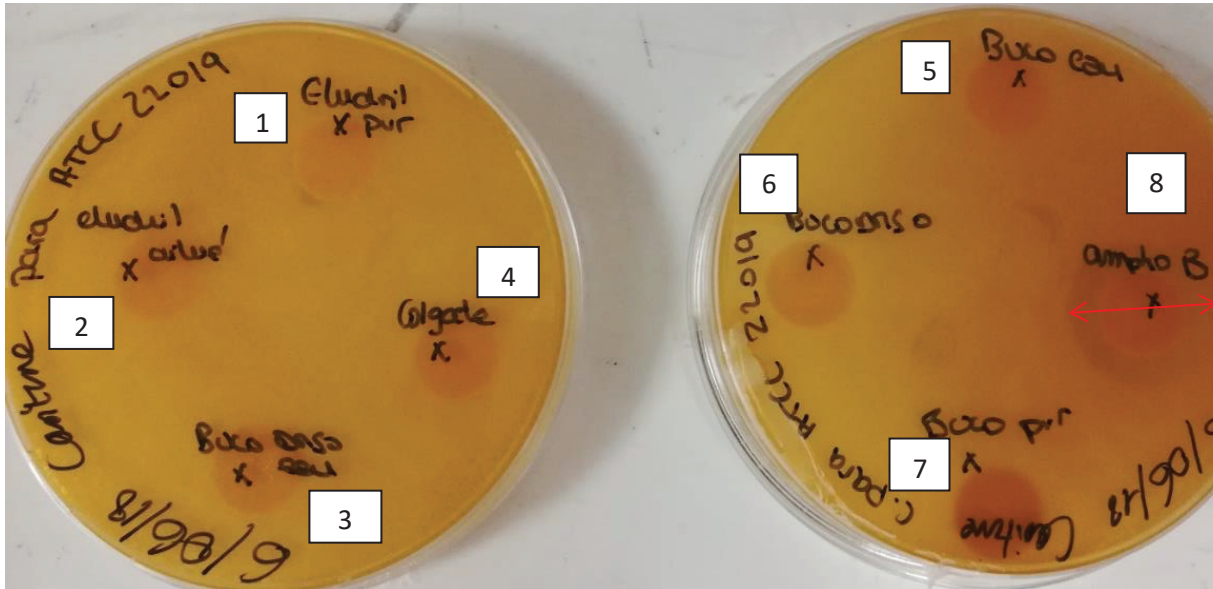
Avec Bucovia le nombre de cellules a augmenté de T0 à T4, mais il s'est stabilisé à T24 à la même valeur que T0, ce qui suggère aussi un effet fongistatique sur *C. glabrata*. Par contre, à T24 la DO était similaire voire plus élevée que celle du contrôle négatif. Cela pourrait être dû à la couleur relativement foncée de Bucovia.

4.2.3. *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Nous avons testé *C. parapsilosis* sur milieu casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO Bucovia dilué à 0,3 % dans un mélange d'eau et de DMSO et dentifrice Colgate (Figure 10).

Avec *C. parapsilosis*, seul le contrôle positif (Amphotéricine B) montre un cercle d'inhibition, comme avec *C. albicans* et *C. glabrata*. Contrairement à *C. albicans* il n'y a aucune activité autour du disque contenant Eludril. Comme avec *C. albicans* et *C. glabrata*, il n'y a aucune activité autour des disques contenant l'escine, Bucovia et le dentifrice Colgate.

Figure 10. *Candida parapsilosis* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) Eludril pur, 2) Eludril dilué à 0,3 %, 3) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, 4) dentifrice Colgate. A droite : 5) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, 6) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO, 7) Bucovia pur, 8) Amphotéricine B (contrôle positif).

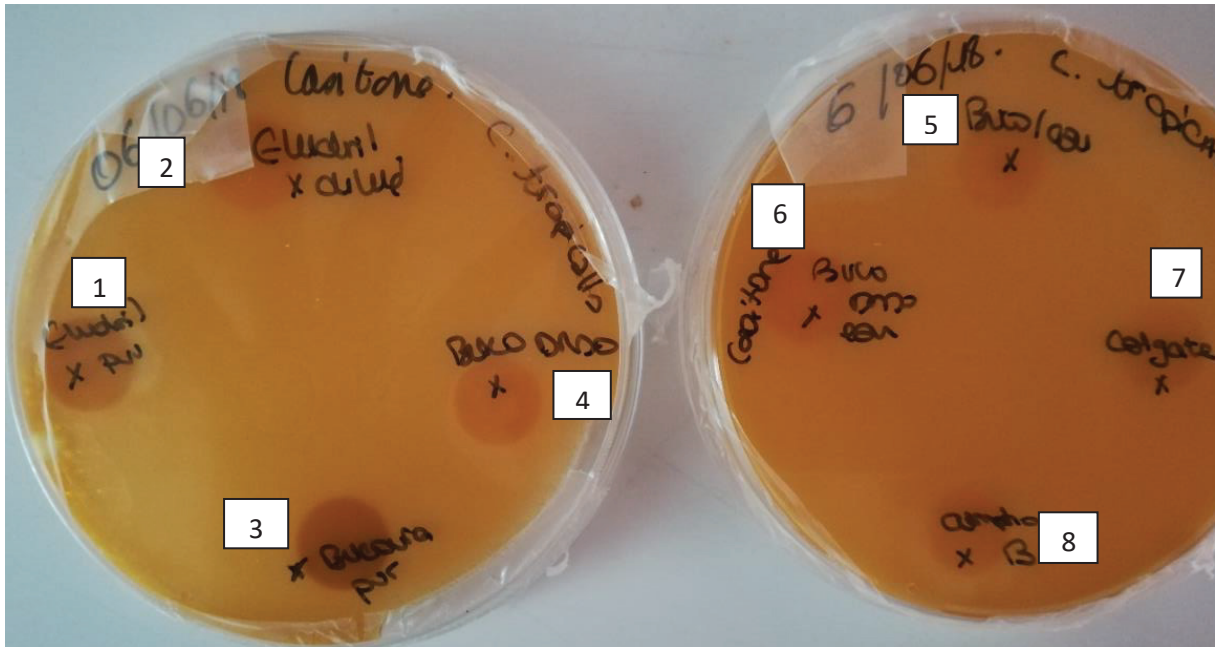


4.2.4. *Candida tropicalis*, souche sauvage

Nous avons testé *C. tropicalis* sur milieu casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO et dentifrice Colgate (Figure 11).

Comme pour *C. parapsilosis* et *C. albicans* aucun des inhibiteurs testés n'a inhibé la croissance de *C. tropicalis* sur milieu solide. Contrairement à *C. glabrata*, il n'y a aucune activité autour du disque contenant Eludril.

Figure 11. *Candida tropicalis* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) Eludril pur, 2) Eludril dilué à 0,3 %, 3) Bucovia pur, 4) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO. A droite : 5) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, 6) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, 7) Dentifrice Colgate, 8) Amphotéricine B (contrôle positif).



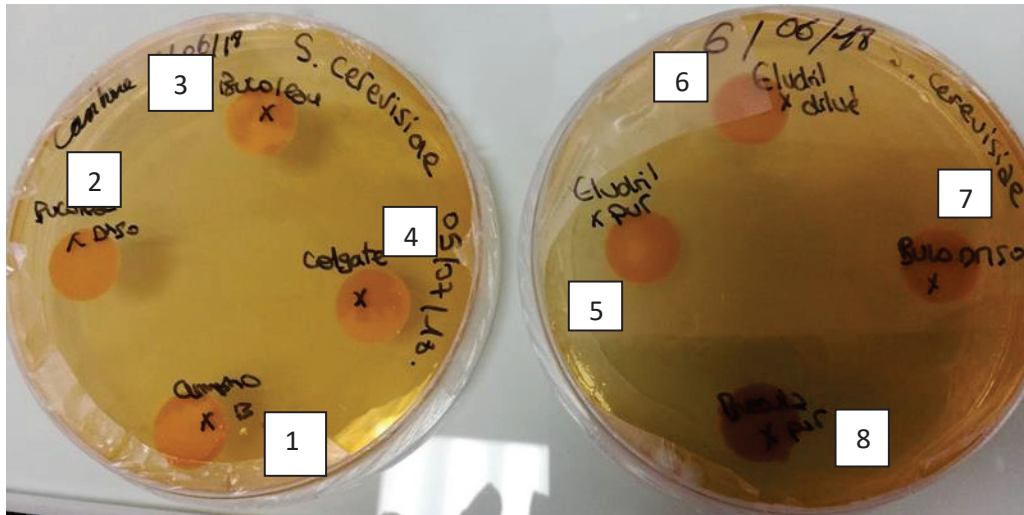
4.2.5. *Saccharomyces cerevisiae*, souche sauvage

4.2.5.1. *Saccharomyces cerevisiae* : test d'inhibition sur milieu solide

Nous avons testé *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu solide casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B en tant que contrôle positif, Eludril pur, Eludril dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO et dentifrice Colgate (figure 12).

Le test s'est avéré être non valable car il n'y a eu aucune croissance fongique.

Figure 12. *Saccharomyces cerevisiae* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) Amphotéricine B (contrôle positif), 2) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO et de l'eau, 3) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, 4) Dentifrice Colgate. A droite : 5) Eludril pur, 6) Eludril dilué à 0,3 %, 7) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO, 8) Bucovia pur.



4.2.5.2. *Saccharomyces cerevisiae* : test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide YEP avec les inhibiteurs suivants : fluconazole, Eludril, escine et Bucovia. Tous les inhibiteurs ont été dilués à 0,3 % dans du milieu YEP.

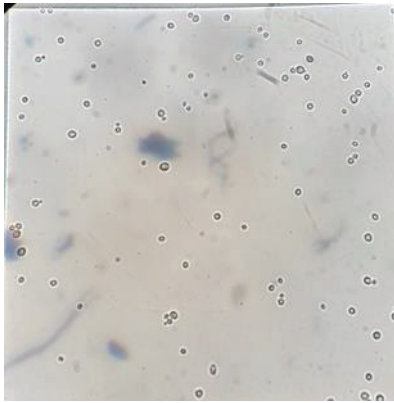
Observation macroscopique des tubes Eppendorf

Après une incubation de 24 h, on n'observe pas de différence sur le plan visuel entre les différents tubes. Il n'y a pas de dépôt visible dans le fond des tubes.

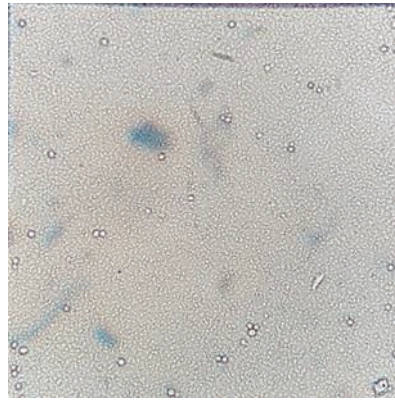
Observation de la morphologie des cellules fongiques à la cellule Kova à T24

La culture contenant le fluconazole montre une contamination bactérienne. En présence de l'extrait de Bucovia, on observe des cellules bien rondes qui ont tendance à s'agglomérer entre elles. Elles semblent être moins nombreuses que dans la culture testée avec une autre molécule de type saponine (L'escine). L'observation au microscope de la culture avec l'Eludril révèle des cellules de très petites tailles, qui s'avèrent être particulièrement difficiles à compter (Figure 13).

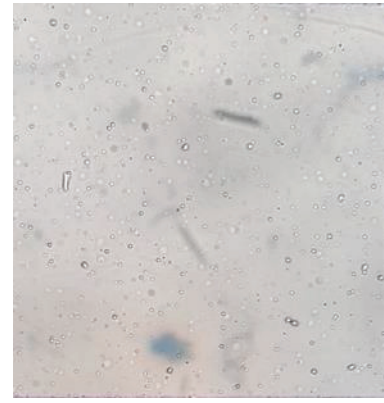
Figure 13. *Saccharomyces cerevisiae* : tests d'inhibition en milieu liquide après 24 h d'incubation. Objectif x 40. On observe une contamination bactérienne dans la culture avec du fluconazole.



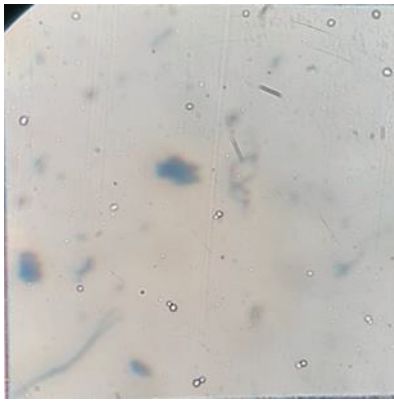
Saccharomyces cerevisiae
Contrôle négatif sans inhibiteur



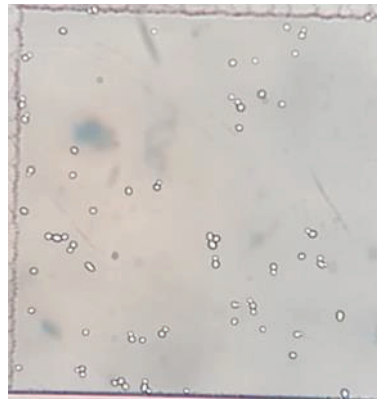
Saccharomyces cerevisiae
Contrôle positif avec du
fluconazole



Saccharomyces cerevisiae
Bain de bouche antiseptique
à la chlorhexidine Eludril à
0,3 %



Saccharomyces cerevisiae
Saponines : escine à 0,3 %



Saccharomyces cerevisiae
Saponines : extrait de *Solidago*
virgaurea (Bucovia à 0,3 %)

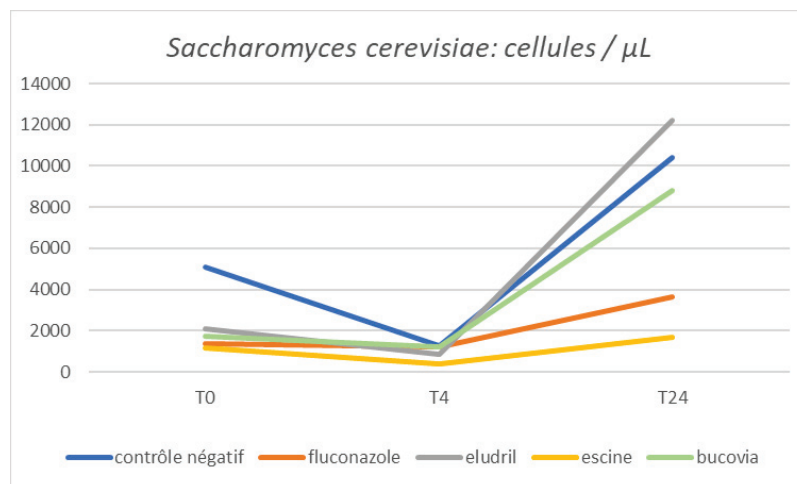
Comptage des cellules fongiques à la cellule Kova à T0, T4 et à T24

Le comptage à la cellule Kova des cellules de *S. cerevisiae* en présence d'inhibiteurs est détaillé dans le tableau 8 et figure 14.

Tableau 8. *Saccharomyces cerevisiae* incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova (en nombre de cellules / mL) et mesure de la DO (deux mesures de DO par test d'inhibition).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nombre de cellules/ mL			Densité optique		
	T0	T4	T24	T0	T4	T24
Contrôle négatif sans inhibiteur	5,1.10 ⁶	1,25.10 ⁶	1,04.10 ⁷	0,06	0,05	0,31
Contrôle positif : fluconazole à 0,3 %	1,37.10 ⁶	1,2.10 ⁶	3,62.10 ⁶	0,07	0,06	0,09
Bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril dilué 0,3 %)	2.10 ⁶	8,6.10 ⁵	1,22.10 ⁷	0,24	0,25	0,15
Saponines : escine diluée 0,3 %	1,16.10 ⁶	4,1.10 ⁵	1,69.10 ⁶	0,06	0,05	0,46
Saponines : solidagosaponines (Bucovia) diluée 0,3 %	1,71.10 ⁶	1,22.10 ⁶	8,8.10 ⁶	0,06	0,05	0,07

Figure 14. *Saccharomyces cerevisiae* incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova.



Mesure de la densité optique à T0, T4 et T24

Les DO à 620 nm ont été mesurées à T0, T4 et à T24. Les résultats sont détaillés dans le tableau 8 ci-dessus.

On remarque dans un premier temps une diminution du nombre de cellules à T4 pour toutes les cultures, puis une augmentation à T24.

Dans le contrôle négatif sans inhibiteur, le bain de bouche à la chlorhexidine et le Bucovia, le nombre de cellules augmente fortement à 24 h. Pourtant, la valeur de densité optique n'augmente

que pour le contrôle négatif sans inhibiteur. Elle diminue avec l'Eludril et reste stable avec Bucovia. Cela pourrait être justifié par une diminution de la taille des cellules, surtout avec Eludril.

Avec l'escine et le fluconazole, le nombre de cellules augmente peu à T24. La DO reste stable avec le fluconazole mais elle augmente fortement à T24 avec l'escine.

4.2.6. Synthèse des résultats obtenus avec les levures

Les tableaux 9 et 10 pages suivantes présentent la synthèse des tests réalisés en milieu solide et en milieu liquide.

Tableau 9. Tests d'inhibition de croissance en milieu solide casitone sur 8 souches fongiques : synthèse des résultats.

Tests d'inhibition en milieu solide	Amphotéricine B 0.3 %	Chlorhexidine (Eludril)		Solidagosaponines (Bucovia)			Dentifrice fluoré 0.3 % (Colgate)	
		Pur	0.3 %	Pur	Dilué 0.3 % eau	Dilué 0.3 % eau + DMSO		Dilué 0.3 % DMSO
• Levures :								
<i>Candida albicans</i> ATCC 902008	++	-	-	-	-	-	-	NT
<i>Candida glabrata</i> ATCC 901085	++	-	-	-	-	-	-	NT
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
• Champignons filamenteux :								
- Dermatophyte :								
<i>Trichophyton rubrum</i> sp.	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
- Moisissures :								
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
- Autre champignon filamenteux :								
<i>Rhizomucor</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-

DMSO : diméthylsulfoxyde; NT : non testé

Tableau 10. Tests d'inhibition de croissance en milieu liquide YEP sur 6 souches fongiques : synthèse des résultats.

Tests d'inhibition en milieu liquide	Amphotéricine B 0.3 %	Fluconazole 0.3 %	Chlorhexidine (Eludril) 0.3 %	Escine 0.3 %	Solidagosaponines (Bucovia) 0.3 %
• Levures :					
<i>Candida albicans</i> ATCC 902008	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Candida glabrata</i> ATCC 901085	NT	NT	Effet fongicide	Effet fongistatique	Effet fongistatique
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Candida tropicalis</i> sp.	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NT	Contamination	Effet fongicide	Effet fongistatique	Effet fongistatique
• Champignons filamenteux :					
- Dermatophyte :					
<i>Trichophyton rubrum</i> sp.	NT	Peu de filaments	Contamination	Peu de cellules	- Adhérence des cellules diminuée - Pas de filaments
- Moisissures :					
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	- Absence de formation de filament - Cellules dysmorphiques, de petite taille			- Adhérence des cellules diminuée (amas dans le tube) - Formation des filaments retardée	
<i>Fusarium</i> sp.	- Peu de cellules - Effet fongicide		- Déformations cellulaires - Spores en chainettes - Pas de filaments	- Nombre de spores élevé - Formation filaments ralentie	
<i>Penicillium</i> sp.	NT	Cellules dysmorphiques Pas de filaments	- Très petite taille cellulaire - Pas de filaments	Présence de filaments	- Inhibe l'adhérence cellulaire au tube et la coaggrégation des spores
- Autre champignon filamenteux :					
<i>Rhizomucor</i> sp.	NT	NT	NT	NT	NT

DMSO : diméthylsulfoxyde ; NT : non testé

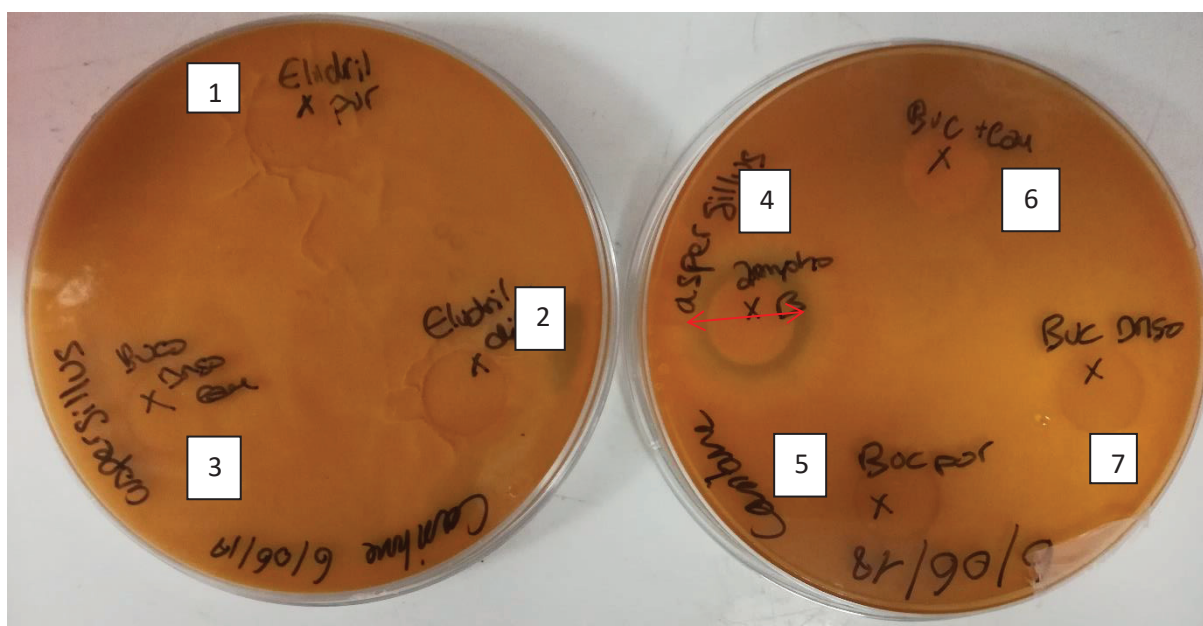
4.3. Résultats obtenus avec les champignons filamenteux

4.3.1. *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305

4.3.1.1. *Aspergillus fumigatus* : tests d'inhibition sur milieu solide

Nous avons testé *A. fumigatus* sur milieu solide casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO et Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO. Le disque contrôle positif imbibé d'amphotéricine B montre un cercle d'inhibition peu important. Aucune inhibition n'est visible au niveau des autres disques (Figure 15).

Figure 15. *Aspergillus fumigatus* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) Eludril pur, 2) Eludril dilué à 0,3 % dans de l'eau, 3) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO. A droite : 4) amphotéricine B (Contrôle positif), 5) Bucovia pur, 6) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, 7) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO. L'inhibition est visible autour du disque d'amphotéricine B (Barre rouge).



4.3.1.2. *Aspergillus fumigatus* : 1^{er} test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé *A. fumigatus* en milieu liquide YEP avec les inhibiteurs suivants : bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril) à 0,3 %, escine 0,3 % et extrait de *S. virgaurea* contenant des solidagosaponines (Bucovia) à 0,3 %.

• 1^{er} test - *A. fumigatus* : observation macroscopique des tubes Eppendorf à J1

Sur le plan visuel, nous avons observé la présence d'un amas gélatineux translucide qui flottait dans les tubes contenant les saponines : l'escine et Bucovia. Cela montre que les saponines empêchent les filaments d'*A. fumigatus* d'adhérer aux parois du tube, contrairement à l'amphotéricine B et la chlorhexidine. (Figure 16).

Figure 16. *Aspergillus fumigatus* : aspect visuel des tubes Eppendorf après 24 h (J1) d'incubation dans du milieu YEP. De gauche à droite : 1) milieu YEP stérile, 2) milieu YEP inoculé avec *A. fumigatus* sans inhibiteur, 3) escine 0,3 %, 4) Bucovia 0,3 %, 4) Eludril 0,3 %. Les saponines (escine et Bucovia) inhibent l'adhérence des cellules fongiques aux parois du tube.



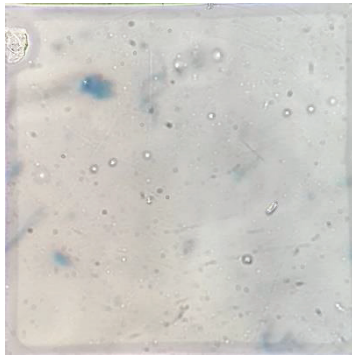
• 1^{er} test - *A. fumigatus* : observation des cultures à J1

A T0, nous avons observé des cellules d'*A. fumigatus* arrondies et en petit nombre ($1750 \text{ spores} / \mu\text{L}$ soit $1,75 \cdot 10^6 / \text{mL}$).

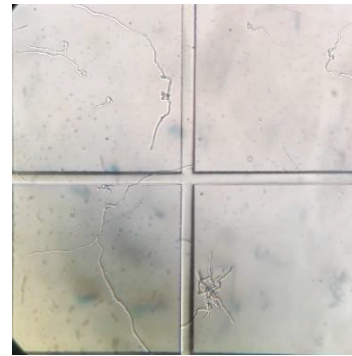
A J1, l'inoculum seul contenait des filaments d'*A. fumigatus* : cela atteste d'un développement correct de la forme de spore initiale à la formation filamenteuse. La culture contenant le bain de bouche à la chlorhexidine ne semblait pas contenir de filament et un faible nombre de spores sous forme ronde. La culture contenant de l'escine contenait des filaments en

faible quantité, au stade de pseudo-filaments pour la plupart. Enfin, nous avons observé un nombre important de filaments dans la culture contenant le Bucovia (Figure 17).

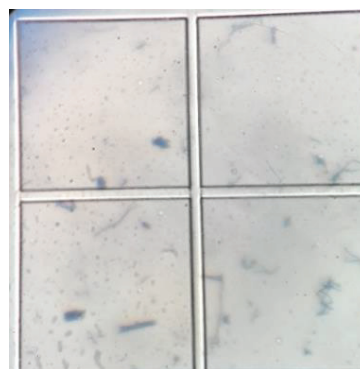
Figure 17. *Aspergillus fumigatus* 1^{er} test à J1 : tests d'inhibition en milieu liquide après 24 h d'incubation.



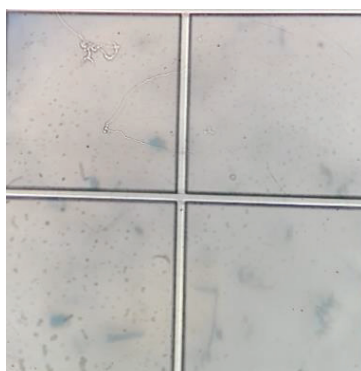
Aspergillus fumigatus
Inoculum à T0
Objectif x 40



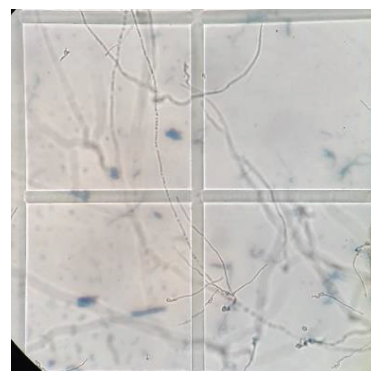
Aspergillus fumigatus
Inoculum à J1
Objectif x 20



Aspergillus fumigatus
Eludril 0,3 % à J1
Objectif x20



Aspergillus fumigatus
Escine 0,3 % à J1
Objectif x 20

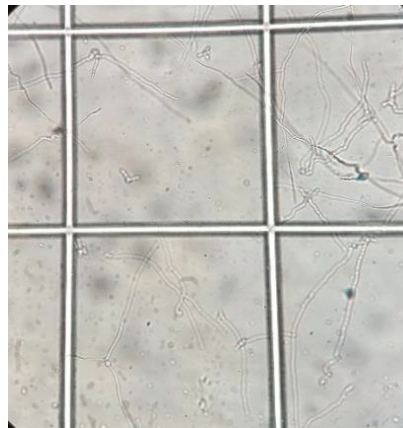


Aspergillus fumigatus
Saponines : extrait de *Solidago virgaurea*
(Bucovia dilué à 0,3 %) à J1
Objectif x 20

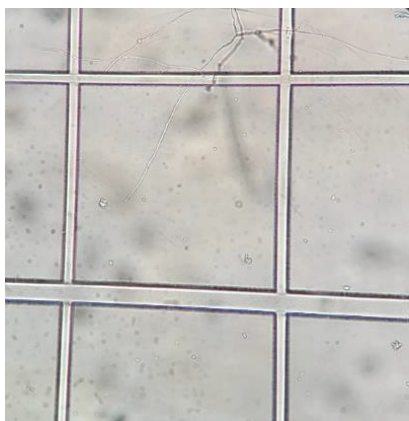
• 1^{er} test - *A. fumigatus* : observation des cultures à J2

A J2, les résultats sont assez similaires à ceux observés à J1. En effet, on remarque un développement filamenteux important dans les tubes Eppendorf contenant l'inoculum *A. fumigatus* seul dans le milieu YEP et avec Bucovia. Le tube contenant l'escine contient moins de filaments, et de taille moins importante. Il y a eu une possible contamination bactérienne du tube contenant l'extrait de bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril : illisible à J2) (Figure 18).

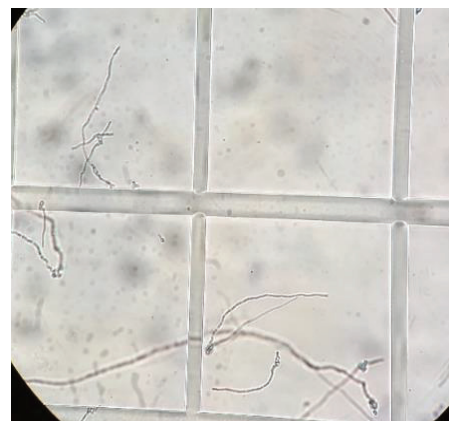
Figure 18. *Aspergillus fumigatus* 1^{er} test à J2 : tests d'inhibition en milieu liquide après 48 h d'incubation.



Aspergillus fumigatus
Inoculum à J2
Objectif x 20



Aspergillus fumigatus
Escine 0,3 % à J2
Objectif x 20



Aspergillus fumigatus
Saponines : extrait de *Solidago virgaurea*
(Bucovia dilué à 0,3 %) à J2
Objectif x 20

• 1^{er} test - *A. fumigatus* : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova à T0, J1 et à J2

A T0 dans l'inoculum de départ, nous avons compté 1750 cellules d'*A. fumigatus* / μL cellules arrondies (soit $1,75 \cdot 10^6$ / mL). Il n'y avait que des spores et pas de filaments.

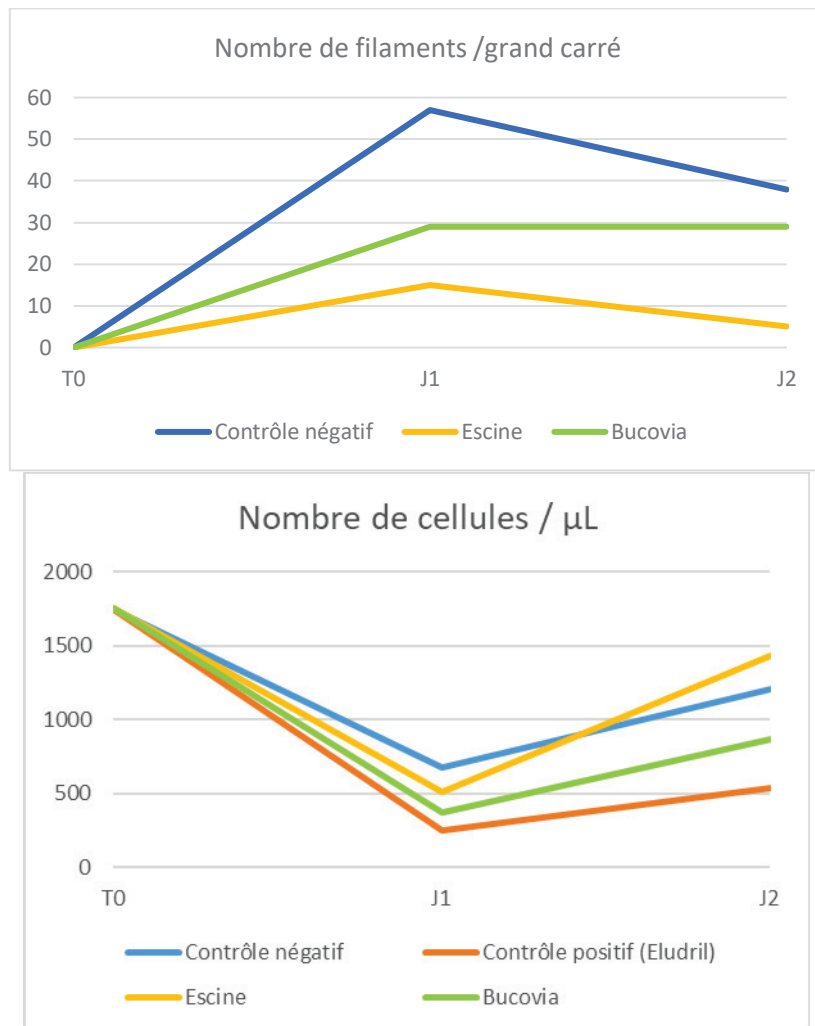
A J1 et J2, le comptage des cellules d'*A. fumigatus* en présence d'inhibiteurs (Eludril, escine et Bucovia) est détaillé dans le Tableau 11. A J2, le pourcentage de filaments était presque identique dans les tubes contenant l'inoculum seul et Bucovia. Cependant, le nombre total de cellules / μL a diminué à J1 avec Eludril, suivi de Bucovia et de l'escine en termes d'efficacité, et à J2 avec Eludril, suivi de Bucovia mais pas de l'escine. Tous les inhibiteurs étaient plus efficaces à J1 qu'à J2. Sur le nombre total de cellules, Bucovia semble plus efficace que l'escine. (Figure 19).

Tableau 11. *Aspergillus fumigatus* incubé pendant 24 h (J1) et 48 h (J2) dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des filaments et des spores fongiques à la cellule Kova (en nombre de cellules / μL). L'inoculum à T0 était de 1750 spores / μL .

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Filaments Par grand carré de la cellule Kova		Spores Par grand carré de la cellule Kova		% filaments		Nombre de cellules / μL	
	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2
Contrôle négatif	57	38	11	83	83 %	32 %	680	1210
Contrôle positif : bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril 0,3 %)	NA	NA	25	54	0 %	0 %	250	540
Saponines : escine 0,3 %	15	5	36	138	29 %	4 %	510	1430
Saponines : solidagosaponines (Bucovia 0,3 %)	29	29	8	58	78 %	33 %	370	870

NA : non applicable (culture contaminée)

Figure 19. *Aspergillus fumigatus* incubé pendant 24 h (J1) et 48 h (J2) dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova. En haut : comptage des filaments / grand carré. En bas : comptage du nombre total de cellules / μL .



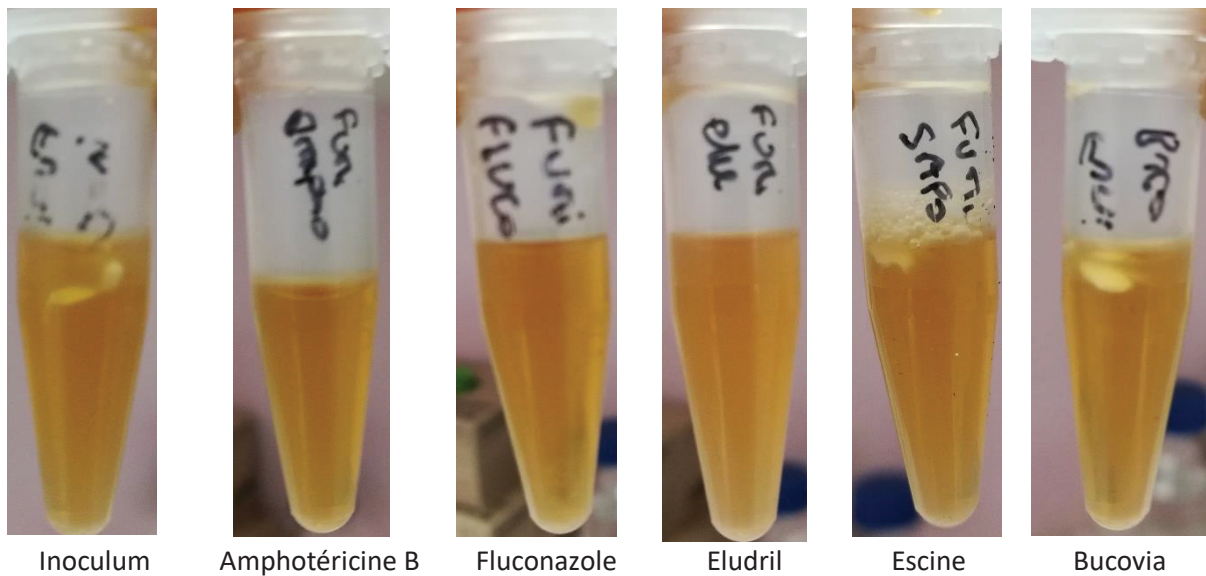
4.3.1.3. *Aspergillus fumigatus* : 2^{ème} test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé un seconde fois *A. fumigatus* en milieu liquide YEP, afin de comparer les résultats entre les deux tests et d'avoir recours à un double comptage. Les comptages au microscope ont cette fois été réalisés après 48 h (J2) et 5 jours (J5) d'incubation.

• 2^{ème} test - *A. fumigatus* : observation macroscopique des tubes Eppendorf à T0, J2 et J5

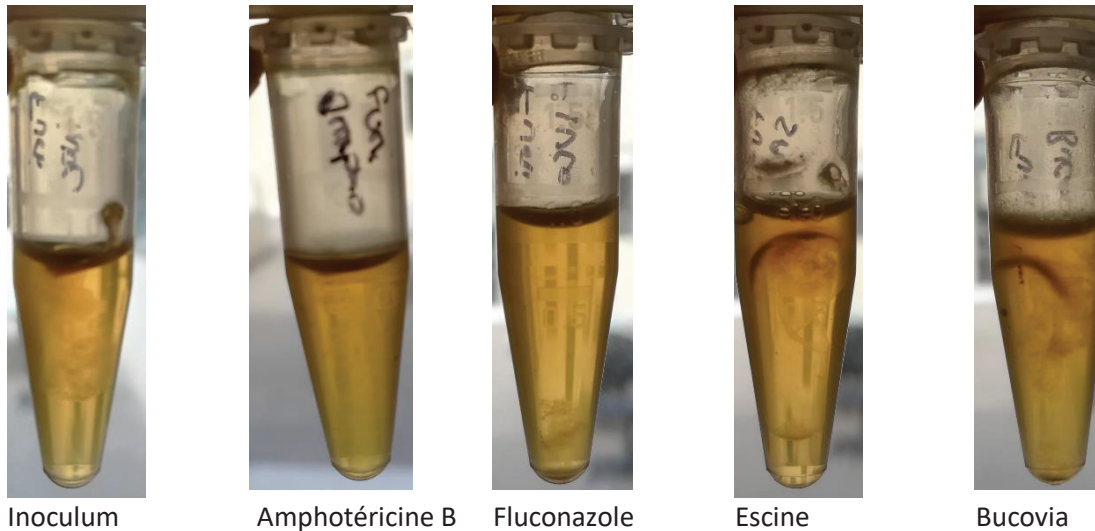
A J2, nous avons remarqué la présence d'un amas de couleur blanc adhérent au tube dans la partie supérieure des tubes contenant l'inoculum seul, l'escine et Bucovia. Dans le tube contenant l'extrait de bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril), nous avons remarqué un léger amas au fond du tube, peu visible sur la photo (Figure 20).

Figure 20. *Aspergillus fumigatus* : aspect visuel des tubes Eppendorf après 48 h (J2) d'incubation dans du milieu YEP. De gauche à droite : 1) milieu YEP inoculé avec *A. fumigatus* sans inhibiteur, 2) amphotéricine B à 0,3 %, 3) fluconazole 0,3 %, 4) Eludril 0,3 %, 5) escine 0,3 %, 6) Bucovia 0,3 %.



A J5, les tubes contenant l'inoculum seul, l'escine et le Bucovia contenaient un amas flottant en surface du tube, de couleur rosée (Figure 21).

Figure 21. *Aspergillus fumigatus* : aspect visuel des tubes Eppendorf après 5 jours (J5) d'incubation dans du milieu YEP. De gauche à droite : 1) milieu YEP inoculé avec *A. fumigatus* sans inhibiteur, 2) amphotéricine B 0,3 %, 3) fluconazole 0,3 %, 4) escine 0,3 %, 5) Bucovia 0,3 %.

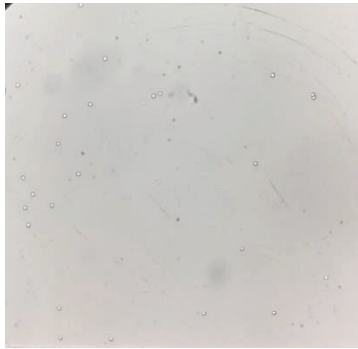


• **2^{ème} test - *A. fumigatus* : observation des cultures à J2**

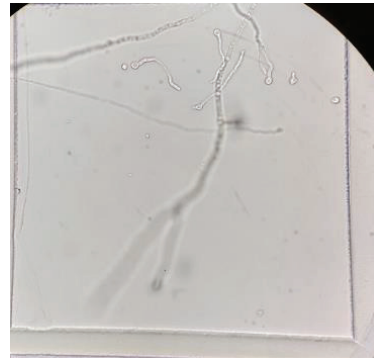
A J2, dans les tubes avec le bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril) et l'amphotéricine B se sont avérés très difficiles à compter de par la petite taille des cellules. Une dilution au 1/10^{ème} a été effectuée pour la culture avec Eludril. En présence de ces deux inhibiteurs, il n'y avait pas de filament fongique. Avec le fluconazole, il n'y avait aucun filament fongique. Les cellules étaient de petite taille et présentaient des dysmorphies importantes

Dans les tubes contenant l'escine et le Bucovia, la formation filamenteuse semblait visuellement être retardée par rapport à l'inoculum. Nous avons observé surtout des pseudo-filaments ainsi que des spores qui se regroupaient en amas (Figure 22).

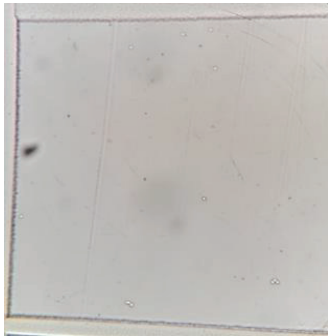
Figure 22. *Aspergillus fumigatus* 2^{ème} test à J2 : tests d'inhibition en milieu liquide après 48 h d'incubation.



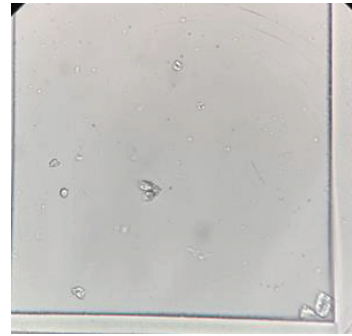
Aspergillus fumigatus
Inoculum à T0
Objectif x 40



Aspergillus fumigatus
Inoculum à J2
Objectif x 40



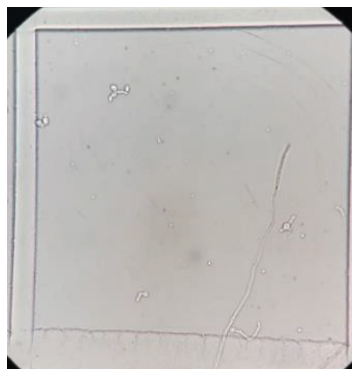
Aspergillus fumigatus
Amphotéricine B 0,3 % à J2
Objectif x 40



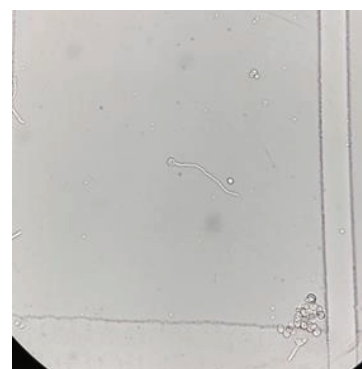
Aspergillus fumigatus
Fluconazole 0,3 % à J2
Objectif x 40



Aspergillus fumigatus
Eludril 0,3 % à J2
Objectif x 40



Aspergillus fumigatus
Escine 0,3 % à J2
Objectif x 40

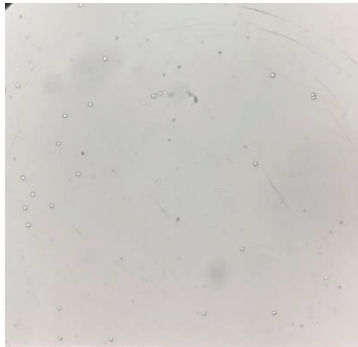


Aspergillus fumigatus
Saponines : extrait de *Solidago virgaurea* (Bucovia 0,3 %) à J2
Objectif x 40

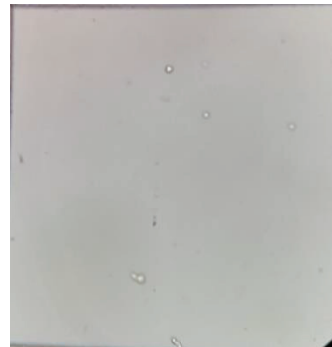
- **2^{ème} test - *A. fumigatus* : observation des cultures à J5**

Il semblait y avoir moins de filaments après 5 jours comparés à 2 jours d'incubation dans les tubes d'inoculum et d'escine. Le tube contenant le Bucovia présentait des filaments bien formés et des spores en amas, mais le résultat était peut-être influencé par une possible contamination bactérienne de la culture. Enfin, nous avons noté une absence de filament dans les tubes contenant le bain de bouche antiseptique (Eludril), l'amphotéricine B et le fluconazole (Figure 23).

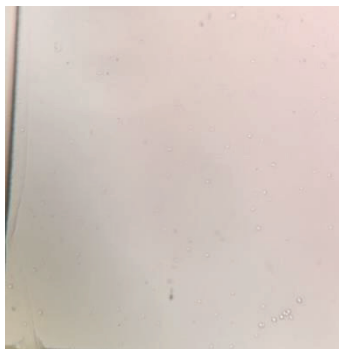
Figure 23. *Aspergillus fumigatus* 2^{ème} test à J5 : tests d'inhibition en milieu liquide après 5 jours d'incubation.



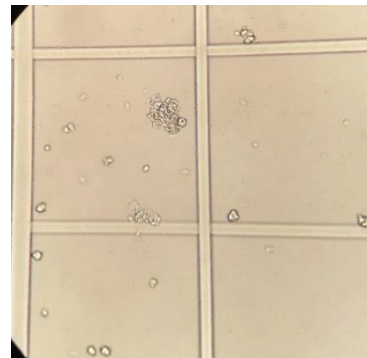
Aspergillus fumigatus
Inoculum à T0
Objectif x 40



Aspergillus fumigatus
Inoculum à J5
Objectif x 40



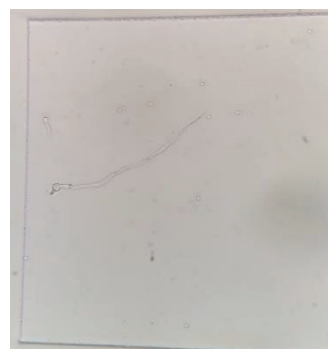
Aspergillus fumigatus
Amphotéricine B 0,3 % à J5
Objectif x 40



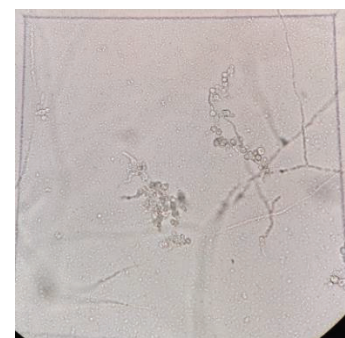
Aspergillus fumigatus
Fluconazole 0,3 % à J5
Objectif x 20



Aspergillus fumigatus
Eludril 0,3 % à J5
Objectif x 40



Aspergillus fumigatus
Escine 0,3 % à J5
Objectif x 40



Aspergillus fumigatus
Saponines : extrait de *Solidago virgaurea* (Bucovia 0,3 %) à J5
Objectif x 40

• 2^{ème} test - *A. fumigatus* : comptage des spores et des filaments à T0, J2 et J4

A T0, J2 et J4, nous avons réalisé une double lecture avec deux opérateurs (AL et JV), pour réaliser le comptage des spores et des filaments et contrôler la reproductibilité du comptage (Tableaux 12 à 15).

Tableau 12. *Aspergillus fumigatus* : tests d'inhibition en milieu liquide avec comptage des spores (S) et des filaments (F). Le comptage a été réalisé sur deux tubes par deux opérateurs (AL et JV), soit quatre lectures par culture. Le comptage a été réalisé à T0 avec l'inoculum de départ, puis à J2 et à J4.

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Opérateur 1 (AL)		Opérateur 2 (JV)		Commentaires	
	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2
Inoculum						
T0	2100 S	800 S	1820 S	570 S		
J2	290 S 300 F	450 S 400 F	440 S 390 F	390 S 490 F		
J4	60 F	10 F	250 S 140 F	150 S		Contamination bactérienne
Amphotéricine B 0,3 %						
J2	440 S	260 S	80 S	1570 S	Pas de filaments	
J4	Comptage trop difficile				Pas de filaments	Contamination bactérienne
Fluconazole 0,3 % - dilution de la culture au 1/10						
J2	Cellules trop petites	230 S	90 S	100 S	Pas de filaments	
J4	Comptage trop difficile					Cellules trop petites Pas de filaments
Eludril 0,3 % - dilution de la culture au 1/10						
J2	1420 S	220 S	330 S	210 S	Toutes petites cellules Pas de filaments	
J4	Comptage trop difficile				Toutes petites cellules Pas de filaments	
Escine 0,3 %						
J2	3660 S 270 F	890 S 190 F	2580 S 150 F	1330 S 30 F	Beaucoup de cellules en amas	
J4	410 S 90 F	720 S 160 F	220 S 5 F	Cellules trop petites		Contamination bactérienne
Bucovia 0,3 %						
J2	1030 S 130 F	510 S 20 F	1220 S 350 F	580 S 90 F		
J4	70 S 70 F	530 S 160 F	70 S 70 F	Cellules trop petites		Contamination bactérienne

Tableau 13. *Aspergillus fumigatus* : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs. A) Comptage des spores à T0, J2 et J4. Lecture par deux opérateurs (AL et JV). Culture dupliquée en deux tubes. Les résultats sont exprimés en nombre de spores par μL . B) Evolution du nombre moyen de spores de T0 à J4 par inhibiteur. *Italiques* : culture contaminée. ND= *Not done* ; les cultures contenant l'amphotéricine B, le fluconazole et Eludril se sont avérées trop difficiles à compter à J4 (cellules trop petites et contamination bactérienne).

A						
<i>Aspergillus fumigatus</i> spores	Opérateur 1 (AL)		Opérateur 2 (JV)		Moyenne	Ecart type
	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2		
Inoculum						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	290	450	440	390	393	73
J4	0	0	250	150	100	122
Amphotéricine B						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	440	260	80	1570	588	671
J4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fluconazole						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	0	230	90	100	105	95
J4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eludril						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	1420	220	330	210	545	586
J4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Escine						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	3660	890	2580	1330	2115	1254
J4	410	720	220	ND	450	252
Bucovia						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	1030	510	1220	580	835	345
J4	70	530	70	ND	223	266

B

Spores / μL	T0	J2	J4
Inoculum	1323	393	100
Ampho B	1323	588	ND
Fluconazole	1323	105	ND
Eludril	1323	545	ND
Escine	1323	2115	383
Bucovia	1323	835	168

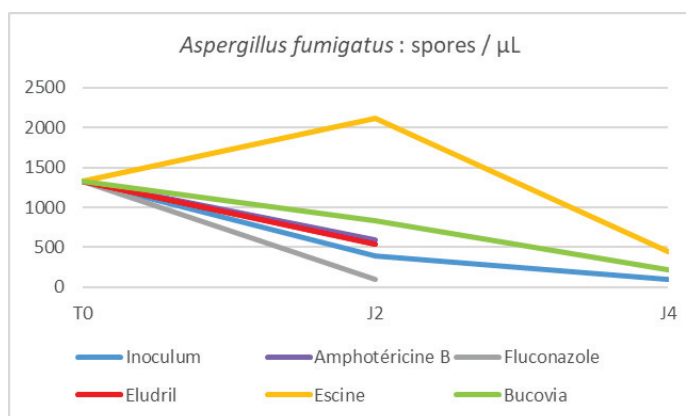


Tableau 14. *Aspergillus fumigatus* : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs. A) Comptage des filaments à T0, J2 et J4. Lecture par deux opérateurs (AL et JV). Culture dupliquée en deux tubes. Les résultats sont exprimés en nombre de filaments par μL . B) Evolution du nombre moyen de filaments de T0 à J4 par inhibiteur. *Italiques* : culture contaminée.

A						
<i>Aspergillus fumigatus</i> filaments	Opérateur 1 (AL)		Opérateur 2 (JV)		Moyenne	Ecart type
	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2		
Inoculum						
T0	0	0	0	0	0	0
J2	300	400	390	490	395	78
J4	60	10	140	80	73	54
Amphotéricine B						
T0	0	0	0	0	0	0
J2	0	0	0	0	0	0
J4	0	0	0	0	0	0
Fluconazole						
T0	0	0	0	0	0	0
J2	0	0	0	0	0	0
J4	0	0	0	0	0	0
Eludril						
T0	0	0	0	0	0	0
J2	0	0	0	0	0	0
J4	0	0	0	0	0	0
Escine						
T0	0	0	0	0	0	0
J2	270	190	150	30	160	100
J4	90	160	5	0	64	76
Bucovia						
T0	0	0	0	0	0	0
J2	130	20	350	90	148	142
J4	70	160	70	0	75	66

B

Filaments / μL	T0	J2	J4
Inoculum	0	395	53
Ampho B	0	0	0
Fluconazole	0	0	0
Eludril	0	0	0
Escine	0	160	64
Bucovia	0	148	75

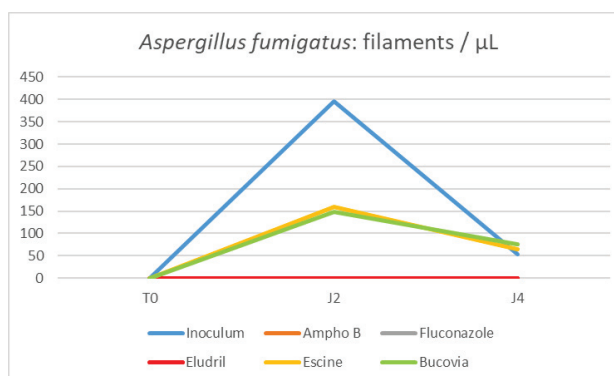
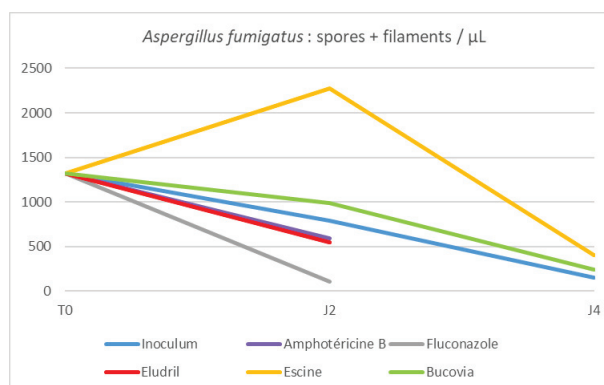


Tableau 15. *Aspergillus fumigatus* : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs. Comptage des cellules (spores et filaments) à T0, J2 et J4. Lecture par deux opérateurs (AL et JV). Culture dupliquée en deux tubes. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par μL . B) Evolution du nombre moyen de cellules de T0 à J4 par inhibiteur. *Italiques* : culture contaminée. ND : *Not Done* ; cultures trop difficiles à compter (cellules de petite taille et contamination bactérienne).

A						
<i>Aspergillus fumigatus</i> Spores et filaments	Opérateur 1 (AL)		Opérateur 2 (JV)		Moyenne	Ecart type
	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2		
Inoculum						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	590	850	830	880	788	133
J4	60	<i>10</i>	390	<i>150</i>	<i>153</i>	<i>169</i>
Amphotéricine B						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	440	260	80	1570	588	671
J4	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>
Fluconazole						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	ND	230	90	100	105	95
J4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eludril						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	1420	220	330	210	545	586
J4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Escine						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	3930	1080	2730	1360	2275	1318
J4	500	<i>880</i>	225	<i>ND</i>	<i>401</i>	<i>379</i>
Bucovia						
T0	2100	800	1820	570	1323	751
J2	1160	530	1570	670	983	476
J4	140	<i>690</i>	140	<i>ND</i>	<i>243</i>	<i>306</i>

B

Spores + filaments / μL	T0	J2	J4
Inoculum	1323	788	153
Ampho B	1323	588	0
Fluconazole	1323	105	0
Eludril	1323	545	0
Escine	1323	2275	401
Bucovia	1323	983	243



4.3.2. *Fusarium sp.*, souche sauvage

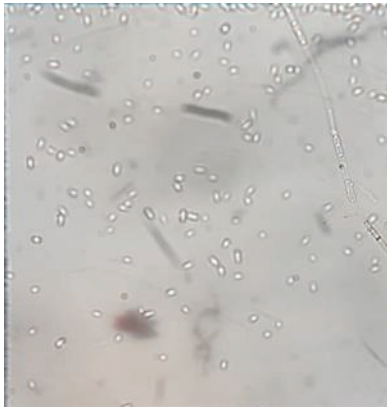
4.3.2.1. *Fusarium sp.* : 1^{er} test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé une souche sauvage de *Fusarium sp.* en milieu liquide YEP avec les inhibiteurs suivants : fluconazole 0,3 %, Eludril 0,3 %, escine 0,3 % et Bucovia 0,3 %. Les inhibiteurs ont tous été dilués dans le milieu YEP. Les manipulations ont été réalisées à 48 h (J2) et 7 jours de culture (J7).

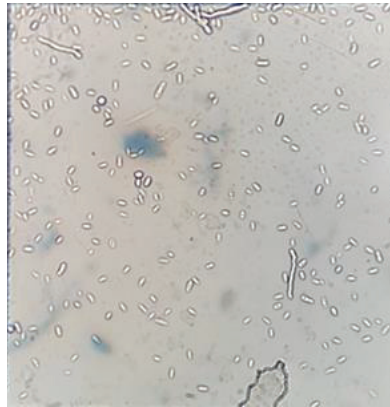
Observation de la morphologie des cellules fongiques à la cellule Kova à J2

L'observation des cellules fongiques à T0 dans la culture qui ne contient que l'inoculum met en évidence des spores de forme ovalaires, isolés ou en chainettes. Après 48 h d'incubation, on observe des pseudo-filaments qui commencent à se former dans les tubes Eppendorf contenant l'inoculum seul, le Bucovia à 0,3 % ainsi que le fluconazole. Il semble y avoir une contamination bactérienne au sein de la culture testée avec l'escine 0,3 %. On observe une déformation de la morphologie cellulaire en présence de bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril 0,3 %), avec une taille diminuée (Figure 24).

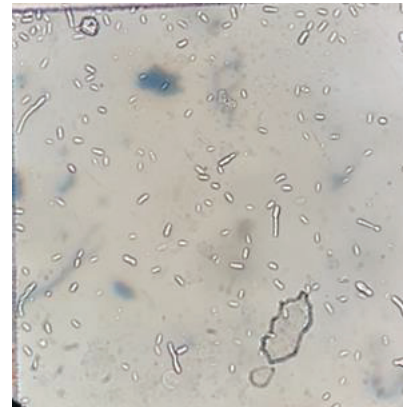
Figure 24. *Fusarium sp.* à J2 : test d'inhibition en milieu liquide après deux jours d'incubation. Objectif x 40.



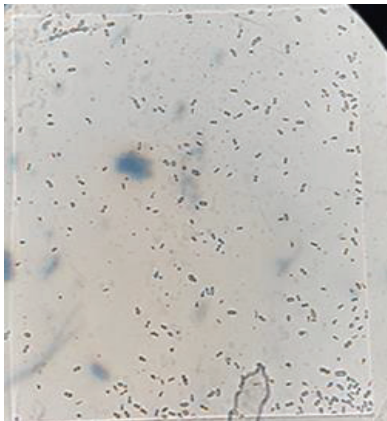
Fusarium sp.
Inoculum à T0 x 40



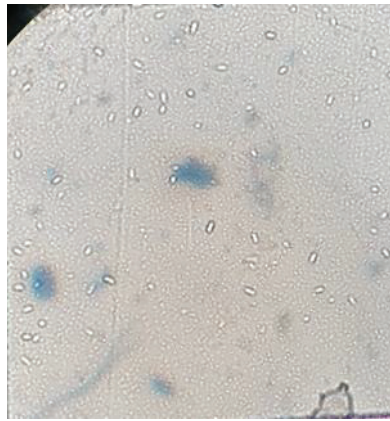
Fusarium sp.
Inoculum à J2 x 40



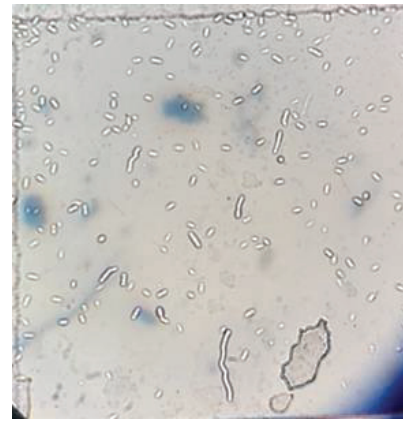
Fusarium sp.
Fluconazole 0,3 % à J2 x 40



Fusarium sp.
Eludril 0,3 % à J2 x 40



Fusarium sp.
Escine 0,3 % à J2 x 40

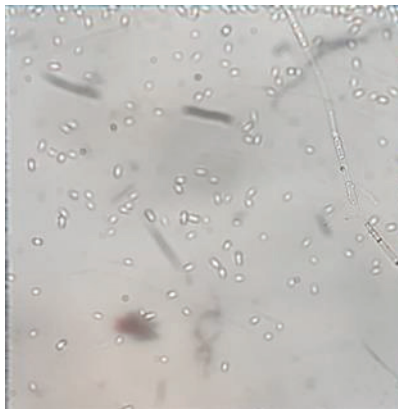


Fusarium sp.
Bucovia 0,3 % à J2 x 40

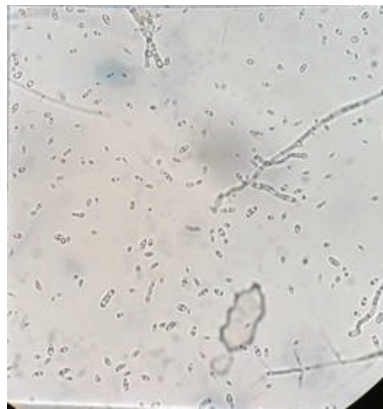
Observation des cellules fongiques à la cellule Kova à J7

Après 7 jours d'incubation, la transformation de la forme de spores à filaments ne s'est faite que dans les tubes ne contenant pas d'inhibiteur ainsi que celui testé avec le Bucovia 0,3 %. La formation des filaments semble être retardée visuellement en présence de Bucovia 0,3% en comparaison avec l'inoculum seul (Figure 25).

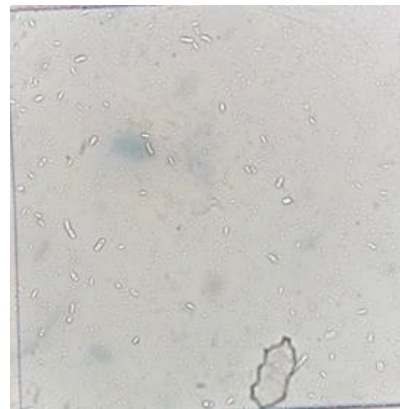
Figure 25. *Fusarium sp.* à J7 : test d'inhibition en milieu liquide après 7 jours d'incubation. La culture avec Fluconazole 0,3 % est contaminée. Une dilution de chaque culture au 1/10^{ème} a été réalisée afin de faciliter la lecture. Objectif x 40.



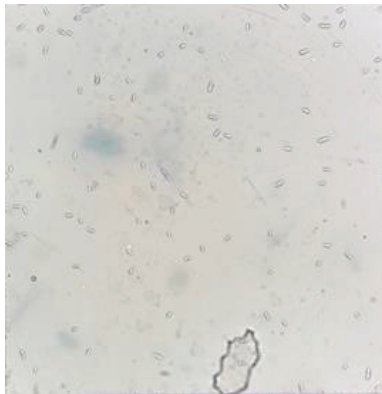
Fusarium sp.
Inoculum à T0 x 40



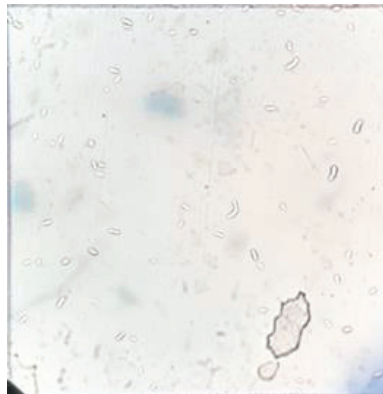
Fusarium sp.
Inoculum à J7 x 40



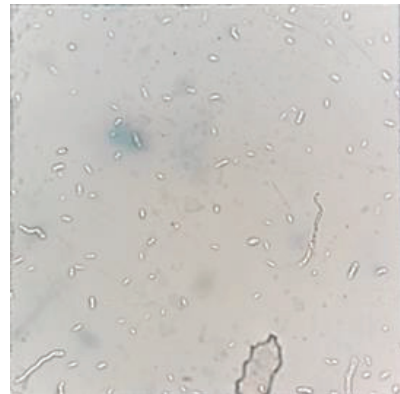
Fusarium sp.
Fluconazole 0,3 % à J7 x 40



Fusarium sp.
Eludril 0,3 % à J7 x 40



Fusarium sp.
Escine 0,3 % à J7 x 40



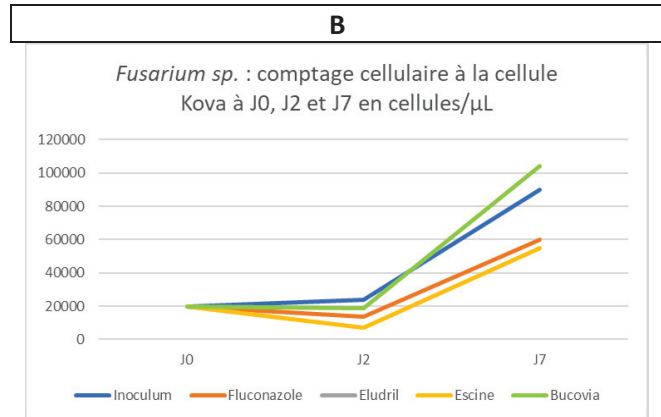
Fusarium sp.
Bucovia 0,3 % à J7 x 40

Comptage des spores et des filaments à la cellule Kova à J0, J2 et J7

On note une augmentation du nombre de cellules par μL dans chaque culture. L'augmentation est plus marquée pour l'inoculum seul et en présence de Bucovia 0,3 %. Le comptage n'a pas pu être fait pour l'inhibiteur Eludril 0,3 % à cause de la taille trop petite des cellules (Tableau 16).

Tableau 16. *Fusarium sp.* : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs. A) Comptage des cellules à J0, J2 et J7. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par μL . B) Evolution du nombre de cellules de T0 à J7 par inhibiteur.

A			
	J0	J2	J7
Inoculum	20000	24000	90000
Fluconazole 0,3 %	20000	13900	60000
Eludril 0,3 %	20000	ND	114000
Escine 0,3 %	20000	7300	55000
Bucovia 0,3 %	20000	18700	104000



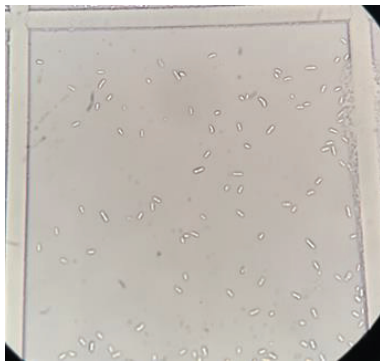
4.3.2.2. *Fusarium sp.* : 2^{ème} test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé une seconde fois *Fusarium sp.* afin de comparer les résultats entre eux et d'avoir recours à un double comptage. Les manipulations en cellules Kova ont été réalisées au 3^{ème} et au 9^{ème} jour de culture. Un inhibiteur à tester a été ajouté en guise de contrôle : l'amphotéricine B diluée à 0,3 % dans du milieu YEP.

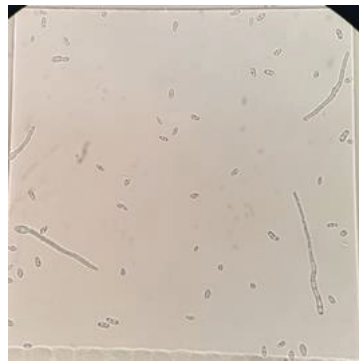
Observation des cellules fongiques à la cellule Kova à J0, J3 et J9

Contrairement à la première manipulation, nous constatons que la transition de la forme d'hyphe à la forme filamenteuse se fait en présence d'inhibiteurs tels que Bucovia à 0,3 % et l'escine 0,3 %, qui contiennent des saponines, mais également en présence de fluconazole à 0,3 % à moindre échelle. Les filaments ont tendance à être de taille plus réduite que pour l'inoculum seul. En présence de bain de bouche à la chlorhexidine, on observe plutôt des spores en chainettes. On observe de nombreuses dysmorphies cellulaires (Figure 26).

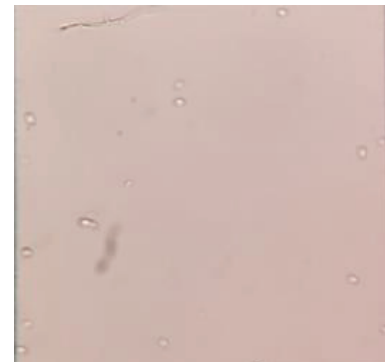
Figure 26. *Fusarium sp.* : test d'inhibition en milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs après 3 jours d'incubation. Objectif x 40.



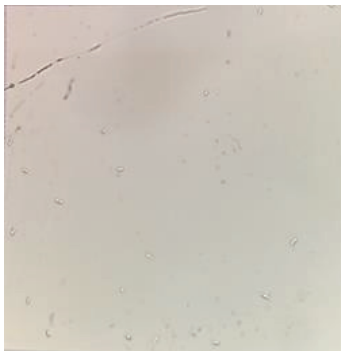
Fusarium sp.
Inoculum à T0 x 40



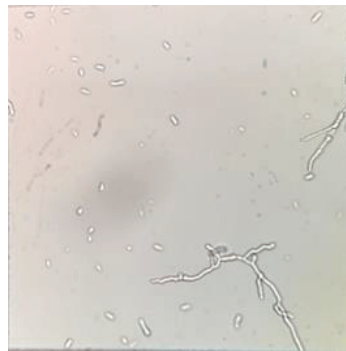
Fusarium sp.
Inoculum à J3 x 40



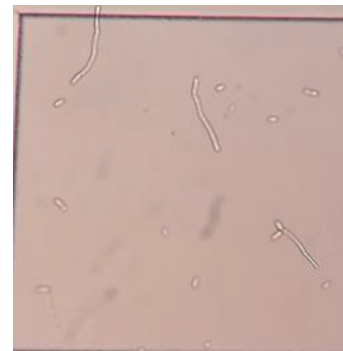
Fusarium sp.
Fluconazole 0,3 % à J3 x 40



Fusarium sp.
Eludril 0,3 % à J3 x 40



Fusarium sp.
Escine 0,3 % à J3 x 40



Fusarium sp.
Bucovia 0,3 % à J3 x 40

Comptage du nombre de spores et filaments à la cellule Kova à J0, J3 et J0

L'évolution du nombre de spores par μL est comparable dans les tubes contenant l'inoculum seul, l'escine à 0,3 % et Bucovia 0,3 %. On dénombre moins de spores en présence des autres inhibiteurs testés, qui obtiennent des résultats comparables entre eux. En ce qui concerne la formation filamenteuse, le nombre le plus important se trouve dans le tube contrôle (sans inhibiteurs). De nouveau, l'évolution du nombre de filaments est comparable entre le tube d'escine 0,3 % et celui de Bucovia 0,3 %. (Tableau 17, Figures 27 et 28).

Tableau 17. *Fusarium sp.* : tests d'inhibition en milieu liquide avec comptage des spores (S) et des filaments (F). Le comptage a été réalisé sur deux tubes par deux opérateurs (AL et JV), soit quatre lectures par culture. Le comptage a été réalisé à T0 avec l'inoculum de départ, puis à J3 et à J9. ND= *Not done*.

		Opérateur 1		Opérateur 2	
		Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2
Inoculum	T0	6520S 70F	9300S 100F	11800S 50F	10200S 0F
	J3	6300 S 800 F	5640 S 360F	7820S 1000F	8580 S 660F
	J9	8700S 1400F	3150S 400F	ND	ND
Amphotéricine B 0,3 %	J3	8250S 150 F	ND	8900S 100F	ND
	J9	3950S	ND	ND	ND
Fluconazole 0,3 %	J3	3500S 400 F	3600S 900F	6500S 900F	6800S 950F
	J9	5300S 650F	3750S 400F	ND	ND
Eludril 0,3 %	J3	1050S 50F	1350S 100F	12800S 150F	8050S 0F
	J9	7200S	1350S 50F	ND	ND
Escine 0,3 %	J3	8920S 280F	ND	6540S 300F	6340S 160F
	J9	6750S	7000S 350F	ND	ND
Bucovia 0,3 %	J3	4350S 350F	1200S 250F	5300S 550F	5150S 250F
	J9	6500S 200F	6750S 250F	ND	ND

Figure 27. *Fusarium sp.* : évolution du nombre de spores à J0, J3 et J9 en présence d'inhibiteurs en milieu liquide YEP.

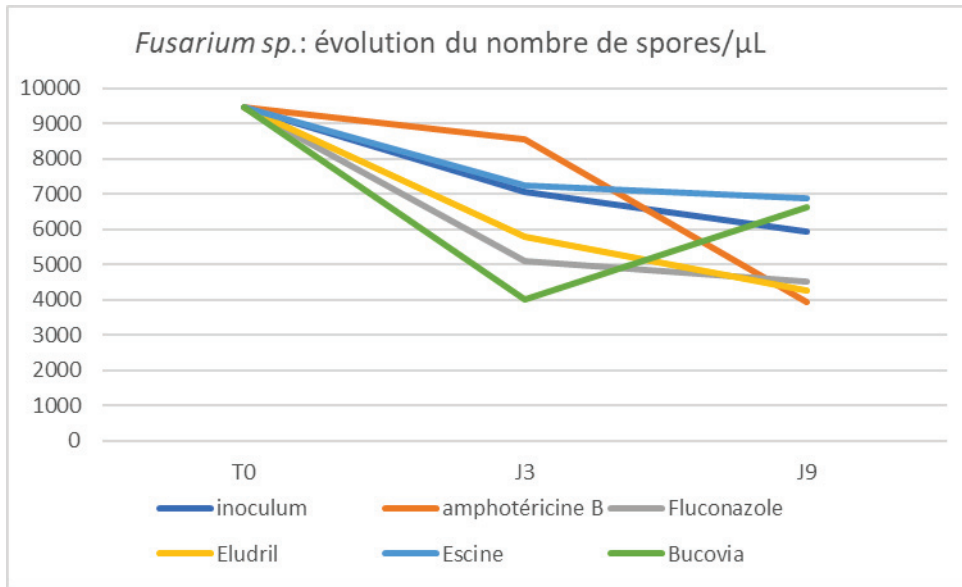
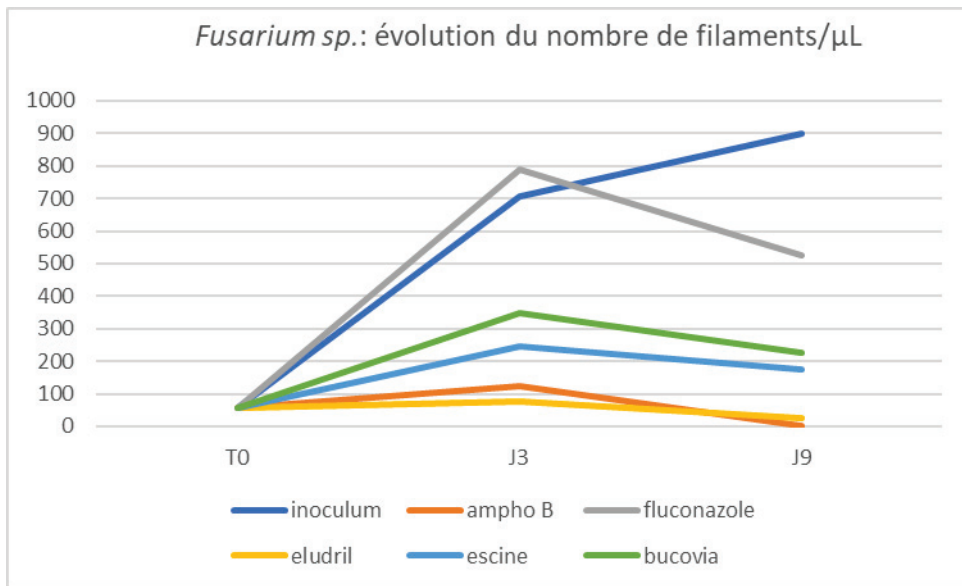


Figure 28. *Fusarium sp.* : évolution du nombre de filaments à J0, J3 et J9 en présence d'inhibiteurs, en milieu liquide YEP.

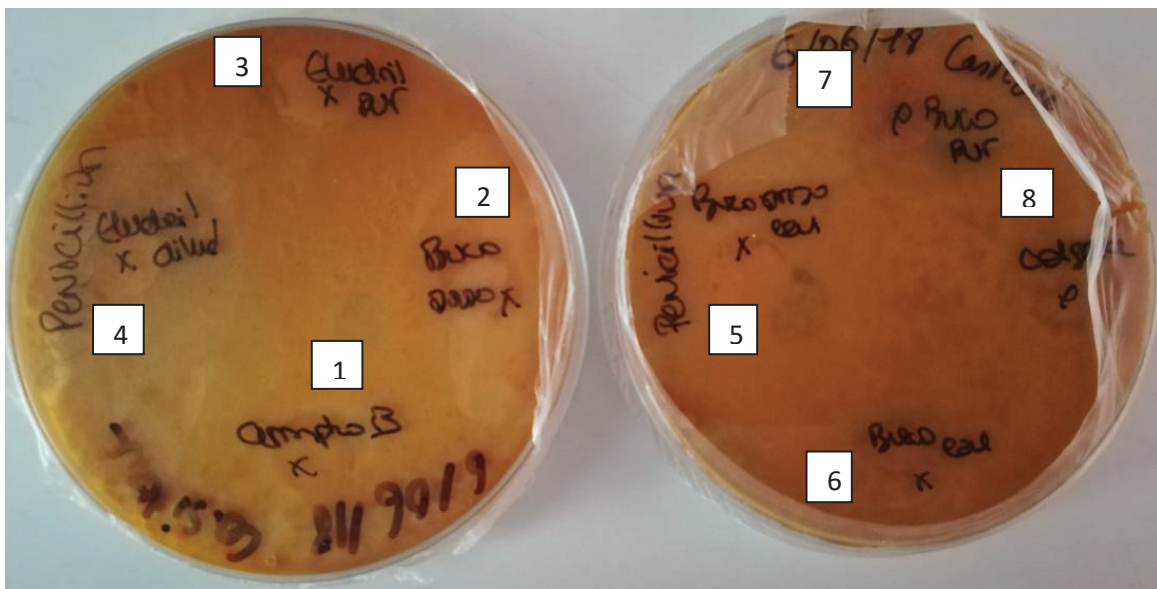


4.3.3. *Penicillium sp.*, souche sauvage

4.3.3.1. *Penicillium sp.* : tests d'inhibition sur milieu solide

Nous avons testé la souche de *Penicillium* sur milieu solide casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B à 0,3 %, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO et dentifrice Colgate. Nous n'avons observé aucun diamètre d'inhibition autour des inhibiteurs testés (Figure 29).

Figure 29. *Penicillium sp.* : test d'inhibition sur milieu casitone. 1) amphotéricine B (Contrôle positif), 2) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO, 3) Eludril pur, 4) Eludril dilué à 0,3 %. A droite: 5) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, 6) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, 7) Bucovia pur, 8) dentifrice Colgate.



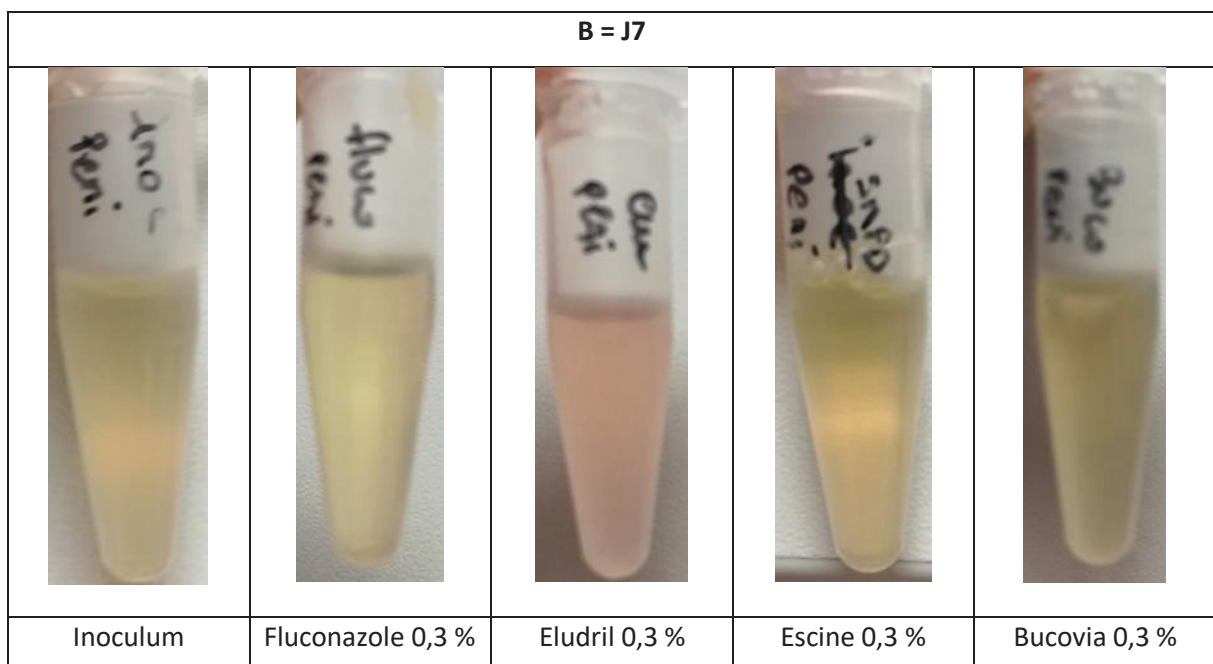
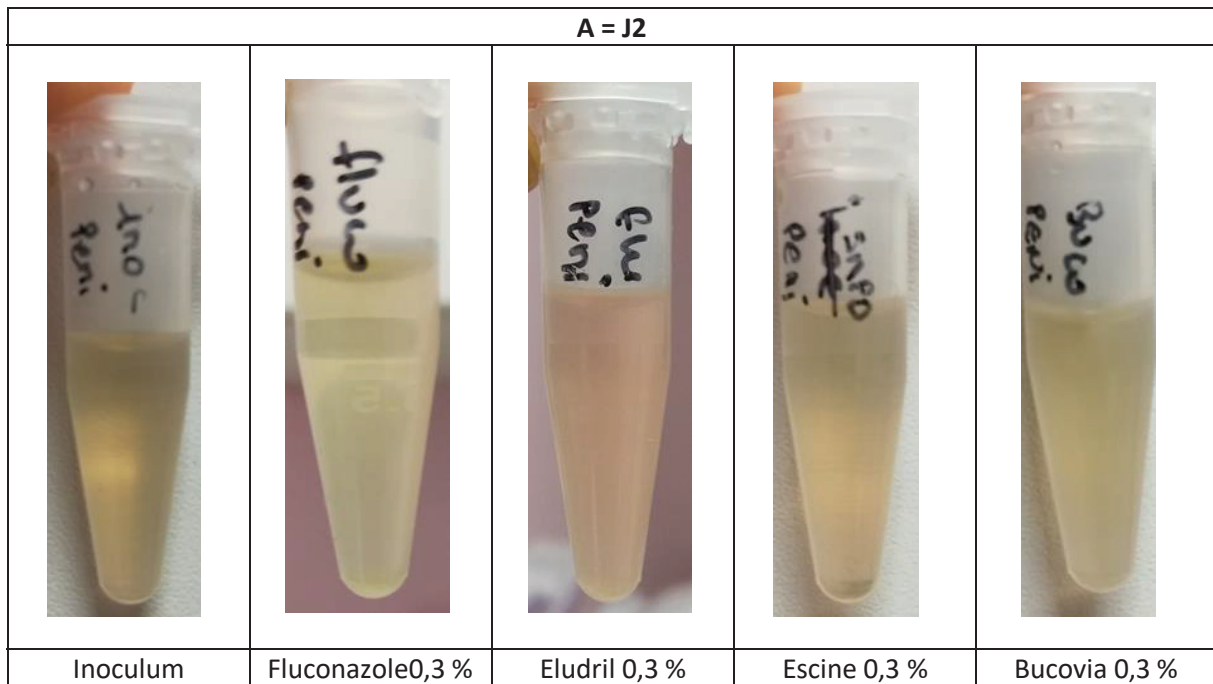
4.3.3.2. *Penicillium sp.* : 1^{er} test d'inhibition en milieu liquide

Nous avons testé *Penicillium sp.* en milieu liquide YEP avec les inhibiteurs suivants : fluconazole 0.3 %, Eludril 0,3 %, escine 0,3 % et Bucovia 0,3 %. Tous les inhibiteurs ont été dilués à 0,3 % au préalable dans du milieu YEP.

Observation macroscopique des tubes Eppendorf

Sur le plan visuel, un amas surnageant (peu visible sur la photographie) était présent dans le tube contenant Bucovia, ce qui suggère que Bucovia inhibe l'adhérence des cellules fongiques aux parois du tube (Figure 30).

Figure 30. *Penicillium sp.* : aspect visuel des tubes Eppendorf. A) Après 48 h (J2) d'incubation dans du milieu YEP. B) Après 7 jours (J7) d'incubation. De gauche à droite : 1) milieu YEP inoculé avec *Penicillium sp.* sans inhibiteur (Inoculum), 2) fluconazole 0.3 % 3) Eludril 0,3 %, 4) escine 0,3 %, 5) Bucovia 0,3 %.

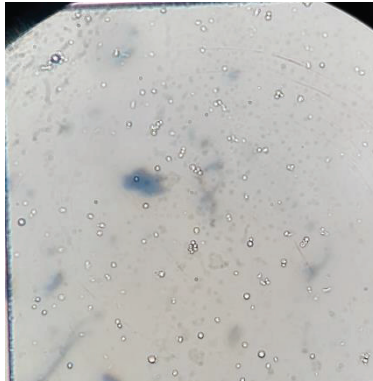


Observation de la morphologie des cellules fongiques à la cellule Kova à J2

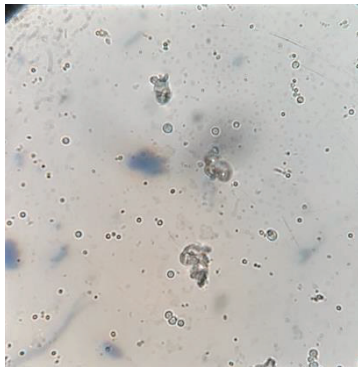
A 48 h (J2), la transition de la forme de spore à la forme d'hyphe n'a pas encore commencé. Les spores sont similaires dans les tubes d'inoculum seul et contenant l'extrait de Bucovia. Ce sont de cellules bien rondes. Elles ont particulièrement tendance à se regrouper en amas dans le tube contenant seulement la souche fongique (Inoculum). Le tube contenant le fluconazole présente des dysmorphies cellulaires. Les cellules sont de taille réduite dans le tube contenant le bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril) (Figure 31).

A 7 jours d'incubation, nous n'observons aucun filament. Il semble y avoir un retard de croissance fongique qui peut être lié à une erreur de manipulation, rendant le test invalide (Figure 32)

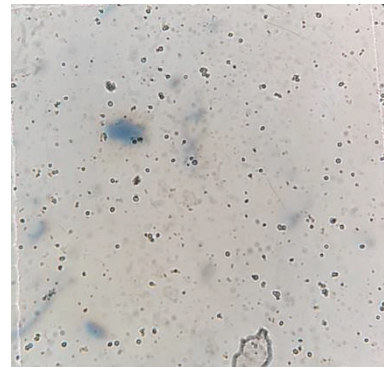
Figure 31. *Penicillium sp* à J2 : tests d'inhibition en milieu liquide après 2 jours d'incubation.



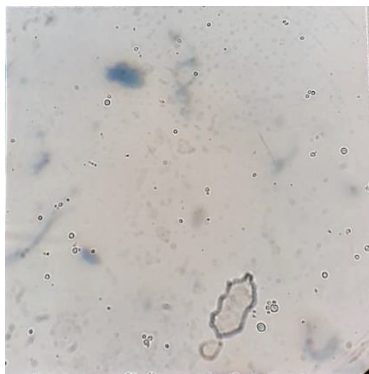
Penicillium sp.
Inoculum à J2
Objectif x 40



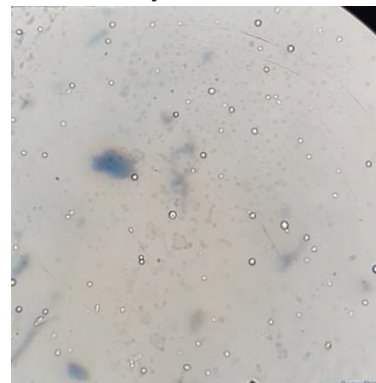
Penicillium sp.
Fluconazole 0,3 % à J2
Objectif x 40



Penicillium sp.
Eludril 0,3 % à J2
Objectif x 40

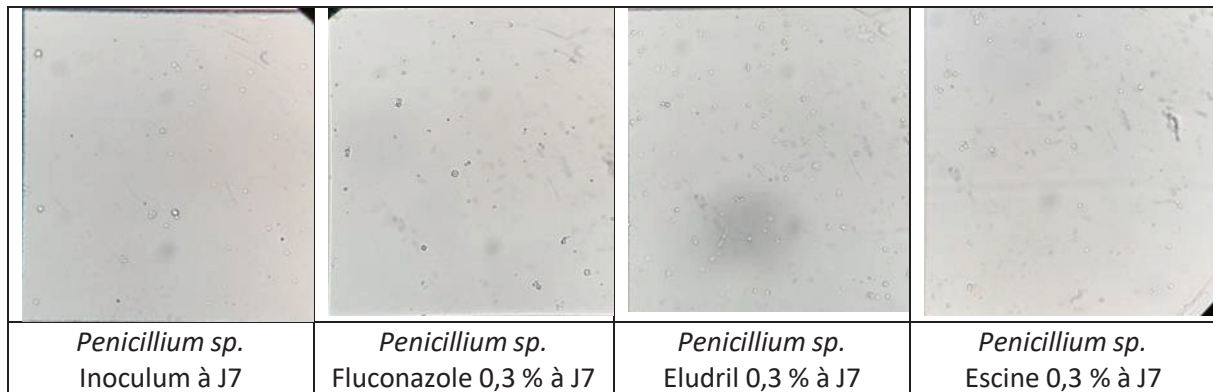


Penicillium sp.
Escine 0,3 % à J2
Objectif x 40



Penicillium sp.
Saponines : extrait de *Solidago virgaurea*
(Bucovia dilué à 0,3 %) à J2
Objectif x 40

Figure 32. *Penicillium sp* à J7 : tests d'inhibition en milieu liquide après 7 jours d'incubation. Objectif x 40

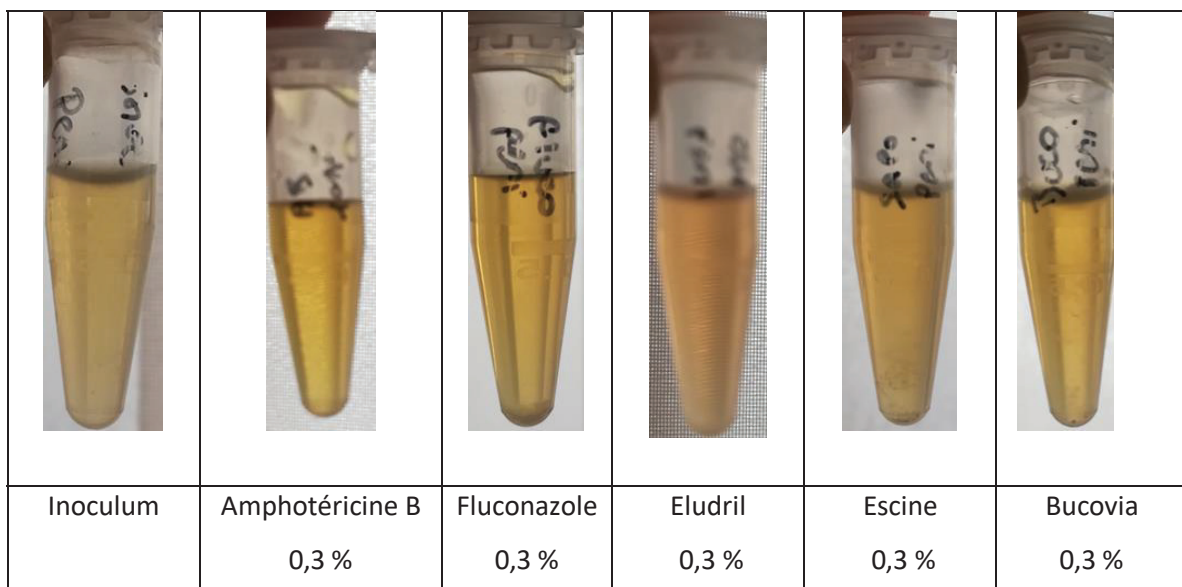


4.3.3.3. *Penicillium sp.* : 2^{ème} test d'inhibition en milieu liquide

La manipulation en milieu liquide YEP a été répétée, en présence des mêmes inhibiteurs en ajoutant de l'amphotéricine B diluée à 0,3 % dans du YEP. Nous avons réalisé un comptage des spores à T0 ainsi qu'une observation à la cellule Kova à 72 h d'incubation (J3).

Aspect macroscopique des tubes Eppendorf

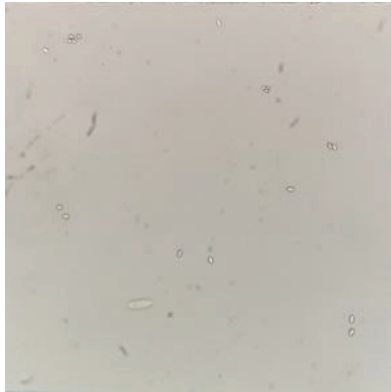
Figure 33. *Penicillium sp.* : aspect visuel des tubes Eppendorf après 72 h (J3) d'incubation dans du milieu YEP. De gauche à droite : 1) milieu YEP inoculé avec *Penicillium sp.* sans inhibiteur (Inoculum), 2) Amphotéricine B 0,3 %, 3) fluconazole 0,3 % 4) Eludril 0,3 %, 5) escine 0,3 %, 6) Bucovia 0,3 %.



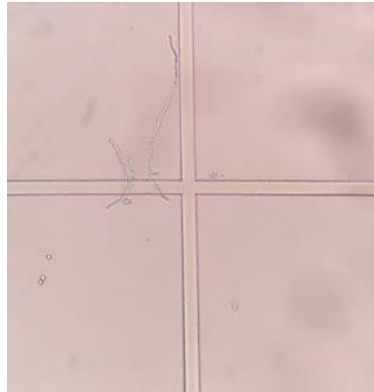
Observation de la morphologie des cellules fongique à la cellule Kova à J3

Le développement des hyphes ne s'est fait que dans les tubes contenant l'inoculum seul et les extraits contenant des saponines (escine 0,3 % et Bucovia 0,3 %). En présence de l'inhibiteur fluconazole 0,3 %, il y a une quantité importante de cellules dysmorphiques. Pour ce qui est du bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril 0,3 %), on observe des cellules de petite taille (Figure 34).

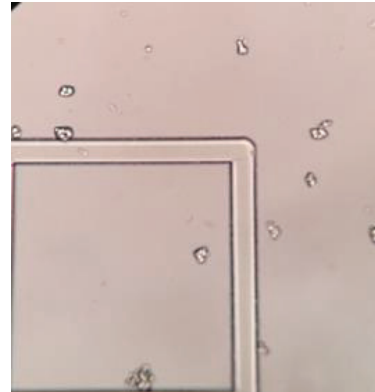
Figure 34. *Penicillium sp.* : test d'inhibition en milieu liquide après 72h d'incubation.



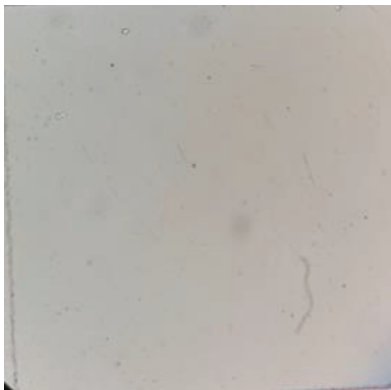
Penicillium sp.
Inoculum à T0
Objectif x 40



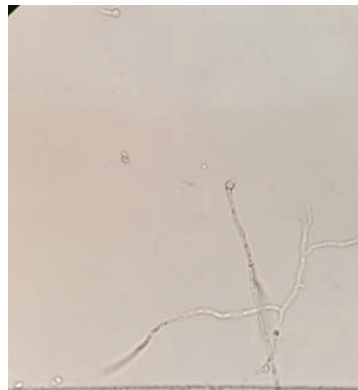
Penicillium sp.
Inoculum à J3
Objectif x 20



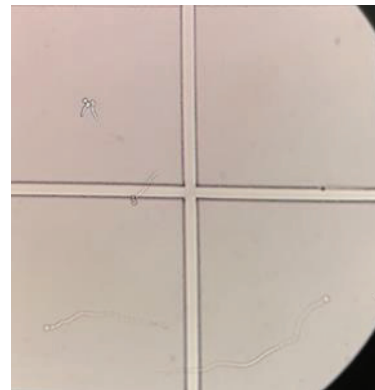
Penicillium sp.
Fluconazole 0,3 % à J3
Objectif x 20



Penicillium sp.
Eludril 0,3 % à J3
Objectif x 40



Penicillium sp.
Escine 0,3 % à J3
Objectif x 40

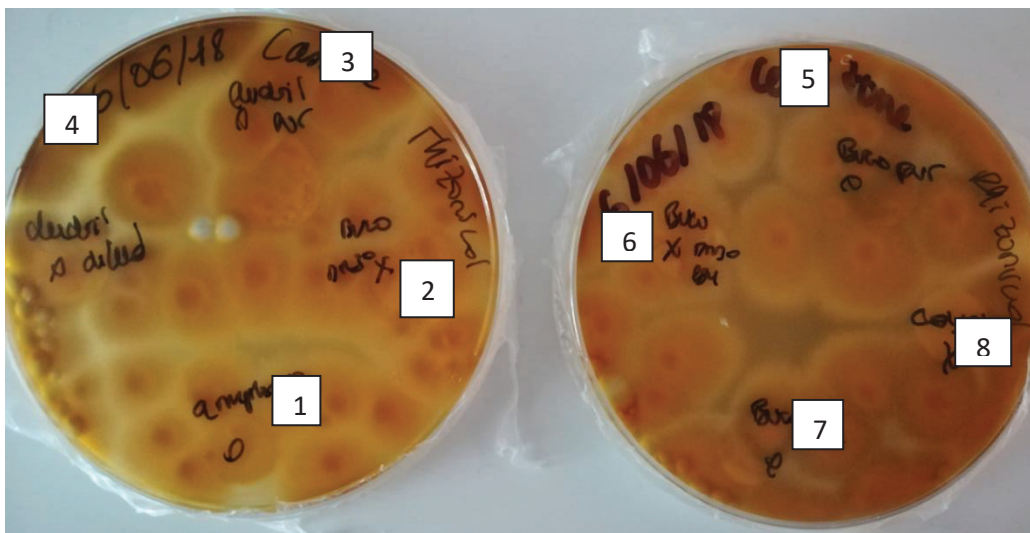


Penicillium sp.
Bucovia 0,3 % à J3
Objectif x 40

4.3.4. *Rhizomucor sp.*, souche sauvage

Nous avons testé la souche de *Rhizomucor* sur milieu solide casitone avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B 0,3 %, Eludril pur, Eludril 0,3 %, Bucovia pur, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO, Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau et du DMSO, dentifrice Colgate. La croissance fongique n'est pas uniforme sur la surface des boîtes de culture. Il n'y a pas de résultat d'inhibition visible autour des disques (Figure 35).

Figure 35. *Rhizomucor sp.* : test d'inhibition sur milieu casitone. A gauche : 1) amphotéricine B (Contrôle positif), 2) Bucovia dilué dans du DMSO, 3) Eludril pur, 4) Eludril dilué à 0,3 % dans de l'eau. A droite: 5) Bucovia pur, 6) Bucovia dilué à 0,3 % dans du DMSO et de l'eau, 7) Bucovia dilué à 0,3 % dans de l'eau, 8) Dentifrice Colgate.



4.3.5. *Trichophyton rubrum*, souche sauvage

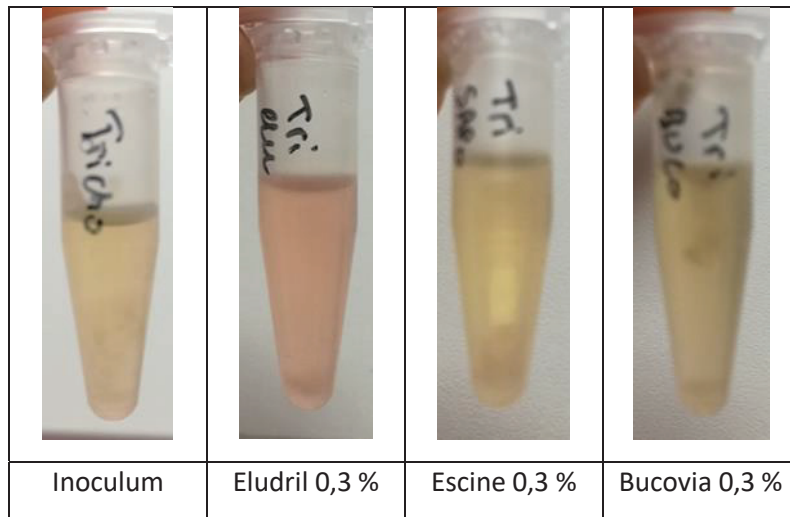
4.3.5.1. *Trichophyton rubrum* : 1^{er} test en milieu liquide

Nous avons réalisé un premier test en milieu liquide YEP avec les inhibiteurs suivants : Fluconazole 0,3 %, Eludril 0,3 %, Escine 0,3 % et Bucovia 0,3 %. Tous les inhibiteurs ont été dilué dans le milieu YEP au préalable. Les manipulations ont été faites au 7^{ème} jour de culture (J7).

Aspect macroscopique des tubes Eppendorf à J7

On peut observer un petit amas au fond des tubes contenant l'inoculum seul et l'escine 0,3 %. Un amas est également présent dans le tube Bucovia 0,3 %, à la différence qu'il flotte en surface (Figure 36).

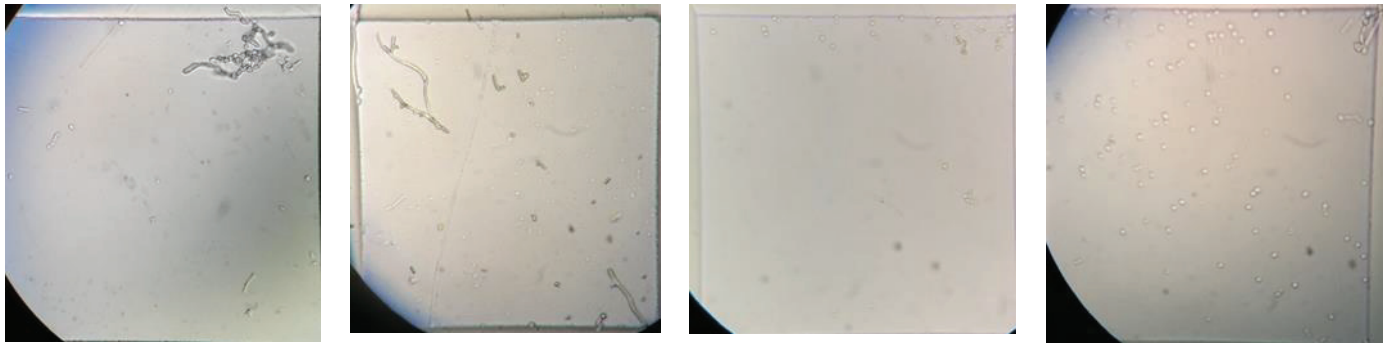
Figure 36. *Trichophyton rubrum* : aspect visual des tubes Eppendorf après 7 jours d'incubation dans du milieu YEP.



Observation de la morphologie des cellules fongiques à la cellule Kova à J7

Nous observons un agglomérat de filaments fongiques dans la culture d'inoculum seul. Quelques filaments sont visibles dans la culture qui contient du fluconazole 0,3 %. On observe peu de cellules en présence de l'escine 0,3 %, et surtout des spores en présence de Bucovia 0,3 % (Figure 37).

Figure 37. *Trichophyton rubrum* : test d'inhibition en milieu liquide après 7 jours d'incubation.



Trichophyton rubrum
Inoculum à J7
Objectif x 40

Trichophyton rubrum
Fluconazole 0,3 % à J7
Objectif x 40

Trichophyton rubrum
Escine 0,3 % à J7
Objectif x 40

Trichophyton rubrum
Bucovia 0,3 % à J7
Objectif x 40

4.3.5.2. *Trichophyton rubrum* : 2^{ème} test d'inhibition en milieu liquide

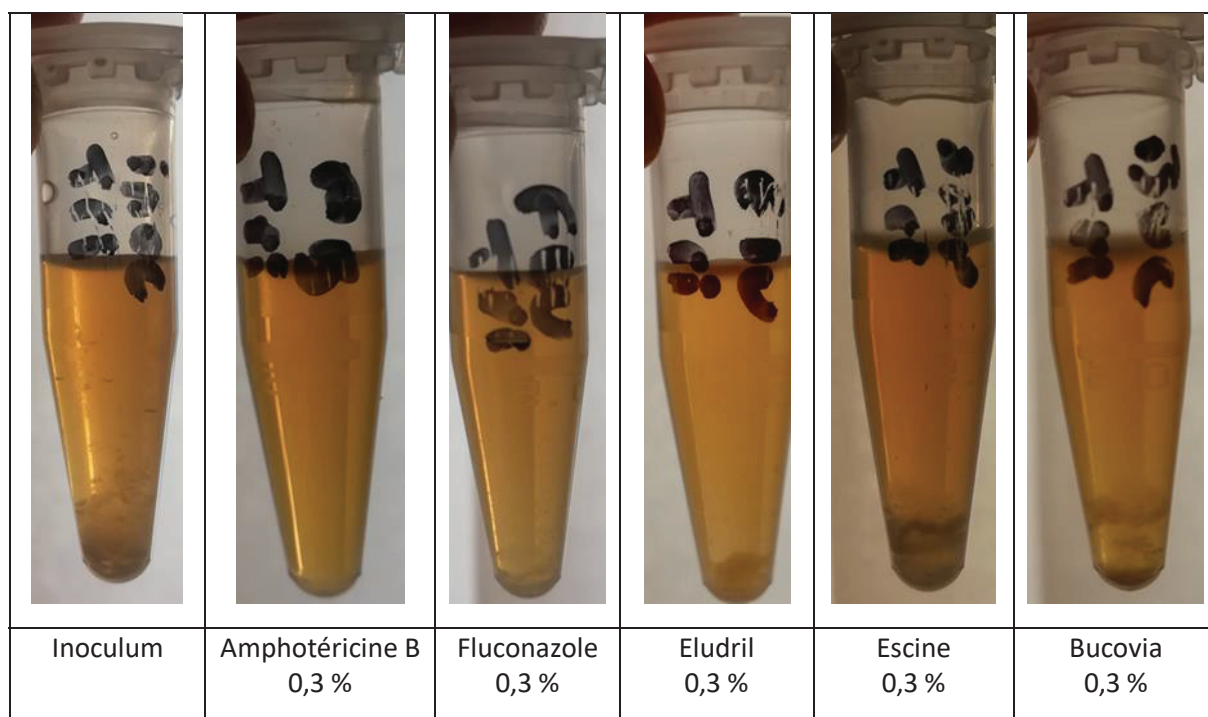
Nous avons réalisé une culture de *Trichophyton rubrum* en milieu liquide YEP une seconde fois avec les inhibiteurs suivants : amphotéricine B 0,3 %, fluconazole 0,3 %, Eludril 0,3 %, escine 0,3 %, Bucovia 0,3 %. Tous les inhibiteurs ont été dilués dans le milieu YEP.

Lors de l'observation au microscope au 9^{ème} jour de culture, nous nous sommes aperçues d'une contamination bactérienne et de levure. C'est pourquoi un comptage était impossible.

Aspect macroscopique des tubes Eppendorf à J9

Après 9 jours d'incubation, on observe un dépôt au fond des tubes contenant l'inoculum seul et l'escine 0,3 %. Un dépôt est également présent avec l'inhibiteur Bucovia 0,3 % mais il flotte, il n'est pas adhérent au fond du tube. Un dépôt moins important se trouve dans le tube avec Eludril 0,3 % (Figure 38).

Figure 38. *Trichophyton rubrum* : aspect visuel des tubes Eppendorf après 9 jours d'incubation (J9).



4.3.6. Synthèse des résultats obtenus avec les champignons filamenteux

Les tests réalisés en milieu solide et en milieu liquide avec les champignons filamenteux sont détaillés dans les tableaux 9 et 10 pages 51 et 52 précédentes.

5. DISCUSSION

5.1. Les souches testées

Les objectifs de cette étude étaient de faire le point sur différentes méthodes de culture et sur les tests d'inhibition, d'évaluer les propriétés antifongiques de plusieurs inhibiteurs, et d'observer le développement fongique à différents temps. Nous nous sommes intéressées à dix souches fongiques au total : des levures et des champignons filamenteux (Dermatophytes et moisissures). Cela nous a permis d'observer le développement fongique en fonction des espèces et d'identifier quels tests étaient adaptés en fonction du genre.

Les levures testées étaient les suivantes : quatre espèces du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) et une souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons ensuite élargi l'étude avec des champignons filamenteux : *Trichophyton rubrum* (Dermatophyte), *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* (Moisissures), et enfin *Rhizomucor sp.*

Bien que la présence de champignons filamenteux en bouche soit rare, il fut intéressant de comparer l'effet des inhibiteurs en fonction des souches, tant sur l'aspect morphologique que sur des données numériques. La manipulation des filamenteux s'est avérée plus difficile que celle des levures. En effet, la mise en culture, le prélèvement et les temps d'observations sont des facteurs à adapter en fonction de la souche.

5.2. Les inhibiteurs testés

Pour le test en milieu solide sur gélose casitone, nous avons utilisé : de l'amphotéricine B diluée à 0,3 %, de l'Eludril pur et dilué dans de l'eau à 0,3 %, du Bucovia pur, dilué dans de l'eau, du DMSO ou encore un mélange des deux à 0,3 %, et enfin du dentifrice Colgate dilué dans de l'eau.

L'amphotéricine B a été utilisée en contrôle positif, pour s'assurer de l'efficacité de la méthode. Nous avons testé l'Eludril et le dentifrice Colgate afin de comparer Bucovia avec des produits d'hygiène orale largement utilisés.

Pour s'assurer que le milieu dans lequel nous diluions Bucovia n'avait pas d'impact sur son efficacité, nous l'avons dilué dans de l'eau, du DMSO et un mélange des deux.

En revanche, aucun contrôle négatif de type sérum physiologique ou milieu YEP n'a été testé.

Pour les tests en milieu liquide YEP, nous avons utilisé les inhibiteurs suivants : amphotéricine B (contrôle positif), fluconazole, bain de bouche à la chlorhexidine Eludril, escine et Bucovia. Tous les inhibiteurs ont été au préalable dilués dans du milieu YEP à 0,3 %, avant d'être mis en culture.

Le fluconazole a été testé afin d'avoir un autre contrôle que l'amphotéricine B, car il s'agit d'un antifongique utilisé en routine et qui a un autre mode d'action que l'amphotéricine B.

Eludril a permis de mettre en évidence la différence de mode d'action entre ce bain de bouche et Bucovia. En effet, de par son action fongicide, il a une activité rapide et délétère sur les cellules. C'est la raison pour laquelle il ne peut pas être utilisé sur une longue période de temps (Pas plus de 10 jours de traitement).

Nous avons testé de l'escine afin de comparer Bucovia, qui contient des solidagosaponine, à un autre type de saponine. Leurs effets étaient souvent similaires, bien que son action ait semblé plus intense sur les cellules fongiques

Le test en milieu liquide nous a permis de constater que le Bucovia n'avait pas une action intense. Son action plus douce que les bains de bouche antiseptiques classiques peut éventuellement en faire un produit d'hygiène quotidienne sur du long terme, sans agressivité pour la flore buccale.

5.3. Résultats obtenus

5.3.1. Résultats obtenus avec les levures

Avec méthode de diffusion en disque sur gélose, l'amphotéricine B était active contre *C. albicans* et *C. glabrata*, et un peu moins contre *C. parapsilosis*. Cet inhibiteur était en revanche inactif contre *C. tropicalis* et *S. cerevisiae*.

Le bain de bouche antiseptique à la chlorhexidine Eludril, testé pur mais aussi dilué à 0.3 % dans de l'eau, était inactif avec cette méthode contre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *S. cerevisiae*.

Les saponines, escine et Bucovia, n'avaient pas d'activité visible avec cette méthode.

Les tests d'inhibition par la diffusion en disque sur gélose ne sont donc pas adaptés pour tester la sensibilité des levures aux antiseptiques, comme la chlorhexidine, et aux extraits phytochimiques contenant des saponines (Tableau 9).

Les tests en milieu liquide réalisés avec *C. glabrata* ont montré une augmentation du nombre de cellules après 4 h d'incubation suivie d'une diminution du nombre de cellules après 24 h d'incubation : avec le contrôle négatif (milieu YEP), avec le contrôle positif (Eludril) et avec l'escine et Bucovia. De T0 à T24 le nombre total de cellules avait augmenté d'un facteur 10 dans le contrôle négatif (pas d'inhibition de croissance), il avait diminué d'un facteur 10 avec Eludril (inhibition avec effet

fongicide) et il était resté stable avec l'escine et Bucovia (inhibition avec effet fongistatique) (Tableau 10).

La diminution de la charge totale de *C. glabrata* est observée également sur la culture de *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, après 24h d'incubation, on dénombre moins de cellules dans le tube contenant Bucovia que dans le tube contrôle, bien qu'il y en ait plus que dans le tube contenant le fluconazole. Cela correspond avec le résultat obtenu par Prêcheur et coll. (2020) qui ont décrit après une étude clinique en double aveugle une diminution de la biomasse de *Candida albicans* dans le cadre d'une utilisation biquotidienne de Bucovia pendant huit semaines, sans effet fongicide (Prêcheur et al., 2020).

5.3.2. Résultats obtenus avec les champignons filamenteux

Avec méthode de diffusion en disque sur gélose, seule l'amphotéricine B était faiblement active contre *A. fumigatus* mais pas contre *Penicillium sp.* ni contre *Rhizomucor*. Le bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril), l'escine et l'extrait de *S. virgaurea* (Bucovia) n'ont pas inhibé la croissance en milieu solide. *Fusarium sp.* et *T. rubrum* n'ont pas été testés en milieu solide. Les tests d'inhibition par la diffusion en disque sur gélose n'étaient donc pas adaptés pour tester la sensibilité des champignons filamenteux aux antiseptiques, comme la chlorhexidine, et aux extraits phytochimiques contenant des saponines.

Les tests en milieu liquide observés à l'œil nu ont montré que les extraits contenant des saponines, escine (pour *A. fumigatus*) et Bucovia (pour *A. fumigatus* et *Penicillium sp.*) inhibaient l'adhérence des champignons aux parois du tube Eppendorf.

Les tests en milieu liquide réalisés avec *A. fumigatus* et *Penicillium sp.* et observés au microscope ont montré qu'en présence d'amphotéricine B, de fluconazole et d'Eludril la formation de filaments était totalement inhibée. Le fluconazole provoquait des dysmorphies importantes des spores. Avec ces trois inhibiteurs, les spores étaient souvent très petites et difficiles à compter. L'escine ralentirait la formation des filaments et altérerait la morphologie leur filaments avec surtout des pseudo-filaments. Bucovia ralentirait la formation des filaments et inhiberait la coagrégation des spores, ce qui correspond aux résultats d'une étude menée sur une souche de *Candida albicans* qui a permis de démontrer l'inhibition de la formation de biofilm en présence d'extrait de *Solidago virgaurea* (Bucovia) ainsi qu'une diminution de la forme de spore vers la forme de filament (Chevalier et al., 2012). L'activité plus lente des saponines par rapport aux autres inhibiteurs serait compatible avec une utilisation quotidienne, plusieurs fois par jours.

5.4. Perspectives

Afin d'élargir nos connaissances sur l'action du produit Bucovia sur la santé bucco-dentaire, il serait intéressant d'élargir la recherche en combinant des souches fongiques avec des bactéries présentes dans la flore buccale. Comme cela a été fait précédemment lors d'une étude avec *Candida albicans* (Chevalier et al., 2018), il serait intéressant d'élargir nos connaissances sur l'action de Bucovia sur un biofilm oral complexe en présence de champignons filamenteux. De plus, il serait intéressant de tester Bucovia à d'autres concentrations sur les souches de cette étude. Enfin, l'ajout d'un antibiotique dans le milieu de culture permet d'éviter les contaminations bactériennes.

6. CONCLUSIONS

1. L'observation de dix souches fongiques différentes nous a permis d'obtenir un panel large d'observation, sur le plan de la morphologie cellulaire et de la croissance.
2. Il est plus difficile à manipuler les souches fongiques filamenteuses. En effet, les durées d'incubations sont plus longues car on essaie d'obtenir la phase stationnaire de la souche, et exposent ainsi plus au risque de contamination. De même, il arrive que la croissance ne se produise pas.
3. Le milieu solide n'était pas approprié pour un tester la sensibilité des champignons filamenteux aux antiseptiques (Chlorhexidine) et aux extraits phytochimiques contenant des saponines.
4. L'action du bain de bouche à la chlorhexidine est rapide et néfaste pour la cellule, ce qui rend l'utilisation de ce produit difficile à long terme car il risque de perturber le biofilm oral.
5. Pour mieux comprendre le mode d'action des saponines, nous avons comparé l'action de Bucovia avec escine. Nous nous sommes rendu compte que leurs actions étaient souvent similaires, bien que celle de Bucovia semblait moins agressive sur les cellules.
6. L'action de Bucovia est peu intense, ce qui pourrait être compatible avec une action biquotidienne sur du long terme, dans le cadre d'un produit d'hygiène bucco-dentaire quotidien.
7. La formation de filaments est totalement inhibée en présence d'amphotéricine B, de fluconazole et d'Eludril pour *A. fumigatus* et *Penicillium sp.*
8. En présence d'escine on constate un ralentissement de la formation filamenteuse et des altérations morphologiques
9. Bucovia ralentirait également la formation des filaments, et semble inhibe la coaggrégation des spores. Cette conclusion est intéressante, car l'effet recherché est un effet anti-biofilm. En effet, on cherche à inhiber l'adhérence du biofilm formé par les cellules fongiques lors d'une mycose orale.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anofel. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicale. Collection Abrégés. Elsevier Masson éditeur, Issy-les-Moulineaux 2016, 472 pages.

Anofel. Candidoses. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie. 2014

Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP-ACP and fluoride: a synergism to combat caries. International journal of clinical pediatric dentistry 2019;12:120-125. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1608.

Bouchara JP, Pihet M, de Gentile L, Cimon B, Chabasse D. Les levures et levures. Cahier de formation n°44. Editeur Bioforma Formation continue des biologistes, Paris 2010, 200 pages.

Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. Trends Microbiol 2018, 26, 229-242. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008.

Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson. Principes de médecine interne. Editeur Flammarion, 2002, 2629 pages.

Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25. Editeur Bioforma Formation continue des biologistes, Paris 2002, 159 pages.

Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. Les dermatophytes. Cahier de formation n°31. Editeur Bioforma Formation continue des biologistes, Paris 2004, 159 pages.

Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. Medical Mycology 2018;56:653-667.

Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog 2010, Jan 8;6(1):e1000713. doi: 10.1371/journal.ppat.1000713.

Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic Factors in Candida Biofilm-Related Infectious Diseases. J Appl Microbiol 2017. 122(2):321-330. doi: 10.1111/jam.13330

Laurençon L, Sarrazin E, Chevalier M, Prêcheur I, Herbette G, Fernandez X. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea alpestris* with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. Phytochemistry 2013;86:103-111.

Limon JJ, Skalski JH, Underhill DM. Commensal fungi in health and disease. Cell Host Microbe 2017, 22, 156-165.

Liu Y, Ren Z, Hwang G, Koo H. Therapeutic strategies targeting cariogenic biofilm microenvironment. Adv Dent Res 2018, Feb;29(1):86-92. doi: 10.1177/0022034517736497.

Lof M, Janus MM, Krom BP. Metabolic interactions between bacteria and fungi in commensal oral biofilms. *J Fungi (Basel)* 2017, 14:3(3). pii: E40. doi: 10.3390/jof3030040.

Miles P, Chang ST. Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. CRC Press, 2004, p. 1

Osei Sekyere J. Candida Auris: A Systematic Review and Meta-Analysis of Current Updates on an Emerging Multidrug-Resistant Pathogen. *Microbiologyopen* 2018. 7(4):e00578. doi: 10.1002/mbo3.578.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Candida Glabrata, Candida Parapsilosis and Candida Tropicalis: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Antifungal Resistance. *EMS microbiol revue* 2012, 36(2):288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.

Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro JM, Aigueperse J, Souidi M. Vitamine D : métabolisme, régulation et maladies associées. *M/S n° 12*, vol. 22, décembre 2006.

Wade WG. New aspects and new concepts of maintaining "microbiological" health. *J Dent* 2010, 38S1 S21-S25.

8. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des micromycètes selon leur morphologie : principaux genres susceptibles de coloniser les écosystèmes humains et quelques espèces importantes en pathologie humaine (D'après Anofel, 2016)	12
Tableau 2. Structure de l'ergostérol (Micromycètes), de phytostérols (Plantes) et du cholestérol (Animaux)	14
Tableau 3. Les antifongiques indiqués pour le traitement des candidoses orales, chez des personnes qui ne présentent pas de facteurs de risque d'immunodépression	15
Tableau 4. Classification selon leur morphologie des principaux genres et espèces de micromycètes cultivables susceptibles de coloniser l'écosystème oral (D'après Ghannoum et al., 2010; Limon et al., 2017)	17
Tableau 5. Composition du bain de bouche Eludril 0,5 mL / 0,5 g pour 100 mL, solution pour bain de bouche (Pierre Fabre, Castres, France)	28
Tableau 6. Synthèse des tests réalisés en fonction des souches testées et des inhibiteurs testés.	38 - 41
Tableau 7. <i>Candida glabrata</i> incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova (en nombre de cellules / mL) et mesure de la DO (deux mesures de DO par test d'inhibition)	46
Tableau 8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova (en nombre de cellules / mL) et mesure de la DO (deux mesures de DO par test d'inhibition)	52
Tableau 9. Tests d'inhibition de croissance en milieu solide casitone sur 8 souches fongiques : synthèse des résultats	54
Tableau 10. Tests d'inhibition de croissance en milieu liquide YEP sur 6 souches fongiques : synthèse des résultats	55
Tableau 11. <i>Aspergillus fumigatus</i> incubé pendant 24 h (J1) et 48 h (J2) dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des filaments et des spores fongiques à la cellule Kova (en nombre de cellules / μ L).	60
Tableau 12. <i>Aspergillus fumigatus</i> : tests d'inhibition en milieu liquide avec comptage des spores (S) et des filaments (F).	67
Tableau 13. <i>Aspergillus fumigatus</i> : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs (spores).	68
Tableau 14. <i>Aspergillus fumigatus</i> : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs (filaments).	69
Tableau 15. <i>Aspergillus fumigatus</i> : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs (spores et filaments).	70
Tableau 16. <i>Fusarium sp.</i> : culture en milieu liquide en présence d'inhibiteurs.	74
Tableau 17. <i>Fusarium sp.</i> : tests d'inhibition en milieu liquide avec comptage des spores (S) et des filaments (F).	76

9. LISTE DES FIGURES

Figure 1. Exemples de candidoses orales (Clichés du Pr I. Prêcheur).	19
Figure 2. Saponines des escines Ia, Ib, IIa, IIb et IIIa d' <i>Aesculus hippocastanum</i> (L.) (D'après Wikipédia, consulté le 20.05.2020)	30
Figure 3. Les six saponines de <i>Solidago virgaurea ssp. alpestris</i> (L.) (D'après Laurençon et al., 2013)	31
Figure 4. Cellule Kova	36
Figure 5. Organisation d'une cellule Kova et méthode de comptage.	36
Figure 6. <i>Candida albicans</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	42
Figure 7. <i>Candida glabrata</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	43
Figure 8. <i>Candida glabrata</i> : tests d'inhibition en milieu liquide après 24 h d'incubation.	45
Figure 9. <i>Candida glabrata</i> incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova	46
Figure 10. <i>Candida parapsilosis</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	48
Figure 11. <i>Candida tropicalis</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	49
Figure 12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	50
Figure 13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : tests d'inhibition en milieu liquide après 24 h d'incubation.	51
Figure 14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> incubé pendant 24 h dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova	52
Figure 15. <i>Aspergillus fumigatus</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	56
Figure 16. <i>Aspergillus fumigatus</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf après 24 h (J1) d'incubation dans du milieu YEP.	57
Figure 17. <i>Aspergillus fumigatus</i> 1 ^{er} test à J1 : tests d'inhibition en milieu liquide après 24 h d'incubation	58
Figure 18. <i>Aspergillus fumigatus</i> 1 ^{er} test à J2 : tests d'inhibition en milieu liquide après 48 h d'incubation	59
Figure 19. <i>Aspergillus fumigatus</i> incubé pendant 24 h (J1) et 48 h (J2) dans du milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs : comptage des cellules fongiques à la cellule Kova.	61
Figure 20. <i>Aspergillus fumigatus</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf après 48 h (J2) d'incubation dans du milieu YEP.	62
Figure 21. <i>Aspergillus fumigatus</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf après 5 jours (J5) d'incubation dans du milieu YEP.	63
Figure 22. <i>Aspergillus fumigatus</i> 2 ^{ème} test à J2 : tests d'inhibition en milieu liquide après 48 h d'incubation	64
Figure 23. <i>Aspergillus fumigatus</i> 2 ^{ème} test à J5 : tests d'inhibition en milieu liquide après 5 jours d'incubation	66
Figure 24. <i>Fusarium sp.</i> à J2 : test d'inhibition en milieu liquide après deux jours d'incubation.	72
Figure 25. <i>Fusarium sp.</i> à J7 : test d'inhibition en milieu liquide après 7 jours d'incubation.	73
Figure 26. <i>Fusarium sp.</i> : test d'inhibition en milieu liquide YEP en présence d'inhibiteurs après 3 jours d'incubation.	75
Figure 27. <i>Fusarium sp.</i> : évolution du nombre de spores à J0, J3 et J9 en présence d'inhibiteurs en milieu liquide YEP	77
Figure 28. <i>Fusarium sp.</i> : évolution du nombre de filaments à J0, J3 et J9 en présence d'inhibiteurs, en milieu liquide YEP	77
Figure 29. <i>Penicillium sp.</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	78
Figure 30. <i>Penicillium sp.</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf.	79

Figure 31. <i>Penicillium sp</i> à J2 : tests d'inhibition en milieu liquide après 2 jours d'incubation	81
Figure 32. <i>Penicillium sp</i> à J7 : tests d'inhibition en milieu liquide après 7 jours d'incubation.	82
Figure 33. <i>Penicillium sp.</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf après 72 h (J3) d'incubation dans du milieu YEP.	82
Figure 34. <i>Penicillium sp.</i> : test d'inhibition en milieu liquide après 72h d'incubation	83
Figure 35. <i>Rhizomucor sp.</i> : test d'inhibition sur milieu casitone.	84
Figure 36. <i>Trichophyton rubrum</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf après 7 jours d'incubation dans du milieu YEP	85
Figure 37. <i>Trichophyton rubrum</i> : test d'inhibition en milieu liquide après 7 jours d'incubation	86
Figure 38. <i>Trichophyton rubrum</i> : aspect visuel des tubes Eppendorf après 9 jours d'incubation (J9)	87

Jade VARLEY

LE MYCOBIOME ORAL : METHODES DE CULTURE DES PRINCIPALES ESPECES FONGIQUES

Thèse : Chirurgie Dentaire, Nice, 2020, n°42-57-20-27

Directeur de thèse : Madame le professeur Isabelle PRECHEUR-SABLAYROLLES

Mots-clés : inhibiteurs, filaments fongiques, fongicide, fongistatique

Résumé :

Le rôle des champignons microscopiques dans le mycobiome oral est centré sur *Candida albicans*. Les autres champignons, minoritaires et difficiles à cultiver, sont très peu étudiés. Nous avons étudié en milieu solide et liquide dix souches représentatives de l'écosystème oral : *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, et des espèces des genres *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Trichophyton*. Ce travail avait pour objectif d'observer l'activité de deux antifongiques (Amphotéricine B, fluconazole), un bain de bouche à la chlorhexidine (Eludril™), un dentifrice au triclosan (Colgate Total™), et deux extraits végétaux contenant des saponines (Esculine et Bucovia™). En milieu liquide, nous avons pu différencier des actions fongicides, et d'autres fongistatiques. L'extrait contenant les solidagosaponines (Bucovia) semble ralentir la coaggrégation des spores ainsi que l'adhérence des cellules fongiques au tube. Ces propriétés, bien qu'elles nécessitent d'autres études pour les confirmer, sont recherchées pour un produit d'hygiène buccale quotidienne. En effet, malgré le panel large dont le chirurgien-dentiste dispose, les solutions antifongiques prescrites ne peuvent l'être que sur une courte période à cause de leur agressivité sur la flore buccale, et sont à l'origine d'effets secondaires (xérostomie, altération du gout, etc.).