



HAL
open science

Validation d'un antiseptique biodégradable : étude in vitro d'un extrait de *Solidago virgaurea* sur *saccharomyces cerevisiae*

Lamjed Kaboubi

► To cite this version:

Lamjed Kaboubi. Validation d'un antiseptique biodégradable : étude in vitro d'un extrait de *Solidago virgaurea* sur *saccharomyces cerevisiae*. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03414189

HAL Id: dumas-03414189

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03414189>

Submitted on 4 Nov 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.

UNIVERSITÉ COTE D'AZUR
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE DE NICE
5 avenue du 22^{ème} BCA, 06357 Nice Cedex 4

VALIDATION D'UN ANTISEPTIQUE BIODEGRADABLE :
ETUDE *IN VITRO* D'UN EXTRAIT DE *SOLIDAGO VIRGAUREA*
SUR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Année 2021

Thèse n°42-57-21-18

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nice
Le 14/04/2021 par

Lamjed KABOUBI

Né le 14/11/1991 à Cannes (06)
Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE (Diplôme d'État)

Examineurs :

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

Laurence LUPI
Isabelle PRECHEUR
Yves ALLARD
Romain CEINOS
Anne LANDREAU

Présidente du jury
Directeur de thèse
Assesseur
Assesseur
Invitée

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
Professeur des Universités Associée : Mme CHARAVET Carole
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 DRIDI Sophie Myriam
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 RAYBAUD Hélène
Maître de Conférences des Universités : Mme VINCENT-BUGNAS Séverine
Maître de Conférences des Universités : Mme VOHA Christine
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme NAMAN Eve
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 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 BECQUART Mathilde
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme DEMARTY Laure
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme AZAN Cindy
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.

A Madame le Professeur Laurence LUPI

Docteur en chirurgie dentaire et orthopédie dentofaciale
Professeur des Universités - Praticien hospitalier
Directrice de l'UFR Odontologie Chirurgie Dentaire de Nice
Responsable de la sous-section Prévention, Epidémiologique, Economie de la santé, Odontologie légale

Vous avez accepté avec enthousiasme de présider ce jury de thèse. Un grand merci pour cet enthousiasme permanent ainsi que votre joie de vivre qui m'ont accompagné durant mes six années d'études. Je vous remercie de m'avoir accompagné jusqu'à ces derniers moments d'étudiant. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mes sentiments les plus respectueux.

A Madame le Professeur Isabelle PRECHEUR-SABLAYROLLES

Docteur en chirurgie dentaire
Professeur des Universités - Praticien hospitalier

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Votre implication, votre patience et votre rigueur m'ont touché tout au long de ces années. Je vous remercie énormément pour votre travail et l'aide que vous m'avez apportée depuis les phases de recherche jusqu'à la rédaction de mon manuscrit et sa finalisation, ainsi que votre disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements que vous m'avez prodigués. Veuillez trouver ici l'expression de ma haute estime et de mon profond respect pour votre enseignement, et la qualité de votre encadrement.

A Monsieur le Docteur Yves ALLARD

Docteur en chirurgie dentaire
Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ma thèse. Votre bonne humeur ainsi que votre joie de vivre ont permis de rendre ces années d'études très agréables. Ce fut un réel plaisir de partager mes années d'études avec vous, vos connaissances et votre sens pratique et clinique m'ont beaucoup apporté. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Romain CEINOS

Docteur en chirurgie dentaire
Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier

Merci d'avoir accepté aussi spontanément de faire partie de mon jury de thèse. Tout au long de mes études, vous avez toujours su partager votre savoir avec une patience, une gentillesse et un enthousiasme remarquables. Vos précieux conseils, votre disponibilité, votre compétence, votre sens du partage ont été un exemple et continueront à l'être.
Veuillez trouver dans cette thèse, toute ma considération.

A Madame le Docteur Anne Landreau

Docteur en pharmacie
Maitre de Conférences – Praticien hospitalier
HDR de l'Université d'Angers

Vous m'avez fait le grand plaisir de siéger dans ce jury de thèse et je vous en témoigne ma plus grande gratitude. Je vous remercie de m'avoir fait partager votre passion pour le monde de la recherche et la microbiologie. Ce fut un réel plaisir que de travailler à vos côtés.
Encore merci de m'avoir accompagné pendant mes travaux de recherches, vos précieux conseils, votre disponibilité, votre compétence ont été un exemple et continueront à l'être.
Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Lilia HASSEINE

Docteur en pharmacie
Praticien hospitalier
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nice

Je tiens à vous adresser mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce projet et vous remercie pour la très grande disponibilité et l'attention que vous m'avez toujours accordées, pour votre perfectionnisme et votre souci de transmettre vos connaissances.
Veuillez trouver dans ce travail l'occasion de vous témoigner mon profond respect.

Au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice

Je remercie chaleureusement l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice, avec qui j'ai eu l'occasion d'effectuer mes travaux de recherches dans une ambiance très studieuse et conviviale. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Sommaire

1. INTRODUCTION	10
2. REVUE DE LA LITTERATURE	12
2.1. Les principes actifs antiseptiques utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire	12
2.1.1. Rappel sur le biofilm oral.....	12
2.1.2. Les normes des antiseptiques pour les cosmétiques d'hygiène bucco-dentaire.....	17
2.1.3. Exemples de principes actifs de cosmétiques bucco-dentaires commercialisés en France dans les pharmacies d'officine.....	18
2.2. Biodégradabilité et antiseptiques utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire.....	23
2.2.1. La notion de biodégradabilité	23
2.2.2. Méthode pour évaluer la biodégradabilité selon l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)	23
2.2.3. Les antiseptiques biodégradables utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire ..	24
2.2.4. Les antiseptiques de synthèse peu biodégradables.....	30
2.3. Impact des antiseptiques de synthèse sur l'environnement	34
2.3.1. La pollution de l'eau	34
2.3.2. Rappel sur les perturbateurs endocriniens	34
2.3.3. Les perturbateurs endocriniens faibles.....	35
2.3.4. Impact des antiseptiques sur les écosystèmes microbiens.....	35
2.4. Propriétés de l'antiseptique biodégradable testé, extrait de <i>Solidago virgaurea</i>	36
2.4.1. Cahier des charges d'un nouvel actif "vert" pour les produits d'hygiène bucco-dentaire	36
2.4.2. Caractéristiques phytochimiques de l'extrait de <i>Solidago virgaurea</i>	36
2.4.3. Propriétés antimicrobiennes de l'extrait de <i>Solidago virgaurea</i>	38
2.5. Objectif de ce travail	39
3. MATERIEL ET METHODES	40
3.1. Souches testées.....	40
3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3.1.2. <i>Streptococcus salivarius</i>	41
3.2. Produit testé (extrait de <i>Solidago virgaurea</i>) et contrôles	42
3.2.1. Extrait de <i>Solidago virgaurea</i>	42
3.2.2. Contrôles	42
3.3. Cultures microbiennes.....	44
3.3.1. Cultures sur milieux solides.....	44
3.3.2. Cultures en milieu liquide.....	46
3.4. Tests réalisés	47
3.4.1. Impact de Bucovia sur le nombre de cellules de <i>S. cerevisiae</i>	47

3.4.2.	Impact de Bucovia sur la taille des cellules de <i>S. cerevisiae</i>	48
3.4.3.	Impact de Bucovia sur le biofilm formé par <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. salivarius</i>	48
3.4.4.	Rétro-cultures pour vérifier la viabilité de <i>S. cerevisiae</i> et/ou de <i>S. salivarius</i>	48
4.	RESULTATS.....	49
4.1.	Impact de Bucovia sur la quantité de cellules de <i>S. cerevisiae</i>	49
4.2.	Impact de Bucovia sur la taille des cellules de <i>S. cerevisiae</i>	50
4.3.	Impact de Bucovia sur le biofilm formé par <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. salivarius</i>	51
4.4.	Rétro-cultures pour vérifier la viabilité de <i>S. cerevisiae</i> et de <i>S. salivarius</i>	52
5.	DISCUSSION	57
5.1.	Choix des souches microbiennes testées	57
5.2.	Choix des inhibiteurs testés	58
5.3.	Méthodes utilisées	59
5.4.	Impact de Bucovia sur <i>S. cerevisiae</i>	59
5.4.1.	Impact de Bucovia sur <i>S. cerevisiae</i> en mono-culture.....	59
5.4.2.	Impact de Bucovia sur <i>S. cerevisiae</i> en co-culture avec <i>S. salivarius</i>	60
5.4.3.	Impact des autres inhibiteurs testés sur <i>S. cerevisiae</i> en mono- et en co-culture	60
5.5.	Perspectives.....	61
6.	CONCLUSIONS	62
7.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63
8.	LISTE DES TABLEAUX.....	68
9.	LISTE DES FIGURES.....	69

1. INTRODUCTION

Les produits d'hygiène bucco-dentaire, dentifrices et solutions de rinçage de bouche, sont des cosmétiques qui contiennent des principes actifs antimicrobiens pour aider à lutter contre la prolifération du biofilm oral. Ce biofilm microbien recouvre toutes les surfaces orales. Pour les muqueuses orales, les cellules superficielles recouvertes par le biofilm microbien sont éliminées grâce au renouvellement des cellules épithéliales. Dans une bouche saine, l'épaisseur du biofilm qui recouvre les muqueuses reste donc limitée et invisible à l'œil nu. Sur les dents et sur les biomatériaux des restaurations, des prothèses dentaires et des implants, le biofilm microbien s'appelle la plaque dentaire. Le biofilm oral prolifère sur ces surfaces et devient visible à l'œil nu si l'hygiène bucco-dentaire est insuffisante.

Un biofilm oral endogène équilibré est indispensable à la santé bucco-dentaire et s'oppose à la colonisation de la bouche par des germes pathogènes. L'équilibre doit être à la fois qualitatif, avec une répartition optimale des espèces et de leurs interactions métaboliques, et quantitatif pour éviter une prolifération incontrôlée du biofilm. L'hôte intervient dans cet équilibre, dont les paramètres importants sont la salive, une alimentation saine et une bonne hygiène bucco-dentaire. C'est pourquoi il ne faut éradiquer les bactéries et les champignons endogènes tels que *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*, ni déséquilibrer le biofilm oral compatible avec la santé bucco-dentaire en utilisant des produits antiseptiques pour l'hygiène bucco-dentaire quotidienne. Tout déséquilibre risque d'entraîner des infections bucco-dentaires, notamment des gingivites, des parodontites, des caries, des stomatites prothétiques et des candidoses orales. Le tabac, l'alcool, ainsi que de nombreux médicaments et des substances addictives illicites déséquilibrent le biofilm oral.

L'élimination de la plaque dentaire repose sur des moyens mécaniques avec la brosse à dents, le fil de soie et les brossettes inter-dentaires si besoin. En complément, les dentifrices et les solutions de rinçage de bouche peuvent contenir du fluor, des agents nettoyants, des arômes, des colorants, divers excipients selon la formulation galénique et éventuellement des antiseptiques. Les antiseptiques sont très actifs *in vitro* contre les bactéries et les champignons cultivables du biofilm oral, mais *in vivo* ils peuvent être irritants, colorer les dents et les muqueuses, altérer le goût ou

déséquilibrer le biofilm oral endogène. De plus, à l'exception des huiles essentielles qui sont des produits d'origine végétale, ces produits antiseptiques ne sont pas biodégradables lorsqu'ils sont rejetés dans les eaux usées. Ces antiseptiques sont très largement utilisés dans les cosmétiques, dans les industries pharmaceutique et alimentaire comme conservateurs et dans les produits d'hygiène domestique et industrielle. Au niveau mondial, des millions de tonnes d'antiseptiques non biodégradables sont rejetés chaque année dans l'environnement. Ils polluent les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de boisson. Ils déséquilibrent les écosystèmes microbiens dans les eaux de surface et dans les bassins des stations d'épuration. Ils sont ensuite consommés dans les eaux de boisson et sur les cultures maraîchères, *via* les eaux d'arrosage et les boues d'épandage. Certains antiseptiques sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens faibles, toxiques pour l'Homme et les animaux.

L'approche environnementale dans les produits d'hygiène bucco-dentaire est un concept relativement nouveau. Partant de ce constat, des chercheurs du laboratoire Micoralis EA 7354, à la faculté de chirurgie-dentaire de Nice, ont mis au point un antiseptique "vert" pour les produits d'hygiène bucco-dentaire. Le produit final est un extrait d'une plante *Solidago virgaurea* (L.) (*Asteraceae*), actuellement commercialisé sous le nom de Bucovia™, destiné à entrer dans la composition de dentifrices et de bains de bouche.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet global de faciliter la R&D de nouveaux actifs "verts" pour les produits hygiène bucco-dentaire puis en dermatologie. Son objectif était de tester Bucovia sur une souche fongique, *Saccharomyces cerevisiae*, qui est une levure pouvant coloniser la bouche et le tube digestif. Bucovia n'avait encore jamais été testé sur *S. cerevisiae* en co-culture avec une souche bactérienne : nous avons testé un modèle de biofilm mixte bactérien-fongique avec *S. cerevisiae* et *Streptococcus salivarius*, une bactérie représentative du biofilm oral.

Cette étude pilote a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice sous la co-direction du Dr Anne Landreau et Dr Lilia Hasseine, le laboratoire étant sous la direction Pr Pierre Marty et actuellement sous celle du Pr Christelle Pomares.

2. REVUE DE LA LITTERATURE

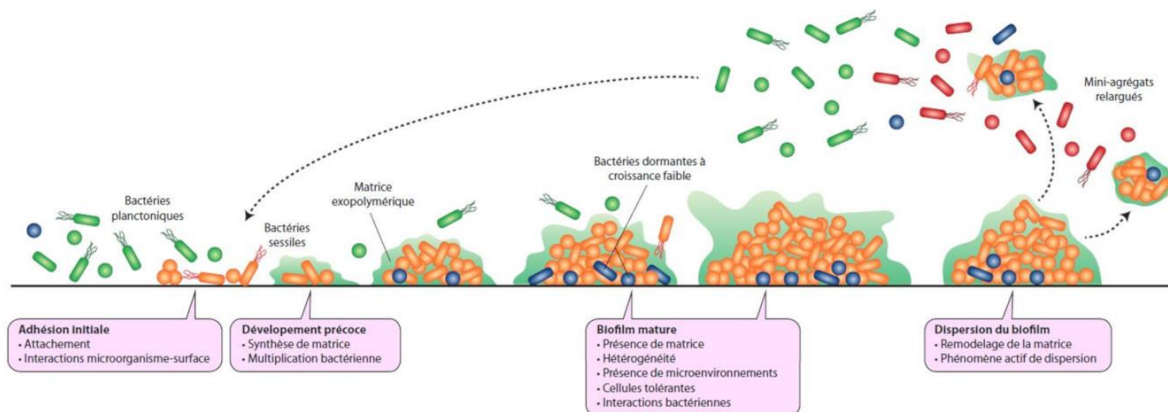
2.1. Les principes actifs antiseptiques utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire

2.1.1. Rappel sur le biofilm oral

Un biofilm est un consortium structuré de micro-organismes, de différents genres et espèces, adhérant à une surface solide submergée ou en relation avec un environnement aqueux [Kuang et coll., 2018; Arweiler et Netuschil, 2019]. Les études récentes de métagénomique montrent que plus de 800 espèces bactériennes et plus de 100 espèces fongiques endogènes peuvent contribuer à la formation du biofilm oral. La plupart d'entre elles ne sont pas cultivables *in vitro*, sans oublier le rôle des espèces fongiques, c'est-à-dire des champignons microscopiques, qui a été sous-estimé dans l'écosystème oral. Le biofilm oral peut aussi contenir des "*ultra-small bacteria*", c'est-à-dire de très petites bactéries qui colonisent des bactéries plus grosses, des *Archaea*, des parasites, des virus et des phages [Marsh et Zaura, 2017].

Ce nouveau concept est apparu à la fin des années 1970, mais son implication médicale n'a été prouvée que depuis une dizaine d'années. Les différents microorganismes se développent dans une matrice de biopolymères (principalement des polysaccharides). Le biofilm présente une structure assez complexe ainsi qu'une organisation et un développement ordonné. Il interagit en permanence avec l'environnement, en fonction des conditions physico-chimiques externes et de l'activité métabolique microbienne [Jolivet-Gougeon et Bonnaure-Mallet, 2014 ; Liu et coll., 2018] (Figure 1).

Figure 1. Formation d'un biofilm. La formation de biofilm s'effectue en plusieurs étapes : adhésion initiale, phase de développement précoce puis phase de maturation aboutissant à une phase dite de dispersion, avec détachement d'un certain nombre de bactéries du biofilm sous forme isolée ou de micro-agrégats, susceptibles de coloniser d'autres surfaces [D'après Aumeran et coll., 2020]



Dans la cavité buccale, chaque écosystème est recouvert d'un biofilm qui lui est spécifique. La notion de biofilm est un concept, dont l'épaisseur, la composition et l'activité métabolique varient en fonction du temps et des conditions environnementales [Bowen et coll., 2018]. La concurrence et la coopération entre les colonisateurs précoces et tardifs à la surface de la dent sont détaillées dans la Figure 2. Les principales caractéristiques des biofilms oraux sont détaillées dans le Tableau 1.

Figure 2. Bactéries du biofilm oral. Concurrence et coopération entre les colonisateurs précoces et tardifs à la surface de la dent : rôle des adhésines et des récepteurs dans la formation de la plaque dentaire [D'après Kolenbrander et coll., 2002]

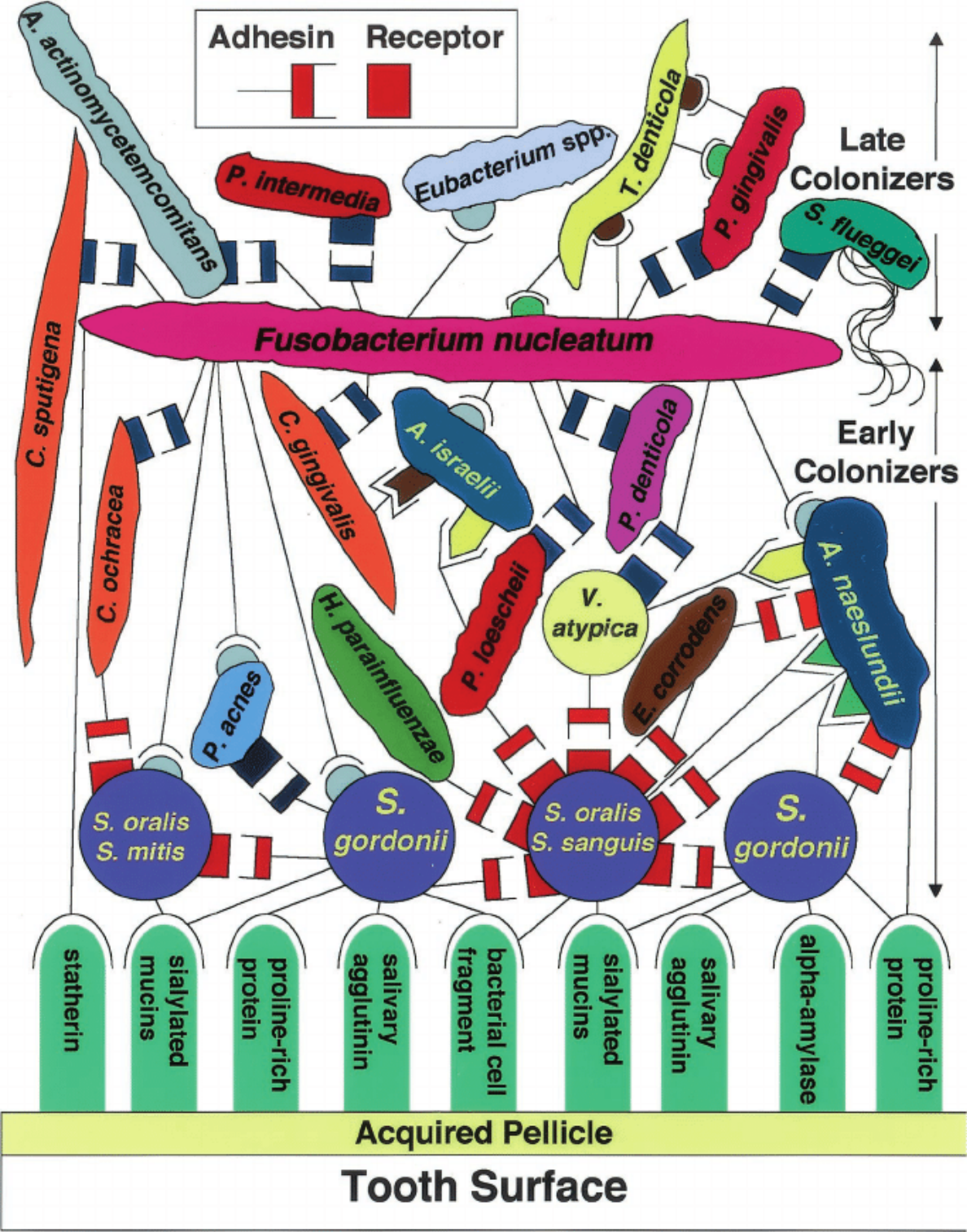


Tableau 1. Principales caractéristiques des biofilms oraux, et exemples de bactéries cultivables isolées *in vivo* [D'après Chevalier et coll., 2018]

Biofilm oral compatible avec la santé bucco-dentaire

Les streptocoques oraux sont des colonisateurs précoces des dents. Leurs principaux nutriments proviennent de la salive et des sucres alimentaires. Ces bactéries adhèrent aux surfaces *via* des attachements spécifiques. Elles se fixent aux dérivés protéiques et à diverses glycoprotéines de la pellicule exogène acquise. Par la suite d'autres espèces buccales vont venir s'y co-agréger et former une communauté microbienne buccale.

Espèces-type :

Parvimonas micra, *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus spp.* (*S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*), *Veillonella spp.* (*V. atypica*, *V. dispar*, *V. parvula*).

Biofilm des caries dentaires

Streptococcus, *Actinomyces* et *Lactobacillus spp.* sont des espèces cariogènes. *S. mutans* possède les facteurs de virulence les plus actifs :

- 1) Système phospho-enol-pyruvate : utilisation très rapide des traces de sucre dans l'environnement.
- 2) Système glycolytique : production d'acides.
- 3) Synthèse de polysaccharides intracellulaires et extracellulaires (glucanes), qui contribuent à la l'adhérence aux surfaces dures.

Le biofilm mature contient des bactéries anaérobies strictes. En l'absence d'oxygène dans le biofilm dentaire, les conditions d'anaérobiose prédominent. La glycolyse ne pourra pas se faire par la voie oxydative mais par fermentation qui conduira à la formation d'acides organiques de type propionique, lactique, pyruvique, lactique, acétique, succinique et formique. Ces acides entraîneront la dissolution progressive des cristaux d'hydroxyapatite des tissus dentaires minéralisés. Une fois les tissus dentaires déminéralisés, les bactéries attaquent la pulpe et provoquent la nécrose pulpaire.

Espèces-type :

Toutes les espèces du biofilm "sain", notamment *S. mutans*, et *Actinomyces spp.* (*A. oris*, *A. odontolyticus*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*), *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus spp.* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*)

Tableau 1 (Suite). Principales caractéristiques des biofilms oraux, et exemples de bactéries cultivables isolées *in vivo* [D'après Chevalier et coll., 2018]

Biofilm associé aux parodontites

Les streptocoques oraux et *Veillonella spp.* font partie des colonisateurs précoces de la gencive. Leur principal nutriment est le fluide gingival. *Fusobacterium nucleatum* est une bactérie spécialisée dans la co-agrégation inter-microbienne. Le biofilm mature est caractérisé par des échanges métaboliques complexes et un changement d'espèces dominantes : cocci vs bacilles, aérotolérantes vs anaérobies strictes, immobiles vs mobiles et gram-positives vs gram-négatives. Les espèces importantes sont *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema* et *Aggregatibacter spp.* Les bactéries du parodonte déclenchent une réaction inflammatoire chez l'hôte. La matrice du biofilm oral contient de l'ADN extracellulaire libéré après lyse cellulaire. Cet ADN contribue à la stabilisation mécanique du biofilm, c'est une source de nutriments et d'énergie pour les autres bactéries ainsi que le vecteur potentiel de nouvelles informations génétiques.

Espèces-type :

Toutes les espèces associées aux caries dentaires et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp.* (*P. intermedia*, *P. nigrescens*), *Tannerella spp.* (*T. denticola*, *T. forsythia*).

Biofilm à *Candida albicans*

C. albicans peut passer de la forme de levure ellipsoïdale à la forme hyphale (constituant essentiel du sporophore et du mycélium) par dimorphisme. Les hyphes ont plus de résistance contre la phagocytose, plus d'adhérence aux surfaces de l'hôte, un rôle dans la formation en trois dimensions du biofilm (surtout avec *F. nucleatum*) et la capacité d'envahir l'épithélium entraînant des lésions tissulaires. L'adhérence aux muqueuses se produit *via* l'hydrophobicité de la surface cellulaire et les glycoprotéines (ALS: *agglutinin-like sequence*; HWP1: *hyphal wall protein*).

C. albicans possède également diverses enzymes hydrolytiques telles que les SAP (*secreted aspartyl proteinase*) ainsi que des phospholipases qui contribuent à la dégradation des glycoprotéines salivaires et à l'invasion des muqueuses.

Espèces-type :

Bactéries orales et *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*).

Tableau 1 (Fin). Principales caractéristiques des biofilms oraux, et exemples de bactéries cultivables isolées *in vivo* [D'après Chevalier et coll., 2018]

Biofilm oral critique

C'est le dernier stade la pullulation microbienne hors contrôle. Ce biofilm contient toutes les espèces des biofilms oraux ainsi que des bactéries pathogènes respiratoires et digestives.

Espèces-type :

Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa...

2.1.2. Les normes des antiseptiques pour les cosmétiques d'hygiène bucco-dentaire

D'après l'édition en ligne du dictionnaire Larousse, le nom cosmétique "*se dit de toute préparation non médicamenteuse destinée aux soins du corps, à la toilette, à la beauté*" (<https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/>). Les produits d'hygiène bucco-dentaire, dentifrices et solutions antiplaque, sont des cosmétiques. Certains principes actifs antiseptiques sont autorisés dans les cosmétiques, mais à des concentrations inférieures aux concentrations requises pour les produits antiseptiques de pharmacie et de parapharmacie. D'autre part, la norme française FN EN ISO 11930 de février 2019 détaille les modalités d'évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique, par des agents conservateurs antiseptiques. Les concentrations maximales autorisées, comme principe actif ou comme conservateur, sont les mêmes.

2.1.3. Exemples de principes actifs de cosmétiques bucco-dentaires commercialisés en France dans les pharmacies d'officine

Cette recherche est centrée sur les principes actifs qui peuvent être utilisés dans des produits cosmétiques d'hygiène bucco-dentaire, les dentifrices et les solutions antiplaque disponibles en parapharmacie. Les produits ayant le statut de dispositif médical ou de médicament, mais pas de cosmétique, sont exclus de cette recherche. Par exemple, la povidone iodée en bain de bouche (Bétadine [™]) n'est pas autorisée dans les cosmétiques.

Le Tableau 2 détaille la liste des principes actifs antiseptiques autorisés dans des cosmétiques (dentifrices et solutions antiplaque) actuellement commercialisés en France dans les pharmacies d'officine. Les antiseptiques de synthèse sont des bisbiguanides (Chlorhexidine, hexétidine), des phénols (Triclosan) et des ammoniums quaternaires (Chlorure de cétyle pyridinium). Ce tableau ne tient pas compte des antiseptiques utilisés comme excipients conservateurs antimicrobiens, qui dans ces produits n'ont pas pour objectif d'agir contre le biofilm oral.

Tableau 2. Principes actifs antiseptiques des cosmétiques destinés à l'hygiène bucco-dentaire (dentifrices), commercialisés en France dans les pharmacies d'officine (Février 2021).



Principes actifs antiseptiques	Exemples de produits d'hygiène bucco-dentaire disponibles en pharmacie d'officine
<p>Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée H₂O₂</p>	<p>Colgate optic white™</p>  <p><u>Composition</u> : Propylene Glycol, Calcium Pyrophosphate, Polyvinylpyrrolidone (Pvp), Polyéthylène glycol (Peg)/Ppg-116/66 Copolymer, Peroxyde d'hydrogène, Flavor, Sodium Lauryl Sulfate, Tetrasodium Pyrophosphate, Sodium Saccharin, Disodium Pyrophosphate, Silica, Sucralose, Sodium Monofluorophosphate.</p> <p><u>Principes actifs antiseptiques (Concentration de principe actif par dose unitaire)</u> :</p> <p>Peroxyde d'hydrogène : 3%</p> <p>Monofluorophosphate de sodium¹ : 1mg/g</p> <p><u>Commercialisé par</u> :</p> <p>Colgate-Palmolive 92270 Bois-Colombes</p>
<p>Bicarbonate de soude NaHCO₃</p>	<p>Parodontax™</p>  <p><u>Composition</u> : Sodium Bicarbonate, Aqua, Glycerin, Alcohol, Cocamidopropyl Betaine, Mentha Arvensis Oil, Mentha Piperita Oil, Xanthan Gum, Echinacea Purpurea Flower/Leaf/Steam Juice, Krameria Triandra Extract, Sodium Fluoride, Chamomilla Recutita Extract, Salvia Officinalis Oil, Commiphora Myrrha Extract, Limonene, Sodium Saccharin, Linalool, CI77491</p> <p><u>Principes actifs antiseptiques</u> : bicarbonate de soude, alcool, fluorure de sodium¹, extrait de <i>Chamomilla recutita</i>², <i>Salvia officinalis</i> Oil, extrait de <i>Commiphora myrrha</i>²</p> <p><u>Commercialisé par</u> :</p> <p>GlaxoSmithKline Santé Grand Public 23 rue François Jacob 92500 Rueil-Malmaison</p>

Tableau 2 (Suite). Principes actifs antiseptiques des cosmétiques destinés à l'hygiène bucco-dentaire, commercialisés en France dans les pharmacies d'officine (Février 2021)



<p>Huiles essentielles</p>	<p>Sanogyl™ soin essentiel gencive</p>  <p><u>Composition</u> : Sorbitol, Aqua, Hydrated Silica, PEG-32, Sodium Lauryl Sulfate, Aroma, Mentha Piperita Oil, Mentha Arvensis Leaf Oil, Citrus Limon Peel Oil, Cellulose Gum, Zinc Citrate, Sodium Fluoride, Triclosan, Glycerin, Helianthus Annuus Seed Oil, Gelatin, Acacia Senegal Gum, Keratin, Sodium Saccharin, Bisabolol, Citric Acid, BHA, Potassium Sorbate, Potassium Citrate, Limonene, CI 77891</p> <p><u>Principes actifs antiseptiques</u> : huiles essentielles de sauge et d'eucalyptus, triclosan, fluorure de sodium¹</p> <p><u>Commercialisé par</u> : Laboratoires Sanogyl Produits d'hygiène bucco-dentaire 11 avenue Dubonnet Le Doublon 92407 Courbevoie cedex</p>
<p>Chlorhexidine</p>	<p>Elgydium™</p>  <p><u>Composition</u> : Chlorhexidine, Carbonate de calcium Sodium, Laurylsulfate pur, Glycérol, Silice colloïdale, Silice précipitée hydratée amorphe, Carraghénate, Carboxyméthylcellulose sodique, Titane oxyde, Sodium saccharinate, Arôme artificiel, Eau potable, Parahydroxybenzoate de méthyle, Parahydroxybenzoate de propyle</p> <p><u>Principes actifs antiseptiques</u> : chlorhexidine, Parahydroxybenzoate de méthyle³, Parahydroxybenzoate de propyle³</p> <p><u>Concentration principe actif par dose unitaire (100g)</u> : Chlorhexidine : 0,004g</p> <p><u>Commercialisé par</u> : Pierre Fabre oral care 45 place Abel Gance 92100 Boulogne Billancourt</p>

Tableau 2 (Suite). Principes actifs antiseptiques des cosmétiques destinés à l'hygiène bucco-dentaire, commercialisés en France dans les pharmacies d'officine (Février 2021)




<p>Hexetidine</p>	<p>Hextril™</p>  <p><u>Composition:</u> Hexétidine, Alcool cétylique, Cachoumint arôme, Carmellose, Eau purifiée, Glycérol, Macrogol 4000, Menthe essence, P-hydroxybenzoate de méthyle sodique, Saccharine sodique, Silice, Sodium hydroxyde, Sodium laurylsulfoacétate, Sorbitol à 70%, Titane dioxyde</p> <p><u>Principes actifs antiseptiques :</u> hexétidine, P-hydroxybenzoate de méthyle sodique³</p> <p><u>Concentration principe actif par dose unitaire :</u> Hexétidine 100 mg pour 100g</p> <p><u>Commercialisé par :</u> Laboratoire Johnson & Johnson Santé Beauté France 1 rue Camille Desmoulins 92130 Issy-les-Moulineaux</p>
<p>Cétylpyridinium</p>	<p>GUM gingidex™</p>  <p><u>Composition:</u> aqua, sorbitol, hydrated silica, isomalt, panthenol, hydroxyethylcellulose, PEG-40 hydrogenated castor oil, cocamidopropyl betaine, aroma, titanium dioxide, sodium fluoride, sodium saccharin, sodium chloride, <i>Aloe barbadensis</i> leaf juice, sodium methylparaben, glycerin, chlorhexidine digluconate, cetylpyridinium chloride, tocopherol, sodium benzoate, limonene.</p> <p><u>Principes actifs antiseptiques :</u> digluconate de chlorhexidine, chlorure de cétylpyridinium, fluorure de sodium¹, sodium methylparaben³</p> <p><u>Concentration principe actif par dose unitaire :</u> digluconate de chlorhexidine 0,06 % chlorure de cétylpyridinium 0,05 %</p> <p><u>Commercialisé par :</u> Sunstar France 55-63, rue Anatole-France. 92300 Levallois-Perret</p>

Tableau 2 (Fin). Principes actifs antiseptiques des cosmétiques destinés à l'hygiène bucco-dentaire, commercialisés en France dans les pharmacies d'officine (Février 2021)

<p>Triclosan</p>	<p>Colgate™ effet visible</p>  <p><u>Composition</u>: Glycerin, aqua, hydrated silica, sorbitol, PVM/MA copolymer, sodium lauryl sulfate, aroma, mica, sodium hydroxide, propylene glycol, xanthan gum, carrageenan, sodium fluoride, triclosan, sodium saccharin, hydroxypropyl methylcellulose, limonene, CI 77891, CI 74160, CI 73360. Fluorure de sodium 0,32% w/w (1450 ppm F)</p> <p><u>Principe actif antiseptique</u> : triclosan, fluorure de sodium¹</p> <p><u>Concentration principe actif par dose unitaire</u> : triclosan non précisé fluorure de sodium 0,32 % poids/poids (1450 ppm)</p> <p><u>Commercialisé par</u> : Colgate-Palmolive 92270 Bois-Colombe</p>
-------------------------	---

¹Monofluorophosphate de sodium, fluorure de sodium : ce composé à des propriétés antibactériennes intrinsèques, mais il est utilisé dans les dentifrices pour l'apport fluoré [Attiguppe et coll., 2019]

²Extrait de *Chamomilla recutita*, extrait de *Commiphora myrrha* : extraits phytochimiques traditionnellement utilisés contre les inflammations buccales

³Parahydroxybenzoate de méthyle, Parahydroxybenzoate de propyle, P-hydroxybenzoate de méthyle sodique : les parabènes sont utilisés comme conservateurs dans les produits cosmétiques

2.2. Biodégradabilité et antiseptiques utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire

2.2.1. La notion de biodégradabilité

Selon la définition du dictionnaire Larousse, « *biodégradable se dit des produits industriels et des déchets qu'une action bactérienne, naturelle ou induite, décompose assez rapidement et les fait disparaître de l'environnement en les convertissant en molécules simples utilisables par les plantes.* »

Le terme "biodégradable" n'a pas de définition unique. Le processus de biodégradation se déroule généralement en plusieurs étapes. Dans la première étape de la biodégradation partielle, des fragments de la substance d'origine se formeront, mais cela sera toujours néfaste à l'environnement. Ce n'est que lorsque le matériau d'origine est complètement dégradé en H₂O que le CO₂ et la biomasse sont considérés comme des lubrifiants entièrement biodégradables.

Contrairement à la norme CEC L-33-A-93 en vigueur jusqu'en 2012 puis mise à jour avec la norme CEC L-33-A-92, le test OECD 301 analyse la biodégradabilité complète et fait autorité aujourd'hui.

2.2.2. Méthode pour évaluer la biodégradabilité selon l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)

Il y a deux paramètres importants pour apprécier les substances organiques contenues dans les stations d'épuration : le carbone organique dissous (COD) et le carbone organique total (COT).

La Ligne directrice 301 de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) est divisée en six méthodes de test différentes (A, B, C, D, E et F) : « *Un fluide est désigné biodégradable lorsque le carbone organique dissous (COD) a diminué d'au moins 70% dans les six méthodes de test. Dans les 28 jours la demande théorique en oxygène (ThO) et la production théorique de dioxyde de carbone (ThCO₂) sont d'au moins 60%. Ces exigences relatives à la biodégradabilité des lubrifiants s'appliquent également au label écologique de l'UE. Les méthodes d'essai B, C et F s'appliquent aux produits insolubles dans l'eau tels que les huiles ou les graisses et font donc autorité pour les lubrifiants. Les produits hydrosolubles tels que certaines huiles hydrauliques sont testés selon la norme OCDE 301C* » [Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage, 1998].

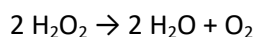
Pour le produit étudié, Bucovia, le test de biodégradabilité réalisé était le suivant : Biodégradabilité Facile OCDE 301 B, essai de dégagement de CO₂ (Essai de Sturm modifié). Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à tester (10

à 20 mg/L de COD ou de COT (Carbone organique total)) comme unique source nominale de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous lumière diffuse, par passage d'air exempt de dioxyde de carbone sous débit contrôlé. La dégradation est suivie par l'analyse du dioxyde de carbone produit pendant une période de 28 jours. Le CO₂ est piégé par de l'hydroxyde de baryum ou de sodium, puis il est dosé par titration de l'hydroxyde en excès ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produit par la substance d'essai (corrigée de la valeur obtenue pour le témoin contenant l'inoculum) est exprimée sous forme de pourcentage du CO₂Th (théorique). Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'une analyse supplémentaire du COD au début et à la fin de l'incubation.

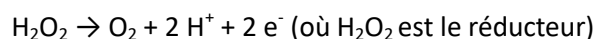
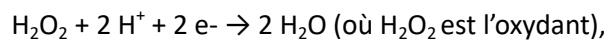
2.2.3. Les antiseptiques biodégradables utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire

Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) se décompose naturellement lorsqu'il est mis en suspension dans l'eau puis rejeté dans les eaux usées. Le peroxyde d'hydrogène se décompose en eau et en oxygène gazeux, en libérant de la chaleur :



Cette réaction se décompose en deux étapes d'oxydo-réduction :



Chez les êtres vivants, le peroxyde d'hydrogène est un sous-produit de la respiration cellulaire. D'un point de vue industriel, le peroxyde d'hydrogène était préparé par l'électrolyse d'une solution aqueuse d'acide sulfurique, puis par une seconde hydrolyse du peroxodisulfate formé. Il est maintenant fabriqué avec un procédé à l'antraquinone, avec un barbotage d'air comprimé à travers une solution d'un dérivé dihydroxyanthracène [Marshall et coll., 1995 ; Urban et coll., 2019].

Le peroxyde d'hydrogène peut être utilisé en bain de bouche avec H₂O₂ 3 % volume, pour l'effet inhibiteur de l'oxygène naissant sur les bactéries anaérobies strictes. En endodontie les solutions d'irrigation endodontique recommandées sont :

- l'hypochlorite de sodium NaClO de 2,5 à 6 % (antiseptie),
- l'acide éthylènediaminetétraacétique [CH₂N (CH₂CO₂H)]₂ (ou EDTA) à 17% (irrigation finale) et

- la chlorhexidine à 2 % en cas d'allergie au chlore et/ou en complément de l'hypochlorite de sodium.

En parodontologie, seuls deux produits recommandés par la Haute Autorité de Santé (HAS) :

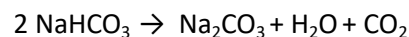
- la chlorhexidine 0,2 %

- l'iode sous forme de povidone iodée 10 % (Bétadine™ verte).

En parodontologie, H₂O₂ est considéré comme trop caustique. Les huiles essentielles aux doses autorisées dans les cosmétiques bucco-dentaires n'ont pas d'effet ou un effet insuffisant comme anti-infectieux ou antiseptiques pour un traitement oral local, selon le code ATC A01AB03. Le code ATC est le système de classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique qui est utilisé pour classer les médicaments [Prêcheur, 2021 ; Urban et coll., 2019].

Le bicarbonate de soude

Le bicarbonate de soude (NaHCO₃ ou hydrogénocarbonate de sodium), ou hydrogénocarbonate de sodium, se décompose lui aussi naturellement lorsqu'il est mis en suspension dans l'eau puis rejeté dans les eaux usées. Le bicarbonate de soude se décompose en carbonate de calcium, eau et gaz carbonique :



Les ions sodium (Na⁺) et bicarbonate (HCO₃) sont naturellement présents dans le corps. Ils constituent le principal système tampon des fluides extracellulaires tels que le plasma, le fluide interstitiel et la salive [Madeswaran et Jayachandran, 2018].

Le bicarbonate de soude est un minéral, qui se trouve dans la nature sous forme de cristaux prismatiques, en concrétions ou sous forme de filaments. Historiquement, il était recueilli sous forme de poudre sur les bords de nombreux lacs africains aux eaux saumâtres. Il était utilisé notamment par les Egyptiens pour les embaumements.

Le bicarbonate de soude officinal se présente sous forme de poudre blanche, légèrement abrasive. Il est très utilisé dans l'alimentation comme poudre à lever et dans les boissons gazeuses. Grâce à son absence de toxicité, il est souvent utilisé à 1,4% pour les soins de bouche des personnes dépendantes, à visée antiacide, pour prévenir ou lutter contre les candidoses orales et les stomatites prothétiques. Il est aussi utilisé comme brossage des dents pour lutter contre les parodontites et les péri-implantites. Il peut être utilisé comme produit d'hygiène bucco-dentaire au long cours, car il n'a pas d'effet indésirable notoire à cette concentration dans les bains de bouches, les dentifrices et les chewing-gums [Madeswaran et Jayachandran, 2018].

Les huiles essentielles


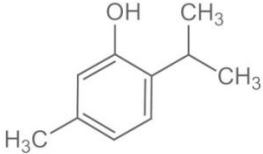
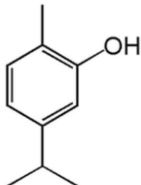

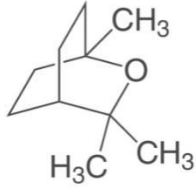


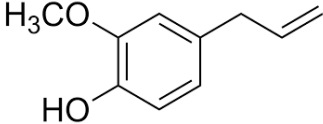
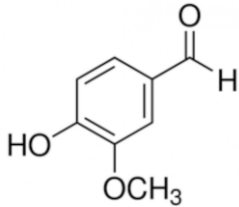
Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux et par définition elles sont toutes biodégradables dans l'environnement, sous l'effet des enzymes des microorganismes présents l'eau, le sol et dans les eaux usées. Ce sont de produits volatiles de composition complexe, obtenus à partir d'un nombre limité de familles végétales, telles que les Myrtaceae (girofler, eucalyptus), Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae (thym et romarin), Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae et Piperaceae. Elles sont liquides à température ambiante, généralement incolores et liposolubles. Les différents composés appartiennent principalement à deux groupes : les terpénoïdes (thymol, eucalyptol) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (eugénol), qui sont beaucoup moins fréquents [Bruneton, 2016].

Certaines huiles essentielles ont des propriétés antibactériennes et parfois antifongiques contre des levures comme *Candida*, à dose très faibles permettant leur usage par voie externe. Les huiles essentielles les plus antiseptiques sont obtenues à partir des plantes suivantes : sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus. En France, les huiles essentielles utilisées comme antiseptiques dans des produits d'hygiène bucco-dentaires proviennent surtout du thym (et du romarin, chimiquement très proche), de l'eucalyptus et du girofle [Bruneton, 2016]. Les principaux composés chimiques antiseptiques utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire sont détaillés dans le Tableau 3.

Il faut noter que l'huile essentielle de menthe n'a pas de propriétés antiseptiques, mais elle est très souvent utilisée dans les cosmétiques bucco-dentaires. En effet, elle a des propriétés aromatiques et procure une sensation de fraîcheur, car le menthol et les molécules proches stimulent spécifiquement les récepteurs sensitifs du froid [Prêcheur et coll., 2020].

Tableau 3. Principales huiles essentielles antiseptiques utilisées dans les produits d'hygiène bucco-dentaire

<p>Nom usuel <i>Nom scientifique</i> Famille</p>	<p>Plante</p>	<p>Composé antiseptique majeur dans les huiles essentielles</p>
<p>Thym <i>Thymus vulgaris</i> (L.) Lamiaceae</p>	<p>Huile essentielle de feuilles et sommités fleuries</p> 	<p>Thymol</p>  <p>Carvacrol</p> 
<p>Eucalyptus ou gommier bleu <i>Eucalyptus globulus</i> (Labill.) Myrtaceae</p>	<p>Huile essentielle de feuilles</p> 	<p>Eucalyptol ou 1,8-cinéole</p> 
<p>Giroflier <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Myrtaceae</p>	<p>Huile essentielle</p>  <p>de clous et de feuilles</p> 	<p>Eugénol</p>  <p>(Vanilline)</p> 

Classification chimique des composés des huiles essentielles

Les terpénoïdes sont les composés les plus volatils car ils ont un poids moléculaire relativement peu élevé en C₁₀ et C₁₅. C'est le cas des monoterpènes en C₁₀ : alcools (géraniol, linalol, citronellol, menthol), aldéhydes géraniol, néral, citronellal), cétones (menthone, isomenthone), esters (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle, acétate de menthyle), éthers (eucalyptol, dill-ether), peroxydes (ascaridole) et phénols (thymol, carvacrol). Certains éthers comme les oxydes de linalol et les oxydes de rose ont un rôle majeur dans l'arôme des fruits. Les sesquiterpènes, plus lourds, sont surtout des carbures (β -bisolènes, β -caryophyllène, longifolène), des alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol) et des cétones (β -vétivone) [Bruneton, 2016 ; Dehsheikh et coll., 2020].

Les composés aromatiques sont surtout des dérivés du phénylpropane (C₆C₃). Plus rares que les terpénoïdes, ce sont souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes. Ils sont caractéristiques des huiles essentielles d'Apiaceae, obtenues par exemple à partir d'anis, de fenouil et de persil (anéthole, anisaldéhyde, apiol, estragole, etc.). Ils sont aussi caractéristiques des huiles essentielles de girofle, muscade, estragon, basilic, cannelle (eugénol, safrole, asarone, cinnamaldéhyde, etc.) [Bruneton, 2016].

Les autres composés sont par exemple des composés en C₆C₁ comme la vanilline, qui a une formule chimique très proche de celle de l'eugénol. Au niveau industriel, l'eugénol est utilisé pour fabriquer de la vanilline de synthèse. Enfin, certaines huiles essentielles contiennent des composés non volatiles, entraînés par la vapeur d'eau. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Des dérivés des acides linoléique et α -linoléique donnent une odeur « verte » de feuilles (octanal, décane, acétate d'hexényle, etc.), et des acides jasmoniques et leurs esters ont une odeur de jasmin ou de tubéreuse [Bruneton, 2016 ; Dehsheikh et coll., 2020].

L'huile essentielle de thym (Lamiaceae)

Le thym (*Thymus vulgaris* et les variétés proches) donne une huile essentielle riche en phénols, qui sont antibactériens et antifongiques. Selon Bruneton, tous les chimiotypes sont actifs, mais l'activité bactéricide est plus marquée pour les types à thymol et carvacrol (Tableau 3). Le thym est traditionnellement utilisé en usage local contre le rhume et le nez bouché (feuille et sommet fleuri), en pastilles comme antalgique dans les affections de la cavité buccale ou du pharynx, ainsi qu'un bain de bouche pour l'hygiène buccale (Tableau 4). Le diodothymol était utilisé pour décontaminer les lésions carieuses [Jaric et coll., 2015 ; Bruneton, 2016 ; Sakkas et Papadopoulou, 2017].

Tableau 4. Emplois des phytomédicaments à base de thym, d'eucalyptus et de clou de girofle. A forte dose ces phytomédicaments sont toxiques, en particulier neurotoxiques [D'après Bruneton, 2016]

Phytomédicaments	Emplois traditionnels
Thym	Voie externe et voie orale : - antifongique et anthelminthique - antiseptie buccale - traitement d'irritations cutanées
Eucalyptus	Voie orale et locale : - propriétés expectorantes, stimulantes de l'épithélium bronchique et mucolytiques en cas de rhinite et de toux non productives gênantes
Clou de girofle	Usage local : - traitement des petites plaies après lavage abondant - antalgique (céphalées, douleurs dentaires) - antalgique dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx (collutoire, pastilles) - en bain de bouche pour l'hygiène buccale Voie orale : - troubles digestifs

L'huile essentielle d'eucalyptus (Myrtaceae)

Il existe 3 800 espèces de Myrtaceae, dont près de 700 *Eucalyptus* et 500 *Syzygium* (girofliers), qui sont caractérisés par des huiles essentielles souvent antiseptiques.

L'eucalyptus ou gommier bleu (*Eucalyptus globulus*) contient surtout du 1,8-cinéole (eucalyptol), qui est facilement résorbé par voie digestive, cutanée et rectale. Il est éliminé par voie pulmonaire et par voie rénale. Comme le menthol, il est traditionnellement utilisé pour « décongestionner » les voies aériennes supérieures en cas de rhinite (Tableau 4). *In vitro*, l'extrait hydro-alcoolique de feuilles contient des macrocarpals, qui sont antibactériens et inhibent les bactéries cariogènes [Bruneton, 2016 ; Dhakad et coll., 2018].

L'huile essentielle de girofle (Myrtaceae)

Le giroflier, *Syzygium aromaticum*, est un arbre encore appelé *Eugenia caryophyllul*. L'huile essentielle est produite à partir des feuilles et des fruits secs, appelés clous de girofle. Ils ont une odeur aromatique caractéristique, avec une saveur brûlante. Leur teneur en huile essentielle est très élevée, avec 150 à 180 ml/kg de feuilles. Cela en fait un composé produit à bas coût. L'eugénol est le composé largement majoritaire dans les clous et les feuilles. C'est un propénylphénol, accompagné de nombreux composés terpéniques, aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques (β -caryophyllène). Le bouton floral renferme également des hétérosides de chromones. L'huile essentielle de clous de girofle contient 75-88 % d'eugénol, 5-14 % de β -caryophyllène, et 4-15 % d'acétate d'eugényle [Bruneton, 2016 ; Batiha et coll., 2020]. Les emplois des phytomédicaments à base de clou de girofle sont détaillés dans le Tableau 4.

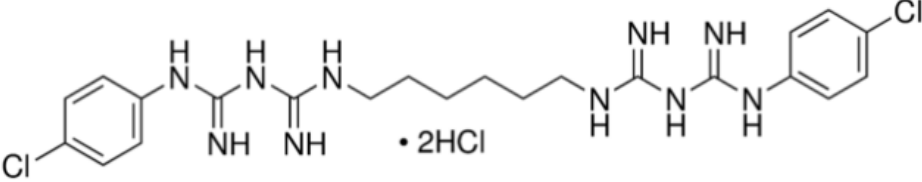
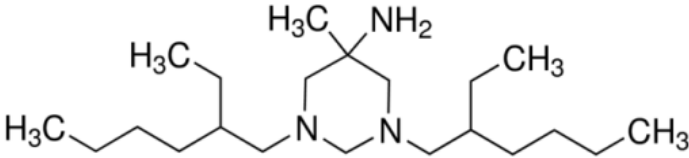
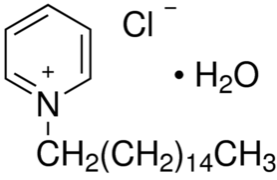
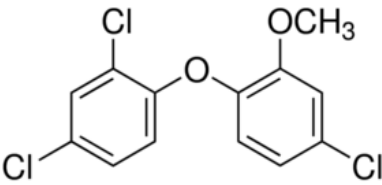
L'huile essentielle de clou de girofle ou « eugénol » est très utilisée en odontologie. En endodontie, il ne pas utiliser en contact direct avec les tissus vivants, car il entraîne des lésions histologiques. L'eugénol a aussi des propriétés anesthésiques locales (il inhibe la conduction nerveuse), et c'est un anti-inflammatoire (inhibiteur de la synthèse des prostaglandines et du chimiotactisme des leucocytes). A faible concentration (10^{-2} - 10^{-3} mM / L) l'eugénol est bactéricide. Il est habituellement utilisé sous forme de pansement à l'eugénate (eugénolate de zinc), c'est-à-dire le chélate qui se forme entre deux molécules d'eugénol et un atome de zinc [Bruneton, 2016 ; Batiha et coll., 2020].

2.2.4. Les antiseptiques de synthèse peu biodégradables

Généralités sur les antiseptiques de synthèse

Les antiseptiques de synthèses ont un effet antiseptique sur les tissus vivants et désinfectant sur les matériels et les surfaces. Il s'agit souvent des mêmes molécules à des concentrations différentes. L'objectif des antiseptiques est en théorie de détruire les bactéries (y compris les spores bactériennes), les champignons (y compris les spores fongiques), les virus et les parasites, sans léser la peau ni les muqueuses. Cependant, il existe toujours une résorption du produit, qui est beaucoup plus importante sur la peau fine des bébés et des personnes, ainsi que sur les lésions cutanéomuqueuses. In vivo, l'effet antiseptique est très difficile à obtenir car le principe actif doit parvenir au site infecté et il est souvent rapidement inactivé par les débris cellulaires, notamment des protéines. Enfin, les antiseptiques n'inactivent pas les prions [Varoni et coll., 2012].

Tableau 5. Antiseptiques de synthèse utilisés comme principe actif dans les produits d'hygiène bucco-dentaire. Ils sont peu biodégradables dans l'environnement.

Principe actif (Exemple de nom commercial)	Structure chimique d'après Sigma Aldrich (sigmaaldrich.com)
Bisbiguanide : Chlorhexidine (Gamme Eludril™)	
Bisbiguanide : Hexétidine (Gamme Hextril™)	
Chlorure de cétylpyridinium (Gamme GUM gingidex™)	
Triclosan (Colgate Total™)	

Les bisbiguanides : chlorhexidine et hexétidine

La chlorhexidine ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) et l'hexétidine ($C_{21}H_{45}N_3$ ou 1,3-bis(2-ethylhexyl)-5-methyl-1,3-diazinan-5-amine) sont des antiseptiques de synthèse de la famille des bisbiguanides (Tableau 5).

La chlorhexidine est un bisbiguanide cationique chloré généralement utilisé sous forme de digluconate de chlorhexidine. En effet, la chlorhexidine est un composé cristallin incolore, inodore et insoluble dans l'eau. C'est pourquoi elle est utilisée sous forme de sels (gluconate, digluconate, acétate, diacétate de chlorhexidine) en solution aqueuse ou hydroalcoolique à la concentration de 0,05 à 0,5 %. La chlorhexidine est compatible avec les alcools et les ammoniums quaternaires, mais pas avec les composés anioniques tels que le laurylsulfate de sodium, le monofluorophosphate de sodium, l'acide borique, les antiseptiques iodés, les métaux et la plupart des colorants [Varoni et coll., 2012 ; Vergara-Buenaventura et Castro-Ruiz, 2020].

La chlorhexidine est un antiseptique à large spectre, avec des propriétés bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires et sporicides à forte dose. Elle est bactériostatique aux concentrations usuelles (0,1 à 0,2 %), en augmentant la perméabilité membranaire, ce qui provoque une fuite cytoplasmique. Elle est bactéricide à plus forte dose en faisant précipiter les protéines et les acides nucléiques. Elle a également un pouvoir détergent, antioxydant et antifongique. Enfin, il existe des bactéries résistantes à la chlorhexidine, comme certaines souches de *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* [Vergara-Buenaventura et Castro-Ruiz, 2020].

En odontologie, la chlorhexidine est très largement utilisée comme produit antiplaque. Elle réduit les gingivites et les saignements gingivaux. A faible dose (0,12 % pendant un mois maximum), c'est un adjuvant du nettoyage mécanique des dents (brosse à dents et fil de soie), notamment pour les personnes qui ont des difficultés pour assurer une hygiène bucco-dentaire correcte ou pour les sites difficiles d'accès. A plus forte dose (2,0 % pendant à 10 ou 11 jours maximum), elle est souvent prescrite en bain de bouche post-chirurgical, à commencer 48 h après l'intervention [Varoni et coll., 2012]. Les effets indésirables de la chlorhexidine dans les produits d'hygiène bucco-dentaire sont les suivants : effet cytotoxique sur la muqueuse orale lors de surdosage, urticaire voire choc anaphylactique, eczéma de contact et plus souvent coloration jaune ou marron des dents et de la langue, réversible à l'arrêt du traitement. Les produits doivent être recrachés. Après ingestion, la chlorhexidine est toxique et peut entraîner une nécrose des muqueuses digestives, une hépatite et une hémolyse [Varoni et coll., 2012 ; Vergara-Buenaventura et Castro-Ruiz, 2020].

L'hexétidine est moins utilisée que la chlorhexidine en cas de parodontite, car elle a une action antiplaque moins efficace. Elle présente l'avantage de moins jaunir les dents en cas d'utilisation prolongée. Contrairement à la chlorhexidine (Eludril™ par exemple), en France il n'y a pas de produit d'hygiène bucco-dentaire contenant de l'hexétidine qui soit remboursé par l'Assurance Maladie [Afennich et coll., 2011].

Le chlorure de cétylpyridinium

Le chlorure de cétylpyridinium (C₂₁H₃₈ClN · H₂O avec des isomères) est un ammonium quaternaire cationique. Il est utilisé dans les cosmétiques d'hygiène bucco-dentaire contre la plaque dentaire, la gingivite et l'halitose. Comme la chlorhexidine, un usage régulier colore la langue et les dents en marron. En cas de surdosage, le chlorure de cétylpyridinium est toxique par ingestion ou par inhalation [Mao et coll., 2020]. In vitro, le cétylpyridinium a un spectre large, actif sur les bactéries Gram positif et contre les champignons microscopie, notamment contre les levures. Il est moins efficace contre les bactéries Gram-négatif et contre les mycobactéries. En bain de bouche, à la concentration de 0,05 %, le cétylpyridinium provoque une réduction immédiate > 99% de la plaque dentaire; il reste efficace à 90 % une heure après le bain de bouche. Il est indiqué pour lutter contre les gingivites et les candidoses orales. L'équilibre des espèces bactériennes dans le biofilm oral ne semble pas perturbé, même après 6 semaines d'utilisation quotidienne [Pitten et Kramer, 2001].

Le triclosan

Le triclosan (C₁₂H₇Cl₃O₂ avec des isomères, ou 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol, ou hexachlorophène) est un biocide organophosphoré proche des pesticides du type chlorophénol. Il est très utilisé dans de très nombreux produits cosmétiques et même dans des objets tels que des jouets. Le triclosan est un antiseptique à large spectre, antibactérien et antifongique et il diminuerait la diversité du microbiote intestinal. C'est un perturbateur endocrinien qui traverse la peau et les muqueuses. Une utilisation au long cours augmenterait le risque de cancers hormono-dépendants. Certains microbes lui seraient devenus résistants [Weatherly et Gosse, 2017; Alfhili et Lee, 2019; Lee et coll., 2019].

2.3. Impact des antiseptiques de synthèse sur l'environnement

2.3.1. La pollution de l'eau

L'utilisation à grande échelle des antiseptiques dans les produits pharmaceutiques et les cosmétiques est responsable de leur dispersion dans l'environnement [von der Ohe et coll., 2012; Manamsa et coll., 2016].

Les ammoniums quaternaires sont biodégradables dans des conditions aérobies, mais leur dégradation dépend de la molécule, de la concentration d'oxygène dans l'eau et de la fixation de surfactants anioniques. Les ammoniums quaternaires et le triclosan ont été retrouvés dans les eaux souterraines, dans les rivières et dans les eaux des stations d'épuration. Les eaux d'arrosage et les boues résiduelles des stations d'épuration, utilisées dans les cultures maraîchères, contiennent des antiseptiques. Ces produits ont été identifiés dans des plantes et certains poissons [Zhang et coll. 2015]. Ils sont toxiques pour de nombreux organismes aquatiques [Clarke et Smith, 2011]. Le triclosan est plus toxique pour les espèces aquatiques comme les algues, les invertébrés et certains types de poissons que pour l'Homme, et les produits de dégradation du triclosan sont plus toxiques que le triclosan lui-même [Dann et Hontela, 2011; Zhang et coll., 2015].

2.3.2. Rappel sur les perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens également appelés xenhormones ou leurres endocriniens sont des produits chimiques ou des mélanges d'origine naturelle ou artificielle qui ont la capacité d'interférer avec le système hormonal (également appelé système endocrinien). L'expression a été créée par Theodora Colborn en 1991. Selon l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS), *"ils peuvent avoir des effets néfastes sur des fonctions vitales telles que la reproduction, la croissance, le développement et même le métabolisme. Ces dangers concernent non seulement les individus directement exposés, mais aussi leurs enfants et petits-enfants. Les préoccupations liées aux perturbateurs endocriniens ont commencé au début des années 2000 et ont depuis été principalement liées à des problèmes environnementaux ou de santé publique, et à certains produits de consommation courante (médicaments, aliments, cosmétiques, etc.). C'est pourquoi "la stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens est désormais intégrée au troisième plan national santé et environnement (PNSE 3)"* [Institut national de recherche et de sécurité, 2020]

2.3.3. Les perturbateurs endocriniens faibles

Certains antiseptiques sont des perturbateurs endocriniens faibles, capables de dérégler le métabolisme hormonal chez certaines espèces de poissons. Il en résulte une féminisation des poissons mâles, ce qui est une cause supplémentaire de la raréfaction des poissons d'eau douce [Tezel et Pavlosthathis, 2015].

L'Homme aussi peut accumuler des antiseptiques qui proviennent de l'eau, des aliments et des produits cosmétiques [Bedoux et coll., 2012; Dinwiddie et coll., 2014]. Cette accumulation pourrait être toxique à long terme, car ce sont des œstrogènes faibles et ils peuvent inhiber la synthèse des acides gras. Cela leur permettrait d'agir comme perturbateurs endocriniens et facteurs de risque de certains cancers [Clarke et Smith, 2011; Witorsch, 2014; Dinwiddie et coll., 2014].

L'impact des antiseptiques dans les produits d'hygiène bucco-dentaire est donc un problème au niveau mondial. Depuis 2016, la *Food and Drug Administration* (FDA) a interdit aux USA l'utilisation du triclosan dans les savons antibactériens (FDA *Issues* September 2, 2016). Le règlement européen a aussi interdit, dans les hôpitaux, l'utilisation du triclosan dans les produits d'hygiène en contact avec la peau (Commission Européenne Règlement sur les cosmétiques, Avril 2014). Pour les autres cosmétiques, l'utilisation du triclosan est limitée à 0,3 % dans les dentifrices et les savons, et à 0,2 % dans les bains de bouche.

2.3.4. Impact des antiseptiques sur les écosystèmes microbiens

Chez l'Homme, certaines bactéries endogènes de la flore intestinale ont des gènes de résistance aux ammoniums quaternaires (gènes *qac*). Ces gènes codent pour des pompes à efflux, qui expulse les molécules hors de la bactérie et diminue sa susceptibilité aux autres antiseptiques, tels que le cétrimide, le chlorure de benzalkonium et la chlorhexidine [Wessels et Ingmer, 2013]. De plus, chez *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, des gènes *qac* portés par des plasmides peuvent induire une résistance croisée avec des antibiotiques comme les quinolones [Wassenaar et coll., 2015; Buffet-Bataillon et coll., 2016].

2.4. Propriétés de l'antiseptique biodégradable testé, extrait de *Solidago virgaurea*

2.4.1. Cahier des charges d'un nouvel actif "vert" pour les produits d'hygiène bucco-dentaire

Les chercheurs du laboratoire Micoralis EA 7354, à la faculté de chirurgie-dentaire de Nice, ont voulu développer un antiseptique pour les produits d'hygiène bucco-dentaire, qui répondait au cahier des charges suivant :

- 1) Réduire la biomasse de la plaque dentaire afin de maintenir la santé bucco-dentaire, mais
- 2) Préserver le biofilm endogène protecteur bactérien-fongique ;
- 3) Etre sans danger pour l'Homme (non toxique, absence de molécules suspectées d'être des perturbateurs endocriniens), et
- 4) Etre sans danger pour l'environnement (ne pas détruire ou appauvrir les ressources naturelles, non toxique pour l'environnement et facilement biodégradable).

2.4.2. Caractéristiques phytochimiques de l'extrait de *Solidago virgaurea*

L'équipe du laboratoire Micoralis EA 7354, faculté de chirurgie-dentaire et Nice a développé un dentifrice à base de saponines d'une plante d'Europe, *Solidago virgaurea* (L.), qui est une Asteraceae. Cette plante a une sous-espèce, *Solidago virgaurea alpestris*, qui pousse en altitude dans les Alpes (Figure 3). C'est une plante sauvage qui n'est ni rare, ni menacée et qui peut être cultivée.

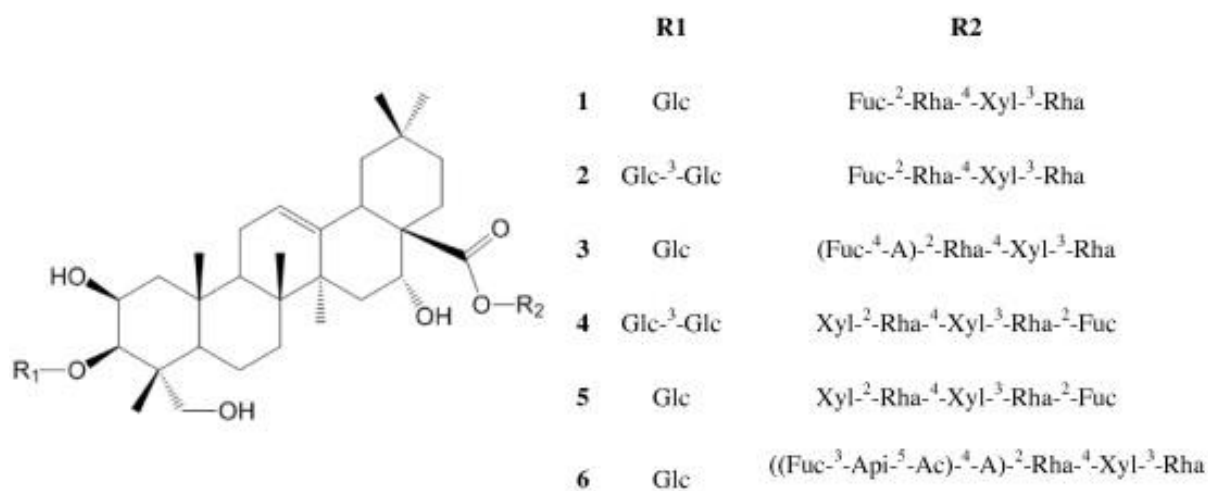
Figure 3. *Solidago virgaurea alpestris*, en période de floraison. Dans le Mercantour, la floraison a lieu entre le 15 juillet et le 15 août environ selon les conditions météorologiques, à 2000 m d'altitude (cliché Pr I. Prêcheur)



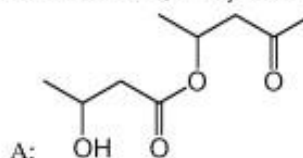
Pour les travaux de caractérisation phytochimique de *S. virgaurea alpestris*, les cueillettes ont été réalisées dans le Mercantour par l'Association Foncière Agricole de la vallée de la Tinée (06420 Isola), sous le contrôle du Conservatoire National Botanique de Porquerolles.

Le processus d'extraction a été mis au point au laboratoire Micoralis (brevet Madinier WO 2010/072923). L'extrait végétal obtenu contient notamment des saponines, des monoterpènes, des diterpènes, des triterpènes, des flavonoïdes, des acides phénoliques et des polyacétylènes. [Laurençon et coll., 2013]. L'extrait contient un mélange de six saponines, dont trois nouvelles alpestrisaponines (Figure 4).

Figure 4. Formule chimique des saponines de *Solidago virgaurea ssp. alpestris* (L.) (D'après Laurençon et coll., 2013).



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



2.4.3. Propriétés antimicrobiennes de l'extrait de *Solidago virgaurea*

Activité anti-Candida albicans et anti-biofilms

Les solidagosaponines sont des détergents végétaux qui se fixent sur les stérols membranaires, en particulier l'ergostérol des *Candida*. Les bactéries n'ont pas de stérols membranaires, c'est pourquoi les solidagosaponines ne sont ni bactériostatiques, ni bactéricides *stricto sensu* [Chevalier et coll., 2012].

Aux concentrations utilisées et par voie orale, ces solidagosaponines ne sont pas toxiques chez l'homme (European Medicine Agency EMA Committee for Herbal Medicinal Products 2008 ; Règlement européen REACH N° 1907/2006). Contrairement au triclosan, à la chlorhexidine, à l'hexétidine et aux ammoniums quaternaires (chlorure de cétylpyridinium) utilisés dans des dentifrices, par exemple, ce ne sont pas des perturbateurs endocriniens.

Sur *C. albicans*, les extraits de *S. virgaurea* bloquent la formation d'hyphes et l'adhérence aux cellules d'épithélium buccal en culture (lignée TR146). Ils inhibent les biofilms en formation et réduisent l'épaisseur de biofilms préformés. Des résultats similaires sont observés avec des biofilms

mixtes *C. albicans*-bactéries (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*). Cet effet inhibiteur est dû à une inhibition des gènes de *C. albicans* spécifiques des adhésines et de la formation d'hyphes (gènes HWP1, ALS3, ECE1, SAP6 et HGC1) [Chevalier et coll., 2019].

Les extraits de *S. virgaurea* sont aussi capables d'inhiber la formation de biofilms bactériens. Par exemple, l'équipe de Micoralis a testé des espèces anaérobies (*S. mutans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*) en co-culture avec des espèces aérobies (*Rothia mucilaginosa*, *Gemella haemolysans*, *Micrococcus luteus*). Cet effet pourrait résulter des propriétés de neutralisation des lipides et de chélation du fer par les solidagosaponines.

Efficacité in vivo : étude clinique de validation dans un dentifrice fluoré

L'équipe de Micoralis a sélectionné des extraits de *S. virgaurea* liquides et décolorés, utilisables dans des produits d'hygiène bucco-dentaire. L'extrait retenu s'appelle Bucovia™ (Givaudan, Vernier, Suisse). C'est un actif naturel d'origine végétale, facilement biodégradable et sans impact sur l'environnement, contrairement au triclosan, à la chlorhexidine, à l'hexétidine et aux ammoniums quaternaires (test OECD 301 B : biodégradabilité >75% en 28 jours).

Une étude clinique de validation a été réalisée auprès de 66 adultes en bonne santé avec un dentifrice fluoré contenant l'extrait de *S. virgaurea* à 0,3 % (Bucovia™). Ils ont utilisé ce dentifrice deux fois par jour pendant 8 semaines. Cette étude randomisée en double aveugle vs contrôle a montré une diminution de la charge fongique (*C. albicans*), de la charge bactérienne orale totale, ainsi qu'une sensation de fraîcheur buccale augmentée de 76 mn, en lien avec la diminution des bactéries anaérobies strictes [Prêcheur et coll., 2020].

2.5. Objectif de ce travail

Une étude récente a testé Bucovia sur des champignons microscopiques du mycobiome oral, qui sont minoritaires et difficiles à cultiver comparés à *C. albicans* [Ghannoum et coll., 2010]. Cette étude a été réalisée sur des cultures de souches fongiques mono-espèces [Varlet, 2020]. Notre travail de thèse avait pour objectif de tester Bucovia sur une souche fongique, *Saccharomyces cerevisiae*, seul et en co-culture avec une bactérie, *Streptococcus salivarius*. Il s'agit d'une mise au point technique, en vue d'autres co-cultures bactério-fongiques pour d'autres applications de Bucovia, par exemple en dermatologie.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Souches testées

3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Les infections à Saccharomyces cerevisiae

Nous avons testé l'extrait de *S. virgaurea* sur *S. cerevisiae*, pour évaluer son impact sur une autre levure que *C. albicans* dans un biofilm mixte bactérien-fongique. En effet, *S. cerevisiae* est très utilisé comme modèle, car c'est un champignon facile à cultiver au laboratoire et rarement pathogène [Anofel, 2016 ; Limon et coll., 2017]. *S. cerevisiae* est une levure. En culture, elle forme un mélange de cellules rondes qui bourgeonnent et qui s'appellent des conidies ou des spores. Les conidies (ou blastospores) sont la forme asexuée de la levure. Les spores (ou asques) sont la forme sexuée de la levure. Contrairement à une autre levure, *C. albicans*, *S. cerevisiae* ne forme des filaments ou hyphes que dans les milieux carencés en azote (Tableau 6) [Bouchara et coll., 2010].

Tableau 6. Caractères cultureux et microscopiques de *Saccharomyces cerevisiae* (D'après Bouchara et coll., 2010)

Caractères cultureux
Colonies luisantes et lisses, plus ou moins rugueuses, de couleur blanche à crème, à bords nets, qui poussent en 4 à 5 jours sur milieu de Sabouraud.
Morphologie microscopique
- Multiplication végétative : Blastospores ovoïdes, globuleuses ou cylindriques, de grande taille (5 à 15 µm de long sur 5 à 10 µm de large), isolées ou en amas. Du pseudomycélium ne peut se voir que dans des conditions de culture très particulières (milieu carencé en azote).
- Multiplication sexuée : Asques globuleux contenant 1 à 4 ascospores sphériques, de 2,5 à 6 µm de diamètre.

Les saccharomycoses sont des affections cosmopolites rares. *S. cerevisiae* est l'espèce la plus souvent isolée, en général dans des prélèvements digestifs. En effet, les *Saccharomyces* sont des levures fréquentes dans la nature sur les légumes et les fruits, et largement utilisées dans l'industrie alimentaire. *S. cerevisiae* est utilisée pour la fabrication du pain (levain ou levure de boulanger : voie aérobie ou respiration, avec transformation du glucose en dioxyde de carbone) et pour les boissons fermentées comme le vin ou la bière (voie anaérobie : fermentation alcoolique du glucose) [Jouhten et coll., 2016]. *Saccharomyces boulardii* est une autre espèce, proche de *S. cerevisiae*. Elle est utilisée comme probiotique dans les diarrhées (Ultralevure™).

S. cerevisiae n'est que rarement pathogène, associée à des stomatites pseudomembraneuses, à des vaginites récidivantes ou à des infections urinaires. Certaines infections profondes ont été décrites : septicémies sur cathéters infectés, endocardites sur prothèses valvulaires, péritonites post-opératoires ou après dialyse péritonéale, ou encore oesophagites ou pneumonies chez des malades atteints du sida. 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 ou un état général très affaibli ou immunodéprimé [Bouchara et coll., 2010].

La souche testée

Nous avons testé une souche fongique sauvage de *S. cerevisiae*, qui a été isolée et identifiée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un malade, au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice, à l'hôpital l'Archet (Pr Pierre Marty et Pr Christelle Pomares).

3.1.2. *Streptococcus salivarius*

Rôle de Streptococcus salivarius dans le microbiote oral

Streptococcus salivarius est une bactérie cocci Gram positif, anaérobie facultative, très présente dans le microbiote buccal. Il est caractéristique des flores compatibles avec la santé bucco-dentaire, c'est pourquoi il a été proposé comme probiotique [Westcombe et coll., 2012]. Lorsqu'il est spécifiquement recherché, *S. salivarius* peut être isolé dans les flores polymicrobiennes associées à toutes les infections bucco-dentaires, mais il est rarement invasif. *S. salivarius* fait partie des streptocoques non groupables et alpha-hémolytiques (ou *viridans*). Cela signifie qu'il hémolyse partiellement les globules rouges pour se procurer le fer nécessaire à sa croissance. *In vitro*, cela se traduit par un halo verdâtre autour des colonies bactériennes [Abranches et coll., 2018].

La souche testée

Il s'agit aussi d'une souche sauvage, qui a été isolée et identifiée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un malade, au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nice à l'hôpital de l'Archet (Pr Raymond Ruimy).

3.2. Produit testé (extrait de *Solidago virgaurea*) et contrôles

3.2.1. Extrait de *Solidago virgaurea*

L'extrait de *Solidago virgaurea* (Bucovia) nous a été fourni par le laboratoire Givaudan (Vernier, Suisse), sous forme d'un liquide hydrosoluble contenant essentiellement des saponines triterpénoïdes, des flavonoïdes et des antocyanidines [Laurençon et coll., 2013]. L'extrait a été utilisé à 0,3% final dans les inoculums en milieu liquide YEP.

3.2.2. Contrôles

Le contrôle négatif était l'inoculum de départ en milieu YEP non modifié. Tous les contrôles positifs ont été utilisés à 0,3% final dans les inoculums en milieu liquide YEP, comme Bucovia. Nous avons utilisé les contrôles suivants :

Bain de bouche à la chlorhexidine Eludril™

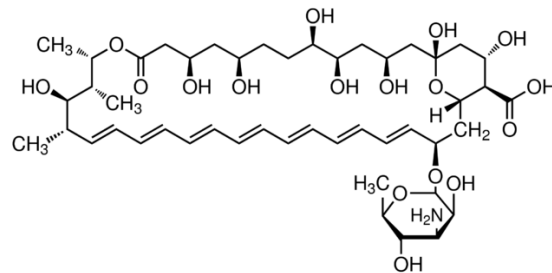
Eludril™ (Pierre Fabre, Castres, France) est un bain de bouche qui contient deux principes actifs antiseptiques, la chlorhexidine et un alcool, le chlorobutanol (Tableau 7). Autres composants : Glycérol, éthanol à 96 %, docusate de sodium, lévomenthol, solution alcoolique d'huile essentielle de menthe, eau purifiée, rouge cochenille A (E124).

Tableau 7. Composition du bain de bouche Eludril™ (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

L'amphotéricine B (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) est un médicament antifongique de la famille des polyènes, sous forme de poudre (Figure 5). *S. cerevisiae* est sensible à l'amphotéricine B.

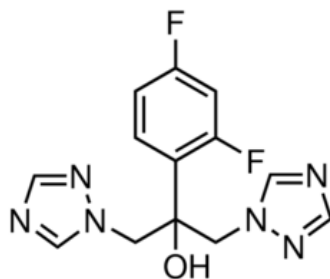
Figure 5. Formule chimique de l'amphotéricine B ($C_{47}H_{73}NO_{17}$) (D'après sigmaaldrich.com)



Fluconazole

Le fluconazole (Arrow, Lyon, France), est un médicament antifongique de la famille des imidazolés. C'est un composé fluoré sous forme de poudre (Figure 6).

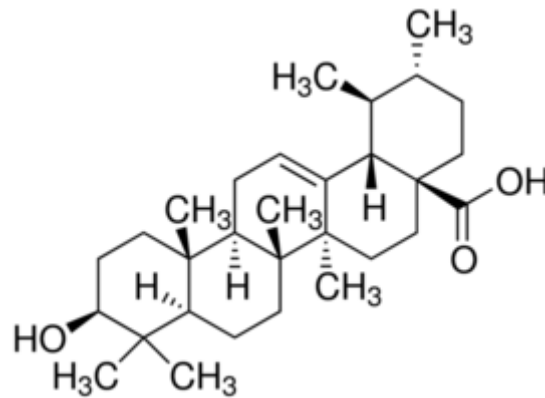
Figure 6. Formule chimique du fluconazole ($C_{13}H_{12}F_2N_6O$ avec des isomères) (D'après sigmaaldrich.com)



Saponines de marron d'Inde ou escine

L'escine est un mélange des saponines extrait du fruit du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* (L.)), qui se présente sous forme de poudre (Sigma-Aldrich) (Figure 7). L'escine est un détergent végétal de référence. Mais elle est trop astringente et n'est pas autorisée dans les cosmétiques en contact avec les muqueuses [Bruneton, 2016].

Figure 7. Formule du principal composé de l'escine ($C_{55}H_{86}O_{24}$ avec des isomères) (D'après sigmaaldrich.com)



3.3. Cultures microbiennes

3.3.1. Cultures sur milieux solides

Les manipulations ont été réalisées au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice, sous la direction du Dr Lilia Hasseine et du Dr Anne Landreau. Nous avons utilisé un poste de sécurité microbiologique (PSM, Thermo Fisher Scientific France, Dardilly, France) (Figure 8).

Figure 8. Poste de sécurité microbiologique pour les manipulations des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Streptococcus salivarius* (PSM, Thermo Fisher Scientific France, Dardilly, France)



Les cultures en milieu gélosé solide servent à faire : 1) des repiquages des souches fraîches ou congelées, 2) des ré-isolements pour ensemercer les cultures en milieu liquide et 3) des rétro-cultures à partir des cultures en milieu liquide. Dans le cas des cultures mixtes bactério-fongiques, cela permet notamment de vérifier si c'est la bactérie et/ou le champignon qui ont réussi à pousser dans le milieu de culture, malgré la présence d'un inhibiteur.

Nous avons donc utilisé deux types de milieux gélosés : le milieu YPDA (aussi appelé milieu de Sabouraud) pour *S. cerevisiae* et une gélose au sang pour *S. salivarius*. Les temps d'incubation étaient de 48 h à 30°C en aérobiose (Figure 9).

Figure 9. Etuve utilisée pour incuber les cultures à 30°C (Firlabo, Froilabo, Meyzieu, France)



Le milieu YPDA

Le milieu YPDA (*Yeast extract – Peptone – Dextrose – Agar*) est un milieu d'isolement des levures et des moisissures, qui empêche la croissance des bactéries par son pH acide (pH 6) tout en favorisant la pousse de *S. cerevisiae*. Nous avons utilisé un milieu qui contenait aussi du chloramphénicol à 0,5 g/L pour mieux inhiber la croissance bactérienne. Le milieu YPDA contient :

- Extrait de levure 1g / 100 mL
- Peptone (source de carbone, azote, soufre) 1 g / 100 mL
- Glucose (source de carbone et d'énergie) 2 g / 100 mL
- Agar-agar 1,5 g / 100 mL
- Eau distillée 100 mL.

La gélose au sang

La gélose au sang est un milieu de culture riche, utilisé pour la culture des bactéries exigeantes comme les streptocoques. Son pH est de $7,3 \pm 0,2$. Elle contient, en g / L :

- Tryptone: 10,0
- Peptone de viande: 5,0
- Extrait autolytique de levure: 5,0
- Peptone pancréatique de cœur: 3,0
- Amidon de maïs: 1,0
- Chlorure de Sodium: 5,0
- Agar: 13,5
- 0,5 % de sang de mouton.

3.3.2. Cultures en milieu liquide

Les cultures ont été réalisées en milieu YEP, qui contient :

- Extraits de levure (Yeast extract) 11mg/mL
- Peptone 22mg/mL
- N-acétyl- α -D-Glucosamine (GlcNac) à 2% soit 2g/100mL.

Nous avons réalisé des cultures de *S. cerevisiae* seul et des co-cultures de *S. cerevisiae* et *S. salivarius* en milieu YEP, en présence de Bucovia et des quatre inhibiteurs potentiels utilisés comme contrôle positif (Eludril, amphotéricine B, fluconazole et escine). Tous les inhibiteurs ont été testés à 0,3 % final (poids / volume ou volume / volume).

Les souches ont été repiquées à partir d'une colonie isolée sur milieu gélosée, afin d'avoir des champignons et des bactéries en phase de croissance. Une colonie de 2 mm de diamètre était mise en suspension dans une ampoule de sérum physiologique (NaCl 0,85 %) et diluée jusqu'à d'obtenir une concentration finale d'inoculum correspondant à McFarland 5 (Oxoid, Basingstoke, Royaume uni). Nous avons utilisé des tubes Eppendorf de 900 μ L. Nous avons pipeté 600 μ L d'inoculum (*S. cerevisiae*) et 300 μ L de milieu YEP sans inhibiteur (Contrôle négatif) ou 300 μ L de milieu YEP avec inhibiteur. Pour les cultures mixtes, les tubes Eppendorf ont été inoculés avec 300 μ L de suspension de *S. cerevisiae* et 300 μ L de suspension de *S. salivarius*. Tous les tubes Eppendorf ont été incubés pendant 24 h à 30°C, en aérobie avec agitation sur agitateur orbital à 1500 rpm. Tous les tests ont été réalisés en double.

3.4. Tests réalisés

3.4.1. Impact de Bucovia sur le nombre de cellules de *S. cerevisiae*

Après incubation en milieu liquide YEP, le contenu des tubes Eppendorf a été remis en suspension au vortex et nous avons recherché la présence de cellules de levures (conidies et spores) au microscope optique à l'objectif x 40 (Olympus BX51, Olympus France, Rungis, France) (Figure 10). Toutes les observations ont été réalisées en double. La lecture des résultats était qualitative, exprimée de – (aucune cellule) à ++ (cellules dans l'inoculum sans inhibiteur).

Figure 10. Microscope optique utilisé pour l'observation des cultures en milieu liquide (x 40) (Olympus BX51, Olympus France, Rungis, France)



3.4.2. Impact de Bucovia sur la taille des cellules de *S. cerevisiae*

Après incubation en milieu liquide YEP et remise en suspension du contenu des tubes Eppendorf, nous avons mesuré la surface des conidies et des spores en présence du produit à tester et des différents inhibiteurs. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel d'imagerie ImageJ. Il s'agit d'un logiciel libre d'accès pour le traitement et l'analyse d'image. Pour cela, un écran et un disque dur étaient reliés au microscope optique et nous avons réalisé les mesures sur 10 clichés.

Toutes les mesures ont été réalisées en double. La lecture des résultats était quantitative, avec la surface des cellules mesurée en μm^2 et exprimée en surface moyenne des cellules par inhibiteur testé.

3.4.3. Impact de Bucovia sur le biofilm formé par *S. cerevisiae* et *S. salivarius*

La lecture des résultats était qualitative, avec une observation des tubes Eppendorf. Nous avons recherché d'un point de vue macroscopique des signes de croissance microbienne dans les tubes, en fonction des inhibiteurs testés : présence d'un trouble, d'un changement de couleur du milieu ou d'un dépôt microbien le long des parois ou au fond du tube.

3.4.4. Rétro-cultures pour vérifier la viabilité de *S. cerevisiae* et/ou de *S. salivarius*

Nous avons ensuite réalisé des subcultures pour rechercher la viabilité de *S. cerevisiae* sur gélose YPDA et la viabilité de *S. salivarius* sur gélose au sang, après contact avec les différents inhibiteurs. La lecture des résultats était de type qualitatif, avec observation macroscopique des colonies : pousse ou absence de pousse, ainsi que densité, taille et aspect des colonies.

4. RESULTATS

4.1. Impact de Bucovia sur la quantité de cellules de *S. cerevisiae*

Nous avons observé au microscope les cultures de *S. cerevisiae* en milieu liquide YEP (Figure 11). Le nombre de cellules observé est évalué ainsi :

- ++ dans l'inoculum sans inhibiteur (nombre important de cellules) ;
- + en présence de Bucovia 0,3 % et d'Eludril 0,3 % (nombre modéré de cellules) ;
- en présence d'escine 0,3 %, amphotéricine B 0,3 % et fluconazole 0,3 % (pas de cellules).

Figure11. Observation de l'inoculum de *Saccharomyces cerevisiae* au microscope optique, incubé pendant 24 h à 30°C en aérobiose, en l'absence d'inhibiteur (x 40, cliché Dr Lilia Hasseine)



4.2. Impact de Bucovia sur la taille des cellules de *S. cerevisiae*

La surface des conidies et des spores en présence du produit à tester et des différents inhibiteurs est détaillée dans le Tableau 8. Un seul test, avec une seule mesure, a été réalisé avec le bain de bouche Eludril. Pour chaque produit testé, la surface moyenne des cellules se répartit ainsi, par ordre décroissant de taille : fluconazole 24,2 à 17,0 μm^2 ; inoculum sans inhibiteur 22,4 à 17,7 μm^2 ; escine 21,2 à 17,7 μm^2 ; amphotéricine B 18,3 à 14,5 μm^2 ; Bucovia 10,8 à 9,5 μm^2 et Eludril 8,3 μm^2 . Sur la seule mesure disponible avec Eludril, il semble que ce soit ce bain de bouche qui réduise le plus la surface des cellules de *S. cerevisiae*, suivi par Bucovia et par l'amphotéricine B.

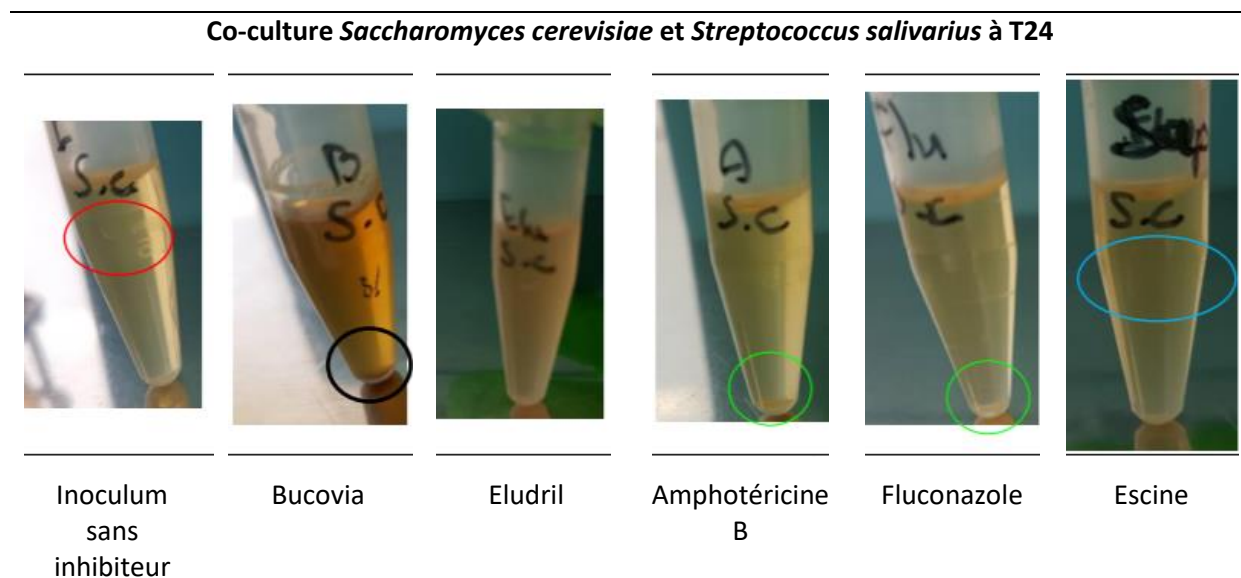
Tableau 8. Surface moyenne des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (conidies et spores), mesurée avec le logiciel ImageJ au microscope optique (x 40). *S. cerevisiae* a été incubé sans inhibiteur (Inoculum), avec Bucovia 0,3% et en présence quatre 4 inhibiteurs à 0,3 % (Eludril, amphotéricine B, fluconazole et escine), pendant 24 h à 30°C. NA : non applicable (test non réalisé)

Surface des cellules de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (conidies et spores) en μm^2 :					
Moyenne \pm					
Variance \pm					
Ecart type					
Inoculum	Bucovia	Eludril	Amphotéricine B	Fluconazole	Escine
Test 1					
1^{ère} mesure					
18,875 \pm	10,701 \pm	8,247 \pm	18,314 \pm	18,250 \pm	18,039 \pm
7,398 \pm	34,890 \pm	11,248 \pm	7,89 \pm	26,876 \pm	27,425 \pm
2,72	5,907	3,354	2,809	5,184	5,237
2^{ème} mesure					
20,942 \pm	10,762 \pm	NA	18,013 \pm	17,039 \pm	21,173 \pm
24,626 \pm	11,006 \pm		33,248 \pm	19,158 \pm	14,137 \pm
4,962	3,318		5,719	4,377	3,76
Test 2					
1^{ère} mesure					
22,409 \pm	9,498 \pm	NA	15,473 \pm	24,207 \pm	17,716 \pm
42,896 \pm	9,79 \pm		23,358 \pm	53,487 \pm	37,068 \pm
6,5	3,143		4,833	7,313	6,089
2^{ème} mesure					
17,693 \pm	10,347 \pm	NA	14,458	16,914 \pm	19,678 \pm
11,804 \pm	3,732 \pm		19,502	17,215 \pm	16,310 \pm
3,436	1,932		4,416	4,149	4,039

4.3. Impact de Bucovia sur le biofilm formé par *S. cerevisiae* et *S. salivarius*

L'aspect macroscopique des co-cultures levures-bactéries en milieu liquide est présenté figure 12. L'inoculum sans inhibiteur présente un trouble dû à la croissance de la levure (*S. cerevisiae*) et/ou de la bactérie (*S. salivarius*). En présence de Bucovia, il y a un dépôt microbien au fond du tube, comme cela a été décrit pour des co-cultures avec *C. albicans* [Chevalier et coll., 2019]. Nous observons également un changement de couleur du milieu, qui devient plus orangé que jaune pâle. Un léger trouble est observé avec Eludril, qui des propriétés antifongiques et antibactériennes. Un petit dépôt est observé au fond des tubes contenant les deux antifongiques. Le fluconazole et l'amphotéricine B ne sont pas des antibiotiques, qui n'empêchent pas la croissance de *S. salivarius*. Enfin, un léger trouble est observé avec l'escine.

Figure 12. Aspect macroscopique des co-cultures levures-bactéries (*Saccharomyces cerevisiae* et *Streptococcus salivarius*) en milieu liquide. Tous les inhibiteurs sont à 0,3 % final. Incubation 24 h en milieu YEP à 30°C, en aérobose, sur agitateur orbital à 1500 rpm



4.4. Rétro-cultures pour vérifier la viabilité de *S. cerevisiae* et de *S. salivarius*

Afin de savoir si la levure ou la bactérie étaient inhibée par les inhibiteurs testés, nous avons réalisé des subcultures pour rechercher la viabilité de *S. cerevisiae* sur gélose YPDA (Figure 13) et la viabilité de *S. salivarius* sur gélose au sang (Figure 14). Les résultats sont détaillés dans le tableau 9.

Figure 13. Recherche de la vitalité de *Saccharomyces cerevisiae* après incubation avec différents inhibiteurs. Subculture sur gélose YPDA pendant 24 h à 30°C, en aérobiose

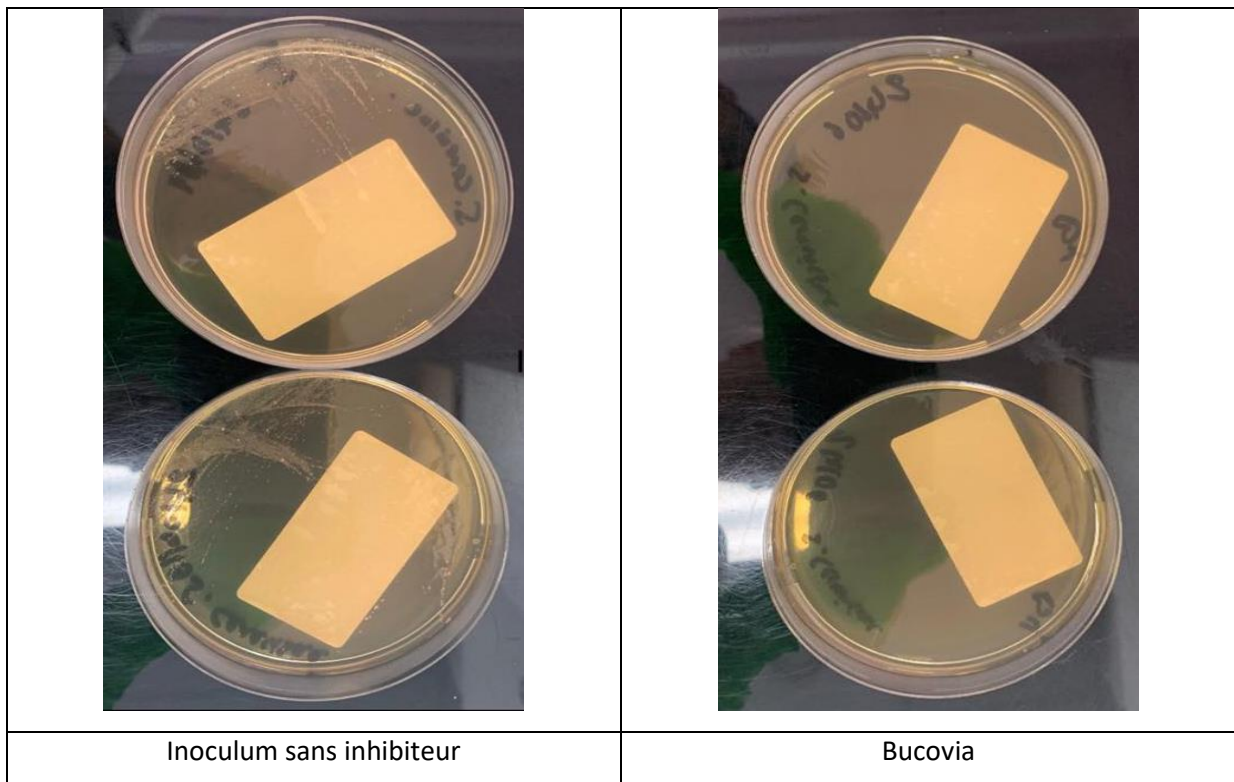


Figure 13 (Fin). Recherche de la vitalité de *Saccharomyces cerevisiae* après incubation avec différents inhibiteurs. Subculture sur gélose YPDA pendant 24 h à 30°C, en aérobose

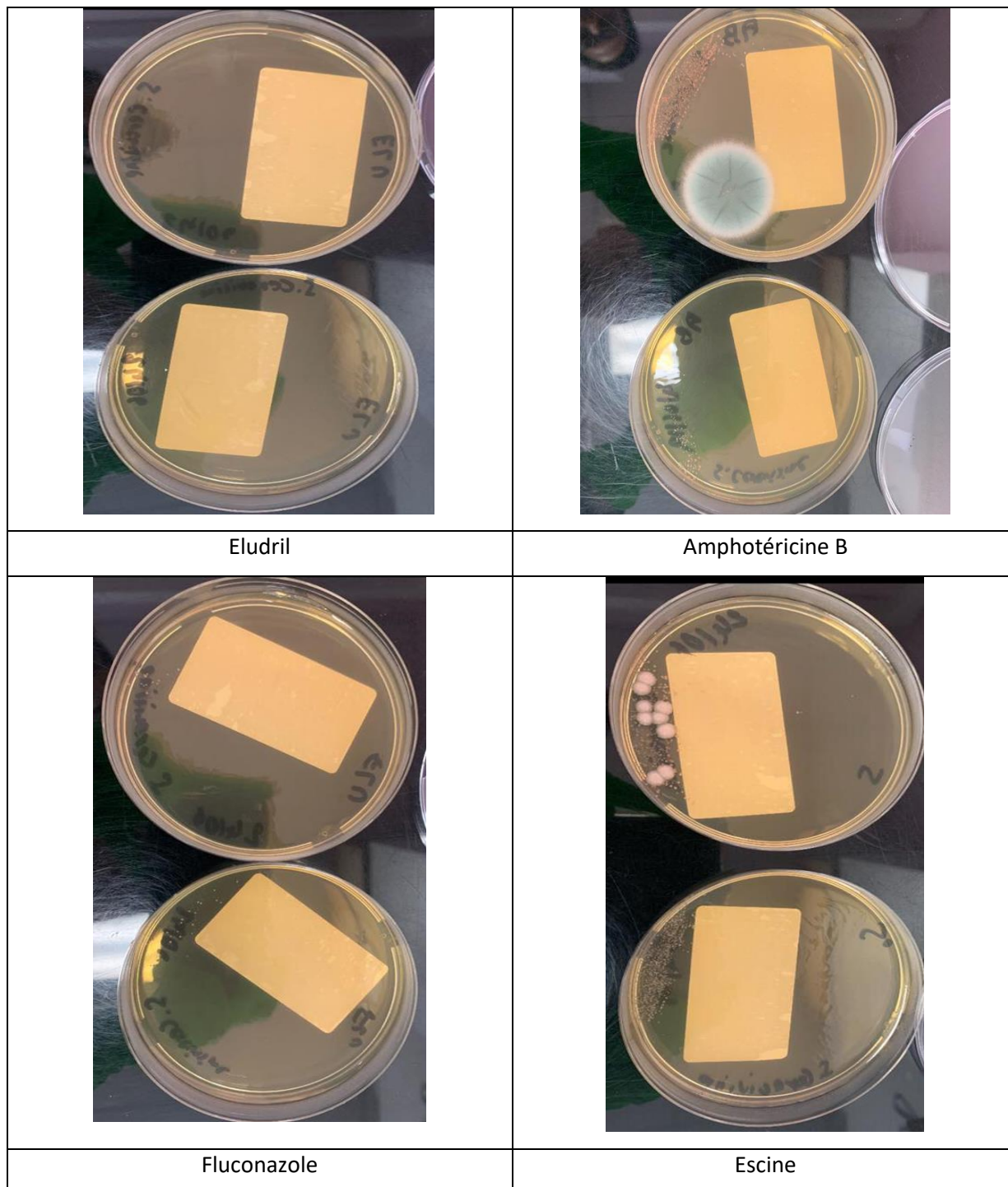


Figure 14. Recherche de la vitalité de *Streptococcus salivarius* après incubation avec différents inhibiteurs. Subculture sur gélose au sang pendant 24 h à 30°C, en aérobose

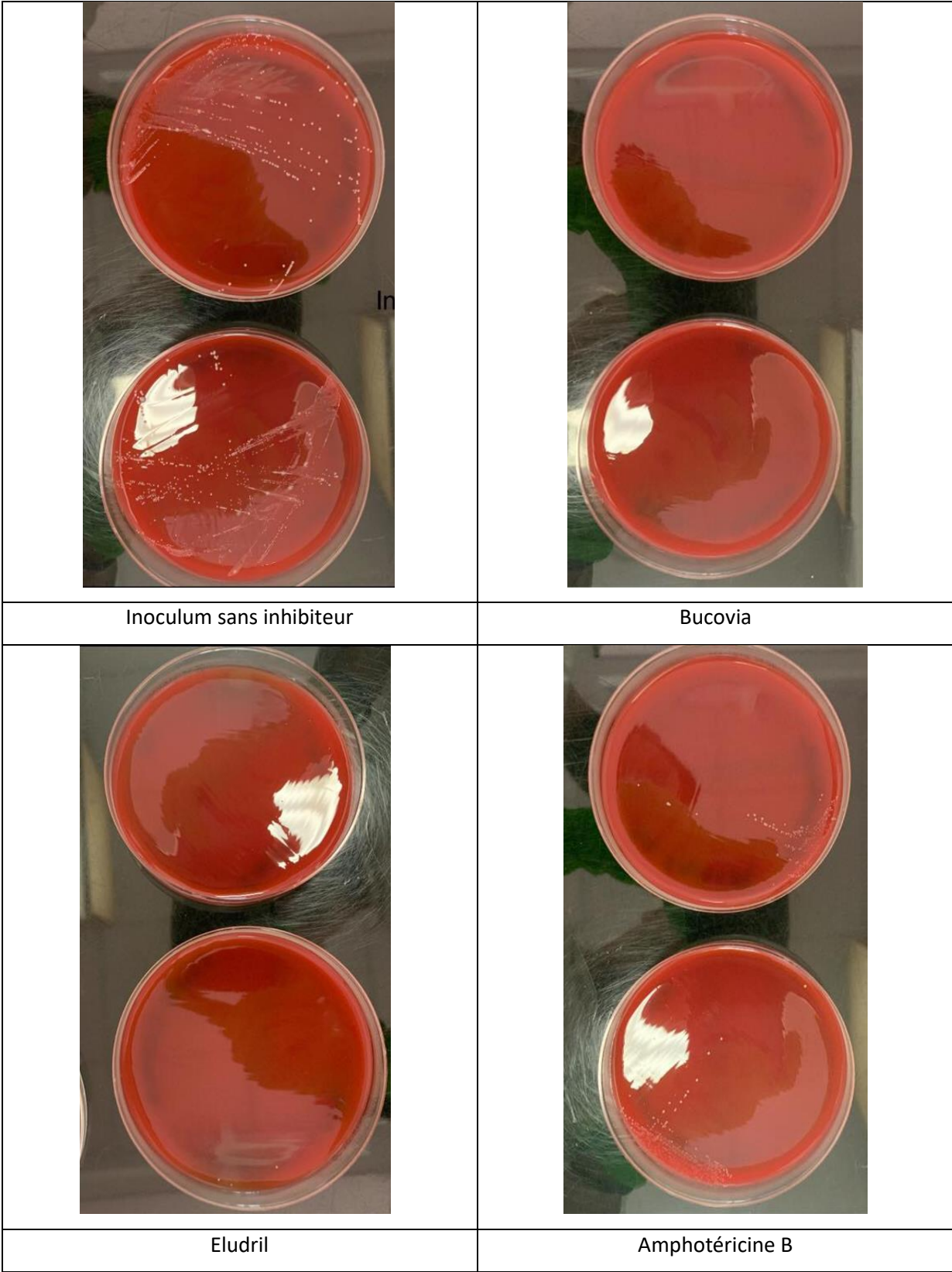


Figure 14 (Fin). Recherche de la vitalité de *Streptococcus salivarius* après incubation avec différents inhibiteurs. Subculture sur gélose au sang pendant 24 h à 30°C, en aérobose

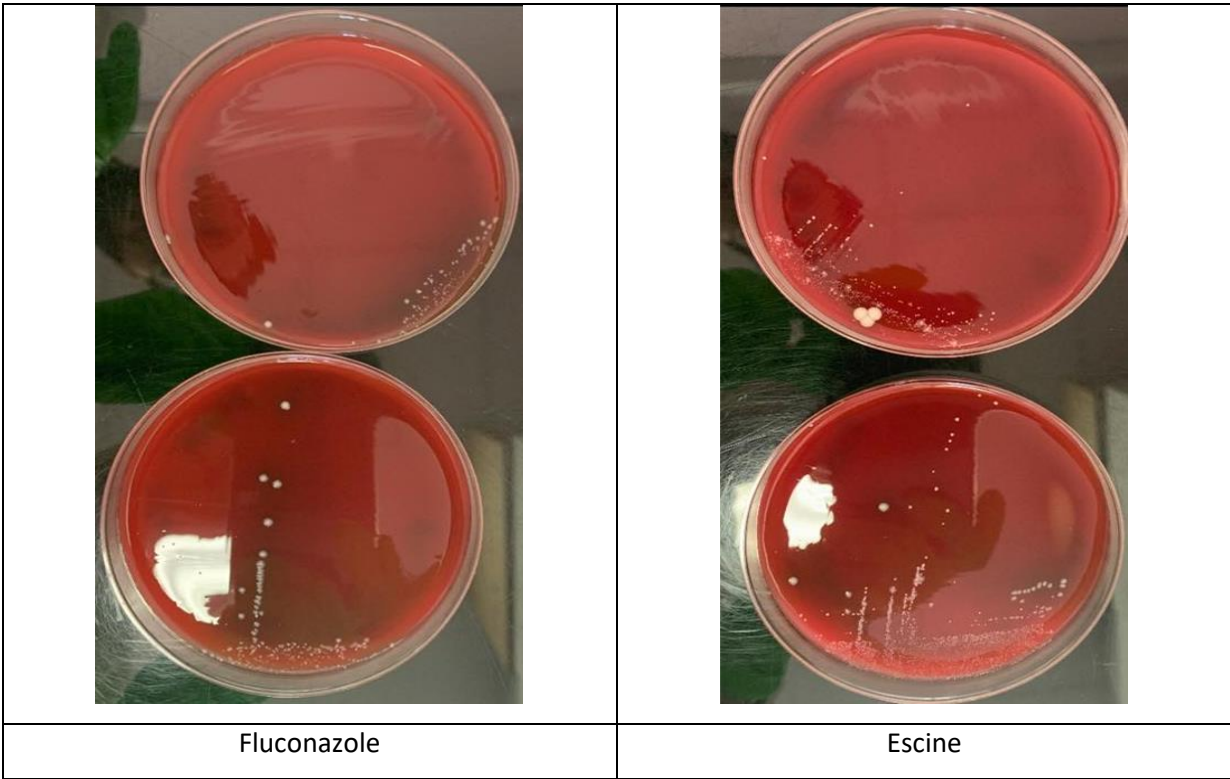


Tableau 9. Vitalité de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Streptococcus salivarius* après incubation avec différents inhibiteurs : subculture sur gélose YPDA et gélose au sang pendant 24 h à 30°C, en aérobiose

Inhibiteurs testés	Culture en milieu liquide	Subculture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur gélose YPDA	Subculture de <i>Streptococcus salivarius</i> sur gélose au sang	Interprétation des résultats
Inoculum	Trouble important	Très nombreuses colonies	Très nombreuses colonies	Forte croissance fongique et bactérienne en l'absence d'inoculum
Bucovia	Dépôt au fond du tube et changement de couleur du milieu (jaune pâle => orangé)	Pas de colonies	Pas de colonies	Croissance fongique et/ou bactérienne mais avec inhibition de l'adhérence aux parois du tube puis inhibition de la croissance fongique et bactérienne dans les subcultures
Eludril	Milieu limpide	Pas de colonies	Très rares colonies	Inhibition fongique totale et inhibition bactérienne très importante
Amphotéricine B	Dépôt au fond du tube	Quelques colonies et un contaminant (moisissure)	Nombreuses colonies	Inhibition fongique importante mais pas d'inhibition de la croissance bactérienne (inhibition de l'adhérence bactérienne aux parois du tube ?) ; n'empêche pas les subcultures bactériennes
Fluconazole	Dépôt au fond du tube	Quelques colonies	Nombreuses colonies	Inhibition fongique importante mais pas d'inhibition de la croissance bactérienne (inhibition de l'adhérence bactérienne aux parois du tube ?) ; n'empêche pas les subcultures bactériennes
Escine	Léger trouble	Nombreuses petites colonies et un contaminant (grosses colonies)	Nombreuses colonies	Inhibition modérée de la croissance bactérienne et fongique, qui n'empêche pas les subcultures

5. DISCUSSION

5.1. Choix des souches microbiennes testées

Les objectifs de cette étude étaient de tester Bucovia sur une espèce fongique, *S. cerevisiae*, seule et en co-culture avec une bactérie représentative du biofilm oral, *S. salivarius*.

Nous avons testé une souche sauvage de *S. cerevisiae* isolée chez un malade à l'hôpital, donc pathogène, et non pas une souche utilisée dans l'industrie alimentaire. En effet, Bucovia avait déjà été testé sur cette souche en monoculture, dans une série portant sur quatre autres levures (*C. albicans* ATCC n°902008, *Candida glabrata* LMA n°901085, *Candida parapsilosis* ATCC n°22019, *C. tropicalis* souche sauvage) et cinq champignons filamenteux (*Aspergillus fumigatus* ATCC n°0204305, *Rhizomucor sp.* souche sauvage, *Penicillium sp.* souche sauvage, *Fusarium sp.* souche sauvage et *Trichophyton rubrum*, souche sauvage) [Varley, 2020].

Pour les co-cultures, nous avons testé *S. salivarius* car c'est un streptocoque très fréquent et qui pousse en aérobiose comme *S. cerevisiae*, à la différence de *S. mutans* qui est micro-aérophile. Notre protocole d'étude pourrait maintenant être étendu à d'autres biofilms mixtes, avec par exemple *S. cerevisiae* ou l'un des champignons cités ci-dessus et d'autres bactéries buccales [Lof et coll., 2017]. Certaines bactéries microaérophiles ou anaérobies strictes ont déjà été testées avec succès en co-culture avec *C. albicans* : *S. mutans*, *Rothia mucilaginoso*, *Gemella haemolysans*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis* [Prêcheur et coll., 2018].

5.2. Choix des inhibiteurs testés

Pour valider l'impact de Bucovia sur *S. cerevisiae* en co-culture avec *S. mutans*, nous avons choisi de le comparer à quatre inhibiteurs: le triclosan (Eludril), deux antifongiques (Amphotéricine B et fluconazole) et un mélange de saponines végétales, l'escine.

Le triclosan est bactéricide et fongicide. C'est l'un des deux composés actifs d'Eludril, avec le gluconate. En France, Eludril est largement utilisé comme bain de bouche c'est pourquoi nous l'avons utilisé comme bain de bouche de référence. Nous ne pouvons pas affirmer que l'effet observé contre *C. cerevisiae* et *S. salivarius* soit dû au triclosan. Cependant, l'objectif était de disposer d'un produit de référence antifongique et antibactérien, et non d'étudier les propriétés anti-*S. cerevisiae* du triclosan. Cieplik et coll. (2019) ont montré que la résistance à la chlorhexidine parmi les bactéries du biofilm oral était un problème émergent [Cieplik^a et coll., 2019]. Cela renforce l'intérêt de développer des produits d'hygiène bucco-dentaire à base détergents végétaux, parce que les détergents altèrent les membranes des cellules microbiennes sans induire de résistance [Cieplik^b et coll., 2019; Schwarz et coll., 2020].

L'amphotéricine B et le fluconazole sont des médicaments antifongiques sans action antibactérienne. Nous les avons utilisés pour observer l'effet macroscopique d'un antifongique pur sur *S. cerevisiae*, seul et en co-culture, en milieu liquide et sur milieu gélosé.

Enfin, l'escine est le détergent végétal de référence à base de saponines, comme Bucovia. Cependant, contrairement à Bucovia, l'escine n'est pas autorisée dans les cosmétiques en contact avec les muqueuses parce qu'elle est trop astringente [Bruneton, 2016]. Nous aurions pu utiliser un autre extrait végétal riche en saponines, autorisé dans l'alimentation et dans les produits d'hygiène bucco-dentaire : *Glycyrrhiza glabra* (L.) (Fabaceae) ou réglisse [Kwon et coll., 2019]. Mais contrairement à l'escine, extraite du marron d'inde, il n'y a pas d'extrait de réglisse inscrit au catalogue des produits chimiques de laboratoire. D'autres extraits végétaux sont aussi proposés comme composés antibactériens et antifongiques pour les produits d'hygiène bucco-dentaire, comme l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Beteche, Cheel) (Myrtaceae), encore appelé arbre à thé ou *Tea tree*, et la résine de *Pistacia lentiscus* (L.) (Anacardiaceae) encore appelé arbre au mastic ou pistachier lentisque [Kokoska et coll., 2019]. Ces extraits végétaux présentent les mêmes limites que la réglisse : ce ne sont pas des produits chimiques purifiés et de qualité agréée pour un usage au laboratoire.

5.3. Méthodes utilisées

Nous avons observé l'impact de *Bucovia* et des inhibiteurs testés au microscope optique (x 40) d'un point de vue uniquement qualitatif. Par manque de temps, nous n'avons pas refait les numérations à la cellule Kova décrites par Varley en 2020. Cela nous aurait permis de confronter les deux séries de résultats [Varley, 2020]. Par contre, nous avons utilisé le logiciel d'imagerie ImageJ pour mesurer la surface des conidies et des spores de *S. cerevisiae* en monoculture, avec ou sans inhibiteur. Nous avons aussi réalisé un modèle de co-culture bactérien-fongique, qui pourrait s'appliquer à d'autres espèces fongiques et bactériennes (voir ci-dessus), et réalisé des sub-cultures pour vérifier la vitalité des souches traitées. Ce travail constitue un apport nouveau à l'étude *in vitro* de *Bucovia*. Un travail plus poussé permettrait d'étudier les gènes de *S. cerevisiae* et de *S. salivarius* inhibés par *Bucovia*, selon le protocole décrit par Chevalier et coll. avec *C. albicans* [Chevalier et coll., 2019].

5.4. Impact de *Bucovia* sur *S. cerevisiae*

5.4.1. Impact de *Bucovia* sur *S. cerevisiae* en mono-culture

Impact de Bucovia sur le nombre de cellules de S. cerevisiae

Nous avons évalué de façon quantitative le nombre de cellules de *S. cerevisiae* après incubation avec *Bucovia* en milieu liquide. Il restait des cellules après 24 h d'incubation, ce qui confirmait que *Bucovia* n'était pas fongicide et n'inhibait pas la croissance de *S. cerevisiae* en milieu liquide.

Cependant, d'une part, contrairement aux résultats obtenus avec *C. albicans*, *Bucovia* semblait légèrement fongistatique contre *S. cerevisiae*. Cette observation doit être confirmée par d'autres tests.

D'autre part, Varley avait observé des cellules bien rondes qui tendaient à s'agglomérer entre elles. Nous avons observé un dépôt au fond des tubes Eppendorf [Varley, 2020]. Ces résultats sont étonnant, car *Bucovia* inhibe l'adhérence des filaments (ou hyphes) de *C. albicans* aux parois des tubes Eppendorf, mais aussi la co-agrégation des filaments de *C. albicans* entre eux et aux bactéries dans les co-cultures [Chevalier et coll., 2012; Prêcheur et coll., 2018]. *Bucovia* n'aurait pas le même mode d'action contre *C. albicans* et *S. cerevisiae* : encore une fois, un travail plus poussé permettrait de comparer les gènes de *S. cerevisiae* et de *C. albicans* inhibés par *Bucovia* [Chevalier et coll., 2019].

Impact de Bucovia sur la taille des cellules de S. cerevisiae

Eludril était l'inhibiteur qui réduisait le plus la surface des cellules de *S. cerevisiae*, suivi par Bucovia et par l'amphotéricine (Tableau 8). Ce résultat pourrait être rapproché de l'action de Bucovia sur *C. albicans* : Bucovia diminuait beaucoup la surface des cellules, en inhibant la conversion levure filament. Cependant, le mécanisme impliqué au niveau génétique ne peut être comparable et reste à élucider [Chevalier et coll., 2019].

5.4.2. Impact de Bucovia sur *S. cerevisiae* en co-culture avec *S. salivarius*

Bucovia a eu un impact visible sur le biofilm bactérien-fongique, comparé à l'inoculum sans inhibiteur. Bucovia a permis la croissance fongique et/ou bactérienne, mais en inhibant l'adhérence aux parois du tube pour former un culot. Dans un second temps, Bucovia a indirectement inhibé la croissance bactérienne et fongique dans les subcultures. Autrement dit, Bucovia a déstabilisé le biofilm mixte bactérien-fongique, qui n'a pas pu se former et les cellules le composant sont tombées au fond du tube. La croissance des cellules altérées par Bucovia n'a pas pu repartir sur milieu gélosé, même après arrêt de l'exposition directe à Bucovia. Ces deux propriétés de Bucovia en font un actif prometteur dans les produits destinés à contrôler la prolifération des biofilms contenant *S. cerevisiae* et d'autres bactéries. D'autres modèles de biofilms mixtes sont à tester.

5.4.3. Impact des autres inhibiteurs testés sur *S. cerevisiae* en mono- et en co-culture

Varley en 2020 a testé trois inhibiteurs contre *S. cerevisiae* en mono-culture en milieu liquide, pendant 24 h d'incubation : Eludril, le fluconazole et l'escine. Avec Eludril, elle a observé peu d'inhibition de croissance, mais les cellules étaient altérées, très petites et difficiles à compter. Nous avons aussi observé une inhibition dans les cultures en milieu liquide et dans les subcultures sur milieu solide. Avec le fluconazole, nous avons observé comme elle une inhibition fongique en milieu liquide, puis dans les subcultures sur milieu solide. Enfin, elle a observé que l'escine était le produit le plus inhibiteur contre *S. cerevisiae*. Nous n'avons observé d'une inhibition modérée en milieu liquide, qui n'empêchait pas la croissance dans les subcultures en milieu solide [Varley, 2020]. Une troisième série de tests permettrait de mieux comprendre l'action de ces différents inhibiteurs sur *S. cerevisiae*, seul et en co-culture.

5.5. Perspectives

Ce travail a montré que Bucovia déstabilisait le biofilm mixte bactérien-fongique formé par *S. cerevisiae* et *S. salivarius* en milieu liquide : le biofilm ne pouvait pas se former et les cellules tombaient au fond des tubes. Bucovia a aussi inhibé *S. cerevisiae* et *S. salivarius* dans des subcultures sur milieux gélosés, même après l'exposition directe à Bucovia.

Pour des applications de recherche, le mécanisme d'action de Bucovia sur *S. cerevisiae* au niveau moléculaire reste à élucider. En effet, Bucovia inhibe la conversion levure-filament de *C. albicans*, mais *S. cerevisiae* est une levure qui ne forme pas de filaments dans les conditions usuelles de croissance. D'autres modèles de biofilms mixtes sont aussi à tester, avec d'autres espèces fongiques et d'autres bactéries buccales et cutanées.

Pour des applications pratiques, la déstabilisation du biofilm et l'inhibition des subcultures sont deux propriétés importantes. Bucovia est un actif prometteur dans des produits cosmétiques "verts" biodégradables, destinés à contrôler la prolifération des biofilms contenant *S. cerevisiae* et d'autres bactéries.

6. CONCLUSIONS

1. Ce travail s'inscrit dans le projet global de faciliter la R&D de nouveaux actifs "verts", biodégradables, pour les produits hygiène bucco-dentaire. Des études préliminaires ont montré qu'un extrait d'une plante, *Solidago virgaurea* (Bucovia™) inhibait les biofilms mixtes bactériens-fongiques formés avec une levure, *Candida albicans*, et des bactéries buccales. Cet extrait végétal est par définition biodégradable.

2. Ce travail était une mise au point technique, en vue d'autres co-cultures bactério-fongiques pour d'autres applications de Bucovia, par exemple en dermatologie pour des cosmétiques "verts".

3. Bucovia n'avait encore jamais été testé sur une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, en co-culture avec une souche bactérienne. Nous avons testé un modèle de biofilm mixte bactérien-fongique avec *S. cerevisiae* et *Streptococcus salivarius*, une bactérie représentative du biofilm oral.

4. Nous avons réalisé des cultures en milieu liquide YEP (*yeast-peptone-extract*) et mesuré la surface des cellules de *S. cerevisiae* avec le logiciel d'imagerie ImageJ. Bucovia n'a pas inhibé pas la croissance de *S. cerevisiae*, mais il a diminué la taille des cellules.

5. En co-cultures en milieu YEP, Bucovia a favorisé le dépôt de *S. cerevisiae* et de *S. salivarius* au fond des tubes : il a déstabilisé le biofilm mixte bactérien-fongique, qui n'a pas pu se former. Ces résultats sont similaires à ceux observés avec *C. albicans*, bien que *S. cerevisiae* ne filamente pas en milieu YEP.

6. Bucovia a inhibé *S. cerevisiae* et *S. salivarius* dans des subcultures sur milieux gélosés, même après l'exposition directe à Bucovia. Les subcultures sont une originalité de ce travail.

7. Au niveau moléculaire, Bucovia inhibe la conversion levure-filament de *C. albicans*. Le mécanisme d'action de Bucovia sur *S. cerevisiae* reste à élucider car cette levure ne forme pas de filaments. D'autres modèles de biofilms mixtes sont à tester.

8. Déstabilisation du biofilm et inhibition des subcultures : ces deux propriétés de Bucovia en font un actif prometteur dans des produits cosmétiques "verts" biodégradables, destinés à contrôler la prolifération des biofilms contenant *S. cerevisiae* et d'autres bactéries.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. Biology of oral streptococci. *Microbiol Spectr.* 2018 Oct;6(5):10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.

Afennich F, Slot DE, Hossainian N, Van der Weijden GA. The effect of hexetidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *International Journal of Dental Hygiene* 2011;9:182-190. doi: 10.1111/j.1601-5037.2010.00478.x.

Alfhili MA, Lee MH. Triclosan: an update on biochemical and molecular mechanisms. *Oxydative Medicine and Cellular Longevity.* 2019 May 2;2019:1607304. doi: 10.1155/2019/1607304. eCollection 2019.

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.

Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiota. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2016;902:45-60. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4_4.

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.

Aumeran C, Balestrino D, Forestier C. Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'Environnement.* [en ligne ISSN 2555-0950] url : [https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/biofilms-bacteriens/.](https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/biofilms-bacteriens/) (Consulté le 15 janvier 2021).

Batiha GE, Alkazmi LM, Wasef LG, Beshbishy AM, Nadwa EH, Rashwan EK. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules.* 2020 Jan 30;10(2):202. doi: 10.3390/biom10020202.

Bedoux G, Roig B, Thomas O, Dupont V, Le Bot B. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research International* 2012;19:1044-1065.

Bouchara JP, Pihet M, de Gentile L, Cimon B, Chabasse D. Les levures et levuroses. *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 in Microbiology* 2018, 26, 229-242. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008.

Bruneton J. *Phytopharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales.* Editions TEC & DOC, éditions médicales internationales, Paris 5^{ème} édition 2016.

Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Maillard JY, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future Microbiol* 2016;11:81-92. doi: 10.2217/fmb.15.131.

Chevalier M, Doglio A, Rajendran R, Ramage G, Prêcheur I, Ranque S. Acute inhibition of adhesion-specific genes by *Solidago virgaurea* plant extract causes loss of *Candida albicans* biofilm integrity. *Journal of Applied Microbiology* 2019; 127:68-77. doi: 10.1111/jam.14289.

Chevalier M, Médioni E, Prêcheur I. Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extract. *Journal of Medical Microbiology* 2012;61:1016-1022.

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

Cieplik^a F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria – Is there cause for concern? *Frontiers in Microbiology.* 2019 Mar 22;10:587. doi: 10.3389/fmicb.2019.00587. eCollection 2019.

Cieplik^b F, Kara E, Muehler D, Enax J, Hiller KA, Maisch T, Buchalla W. Antimicrobial efficacy of alternative compounds for use in oral care toward biofilms from caries-associated bacteria in vitro. *Microbiologyopen.* 2019 Apr;8(4):e00695. doi: 10.1002/mbo3.695.

Clarke BO, Smith SR. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* 2011;37:226-247.

Dann AB, Hontela A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology* 2011;31:285-311.

Dehsheikh AB, Sourestani MM, Dehsheikh PB, Mottaghipisheh J, Vitalini S, Iriti M. Monoterpenes: essential oil components with valuable features. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2020;20:958-974. doi: 10.2174/1389557520666200122144703.

Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2018;98:833-848. doi: 10.1002/jsfa.8600.

Dinwiddie MT, Terry PD, Chen J. Recent evidence regarding triclosan and cancer risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2014;11:2209-2217.

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 Pathogens* 2010, Jan 8;6(1):e1000713. doi: 10.1371/journcoll.ppat.1000713.

Institut national de recherche et de sécurité (INRS). Perturbateurs endocriniens. Santé et sécurité au travail 2020 www.inrs.fr/risques/perturbateurs-endocriniens (site consulté le 15 février 2021).

Jaric S, Mitrovic M, Pavlovic P. Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM. 2015;2015:101978. doi: 10.1155/2015/101978.

Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. Drug Discovery Today. Technologies 2014;11:49-56. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.003.

Jouhten P, Ponomarova O, Gonzalez R, Patil KR. *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context. FEMS Yeast Research. 2016 Nov;16(7):fow080. doi: 10.1093/femsyr/fow080.

Kokoska L, Kloucek P, Leuner O, Novy P. Plant-derived products as antibacterial and antifungal agents in human health care. Current Medicinal Chemistry. 2019;26:5501-5541. doi: 10.2174/0929867325666180831144344.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR. 2002;66:486-505. doi: 10.1128/membr.66.3.486-505.2002.

Kuang X, Chen V, Xu X. Novel approaches to the control of oral microbial biofilms. BioMed Research International. 2018 Dec 31;2018:6498932. doi: 10.1155/2018/6498932.

Kwon YJ, Son DH, Chung TH, Lee UJ. A review of the pharmacological efficacy and safety of licorice root from corroborative clinical trials findings. Journal of Medicinal Food 2020;23:12-20. doi: 10.1089/jmf.2019.4459.

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.

Lee JD, Lee JY, Kwack SJ, Shin CY, Jang HJ, Kim HY, Kim MK, Seo DW, Lee BM, Kim KB. Risk assessment of triclosan, a cosmetic preservative. Toxicology Research. 2019;35:137-154. doi: 10.5487/TR.2019.35.2.137.

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. Advances in Dental Research 2018;29:86-92. doi: 10.1177/0022034517736497.

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

Madeswaran S, Jayachandran S. Sodium bicarbonate: a review and its uses in dentistry. Indian Journal of Dental Research. 2018;29:672-677. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_30_17.

Manamsa K, Crane E, Stuart M, Talbot J, Lapworth D, Hart A. A national-scale assessment of micro-organic contaminants in groundwater of England and Wales. *Sci total Environ* 2016;568:712-726. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.017.

Mao X, Auer DL, Buchalla W, Hiller KA, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A, Cieplik F. Cetylpyridium chloride: mechanism of action, antimicrobial efficacy in biofilms, and potential risks of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2020 Jul 22;64(8):e00576-20. doi: 10.1128/AAC.00576-20.

Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology* 2017;44 Suppl 18:S12-S22. doi: 10.1111/jcpe.12679.

Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. *Journal of Periodontology* 1995;66:786-796. doi: 10.1902/jop.1995.66.9.786.

Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFFEP). Détermination simple des COD et COT dans les eaux usées. Suisse. Information concernant la protection des eaux, n°28 référence MGS-28-F :
<https://www.bafu.admin.ch/bafu/fr/home/themes/eaux/publications/publications-eaux/determination-simple-cod-cot-eaux-usees.html>

Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung*. 2001;51:588-595. doi: 10.1055/s-0031-1300084.

Prêcheur I. Cours de pharmacologie, 2021. Faculté de Chirurgie-Dentaire, Université Côte d'Azur, Nice.

Prêcheur I, Rolland Y, Hasseine L, Orange F, Morisot A, Landreau A. Solidago virgaurea plant extract targeted against *Candida albicans* hyphae formation to reduce oral biomass: a double blind randomized trial. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Mar 25;9(4). pii: E137. doi: 10.3390/antibiotics9040137.

Prêcheur I, Rolland Y, Lavaud A. Oral microbial load reduction through inhibition of *Candida* hyphal formation. *International Association for Dental Research IADR AADR/CADR*. Fort Lauderdale, U.S.A, March 21-24, 2018.

Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of microbiology and biotechnology* 2017;27:429-438. doi: 10.4014/jmb.1608.08024.

Schwarz SR, Hirsch S, Hiergeist A, Kirschneck C, Muehler D, Hiller KA, Maisch T, Al-Ahmad A, Gessner A, Buchalla W, Cieplik F. Limited antimicrobial efficacy of oral care antiseptics in microcosm biofilms and phenotypic adaptation of bacteria upon repeated exposure. *Clinical Oral Investigations* 2020 Oct 8. doi: 10.1007/s00784-020-03613-w.

Tezel U, Pavlosthathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* 2015;33:296-304. doi: 10.1016/j.copbio.2015.03.018.

Urban MV, Rath T, Radtke C. Hydrogen peroxide (H₂O₂): a review of its use in surgery. *Wiener medizinische Wochenschrift*. 2019 Jun;169(9-10):222-225. doi: 10.1007/s10354-017-0610-2.

Varley J. Le mycobiote oral : techniques de culture des principales espèces fongiques cultivables. Thèse d'exercice en chirurgie-dentaire. Faculté de chirurgie-dentaire de Nice, Université Côte d'Azur, n°42-57-20-27, Nice 2020.

Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*, 2012;61:399-419.

Vergara-Buenaventura A, Castro-Ruiz C. Use of mouthwashes against COVID-19 in dentistry. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 2020;58:924-927. doi: 10.1016/j.bjoms.2020.08.016.

Von der Ohe PC, Schmitt-Jansen M, Slobodnik J, Brack W. Triclosan – the forgotten priority substance? *Environmental Science and Pollution Research International* 2012;19:585-591.

Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2015;1:44-61. doi: 10.1556/EUJMI-D-14-00038.

Weatherly LM, Gosse JA. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 2017;20:447-469. doi: 10.1080/10937404.2017.1399306.

Westcombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol.* 2012;7:1355-1371. doi: 10.2217/fmb.12.113.

Wessels S, Ingmer H. Modes of action of three disinfectant active substances: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2013;67:456-467.

Witorsch RJ. Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. *Critical Reviews in Toxicology* 2014;44:535-555.

Zhang C, Cui F, Zeng GM, Jiang M, Yang ZZ, Yu ZG, Zhu MY, Shen LQ. Quaternary ammonium compounds (QACs): a review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *The Science of the Total environment* 2015;518-519:352-362. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.007.

8. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales caractéristiques des biofilms oraux, et exemples de bactéries cultivables isolées <i>in vivo</i> [D'après Chevalier et coll., 2018]	15
Tableau 2. Principes actifs antiseptiques des cosmétiques destinés à l'hygiène bucco-dentaire, commercialisés en France dans les pharmacies d'officine (Février 2021)	19
Tableau 3. Principales huiles essentielles antiseptiques utilisées dans les produits d'hygiène bucco-dentaire	27
Tableau 4. Emplois des phytomédicaments à base de thym, d'eucalyptus et de clou de girofle [D'après Bruneton, 2016]	29
Tableau 5. Antiseptiques de synthèse utilisés dans les produits d'hygiène bucco-dentaire. Ils sont peu biodégradables dans l'environnement	31
Tableau 6. Caractères cultureux et microscopiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D'après Bouchara et coll., 2010)	40
Tableau 7. Composition du bain de bouche Eludril™ (Pierre Fabre, Castres, France)	42
Tableau 8. Surface moyenne des cellules de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (conidies et spores), mesurée avec le logiciel ImageJ au microscope optique (x 40). <i>S. cerevisiae</i> a été incubé sans inhibiteur (Inoculum), avec Bucovia 0,3% et en présence quatre 4 inhibiteurs à 0,3 % (Eludril, amphotéricine B, fluconazole et escine), pendant 24 h à 30°C.	50
Tableau 9. Vitalité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et de <i>Streptococcus salivarius</i> après incubation avec différents inhibiteurs : subculture sur gélose YPDA et sur gélose au sang pendant 24 h à 30°C, en aérobiose	56

9. LISTE DES FIGURES

Figure 1. Formation d'un biofilm	13
Figure 2. Bactéries du biofilm oral	14
Figure 3. <i>Solidago virgaurea alpestris</i> , en période de floraison (environ 15 juillet - 15 août, à 2000 m d'altitude)	37
Figure 4. Formule chimique des saponines de <i>Solidago virgaurea ssp. alpestris</i> (L.) (D'après Laurençon et coll., 2013)	38
Figure 5. Formule chimique de l'amphotéricine B (D'après sigmaaldrich.com)	43
Figure 6. Formule chimique du fluconazole (D'après sigmaaldrich.com)	43
Figure 7. Formule du principal composé de l'escine (C ₅₅ H ₈₆ O ₂₄ avec des isomères) (D'après sigmaaldrich.com)	44
Figure 8. Poste de sécurité microbiologique pour les manipulations des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et de <i>Streptococcus salivarius</i> (PSM, Thermo Fisher Scientific France, Dardilly, France)	44
Figure 9. Etuve utilisée pour incuber les cultures à 30°C (Firlabo, Froilabo, Meyzieu, France)	45
Figure 10. Microscope optique utilisé pour l'observation des cultures en milieu liquide (x 40) (Olympus BX51, Olympus France, Rungis, France)	47
Figure 11. Observation de l'inoculum de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> au microscope optique, incubé pendant 24 h à 30°C en aérobiose, en l'absence d'inhibiteur (x 40)	49
Figure 12. Aspect macroscopique des co-cultures levures-bactéries (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Streptococcus salivarius</i>) en milieu liquide. Incubation 24 h en milieu YEP à 30°C, en aérobiose, sur agitateur orbital à 1500 rpm	51
Figure 13. Vitalité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> après incubation avec différents inhibiteurs. Subculture sur gélose YPDA pendant 24 h à 30°C, en aérobiose	52
Figure 14. Vitalité de <i>Streptococcus salivarius</i> après incubation avec différents inhibiteurs. Subculture sur gélose au sang pendant 24 h à 30°C, en aérobiose	54

Lamjed KABOUBI

**VALIDATION D'UN ANTISEPTIQUE BIODEGRADABLE :
ETUDE IN VITRO D'UN EXTRAIT DE *SOLIDAGO
VIRGAUREA* SUR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Thèse : Chirurgie Dentaire, Nice, 2021, n°42-57-21-18

Directeur de thèse : Madame le Professeur Isabelle PRECHEUR-SABLAYROLLES

Mots-clés : biofilm, inhibiteur, in vitro, *Saccharomyces cerevisiae*, *Solidago virgaurea*, *Streptococcus salivarius*

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le projet global de faciliter la R&D de nouveaux actifs "verts", biodégradables, pour les produits d'hygiène bucco-dentaire. Des études préliminaires ont montré qu'un extrait d'une plante, *Solidago virgaurea* (Bucovia™) inhibait les biofilms mixtes bactériens-fongiques formés avec une levure, *Candida albicans*, et des bactéries buccales. Cet extrait végétal est par définition biodégradable. Ce travail était une mise au point technique, en vue d'autres co-cultures bactério-fongiques pour d'autres applications de Bucovia, par exemple en dermatologie pour des cosmétiques "verts". Nous avons testé un modèle de biofilm mixte avec une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, et une bactérie représentative du biofilm oral, *Streptococcus salivarius*. Nous avons réalisé des cultures en milieu liquide et mesuré la surface des cellules de *S. cerevisiae* avec le logiciel d'imagerie ImageJ. Bucovia n'a pas inhibé pas la croissance de *S. cerevisiae*, mais il a diminué la taille des cellules. En co-culture, Bucovia a favorisé le dépôt de *S. cerevisiae* et de *S. salivarius* au fond des tubes et inhibé les subcultures sur milieux gélosés, même après l'exposition directe à Bucovia. Les subcultures sont une originalité de ce travail. Au niveau moléculaire, le mécanisme d'action de Bucovia reste à élucider. En conclusion, la déstabilisation du biofilm et l'inhibition des subcultures sont deux propriétés intéressantes de Bucovia. Cet actif est prometteur dans des cosmétiques "verts" biodégradables, destinés à contrôler la prolifération des biofilms contenant *S. cerevisiae* et d'autres bactéries.