

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

2022

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 23 Mars 2022 à POITIERS
par Madame TOURNEUR Cloé
née le 12/05/1994

Les lichens et leurs champignons associés : une nouvelle source de composés actifs
contre les biofilms de *Candida albicans*

Composition du jury :

Président : Madame la Professeure IMBERT Christine

Membre : Monsieur GENOUEL Fabrice, Docteur en Pharmacie

Directrice de thèse : Madame Marion GIRARDOT, Maître de conférences



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, PU, chimie thérapeutique
- COUET William, PU-PH, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, PU-PH, pharmacie clinique
- FAUCONNEAU Bernard, PU, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, PU, pharmacochimie
- IMBERT Christine, PU, parasitologie
- MARCHAND Sandrine, PU-PH, pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, PU, galénique
- PAGE Guylène, PU, biologie cellulaire
- RABOUAN Sylvie, PU, chimie physique, chimie analytique
- RAGOT Stéphanie, PU-PH, santé publique
- SARROUILHE Denis, PU, physiologie
- SEGUIN François, PU, biophysique, biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, MCU-PH, immunologie-hématologie
- BARRIER Laurence, MCU, biochimie
- BINSON Guillaume, MCU-PH, pharmacie clinique
- BODET Charles, MCU, bactériologie (HDR)
- BON Delphine, MCU, biophysique
- BRILLAULT Julien, MCU, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, MCU, microbiologie,
- CHARVET Caroline, MCU, physiologie
- CHAUZY Alexia, MCU, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, MCU, sciences physico-chimiques
- DELAGE Jacques, MCU, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, MCU, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)

- GIRARDOT Marion, MCU, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, MCU, pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, MCU, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, MCU, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, MCU, pharmacochimie
- PAIN Stéphanie, MCU, toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, MCU, biochimie
- THEVENOT Sarah, MCU-PH, hygiène et santé publique
- TEWES Frédéric, MCU, chimie et pharmacochimie
- THOREAU Vincent, MCU, biologie cellulaire
- WAHL Anne, MCU, chimie analytique

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

A.T.E.R. (attaché temporaire d'enseignement et de recherche)

- MIANTEZILA BASILUA Joe, épidémiologie et santé publique

Enseignant d'anglais

- DEBAIL Didier

Remerciements

Au **Dr Marion Girardot**, je vous remercie d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse, de m'avoir encadrée tout au long de celle-ci. Je vous remercie encore pour votre disponibilité et votre bienveillance concernant mes questions, toutes les relectures et corrections, ainsi que tout au long de mes études au sein de l'université de Poitiers.

Au **Pr Christine Imbert**, pour avoir accepté de présider ce jury mais également pour toute votre bienveillance durant mes études au sein de l'université de Poitiers.

A l'équipe de la pharmacie de Villeneuve, en particulier au **Dr Sylvie Guillou et au Dr Fabrice Genouel**, de m'avoir si bien accueillie au sein de l'équipe et de m'avoir accordé votre confiance. Merci à vous d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

A l'équipe de la pharmacie de l'Olivier, de m'avoir tant appris lors de mon stage. Merci encore pour toute cette bienveillance et patience malgré une période qui aura été très difficile pour tous, je ne garde que de bons souvenirs de mon dernier stage officinal grâce à vous.

A mes parents, d'avoir été d'un soutien incommensurable depuis le début. Merci d'avoir été présents lors de mes échecs, lors de mes doutes, lors de mes réussites. Merci d'avoir été de si bons conseils, d'avoir supporté mes crises, et de n'avoir jamais douté de moi. Un remerciement spécial pour toi maman, qui a accepté (avec grande joie) de relire et corriger les fautes de ce manuscrit.

A ma sœur, qui a toujours été présente pour moi. Merci d'avoir été toujours fière de moi, quels que soient mes résultats. Merci d'avoir supporté 8 ans de stress et 4 concours sans jamais rien dire. Merci d'avoir été là, tout simplement.

A ma famille, mes grands-parents, mes oncles et tantes, ma cousine : merci à vous tous d'avoir été là pour moi, à m'écouter me plaindre la plupart du temps. Merci pour tout.

A ma grand-mère, **Jacqueline**. Je sais que tu aurais été contente de voir s'aboutir toutes ces années d'études. Je pense à toi.

A mes amis de longue date, d'avoir suivi de près ou de loin la rédaction de cette thèse, mais également de m'avoir accompagnée et soutenue depuis toujours.

A vous, Pauline, Valentine, Camille, Calypso et Erol, d'avoir fait de ces années des souvenirs inoubliables. A nos nocturnes BU, nos partiels ratés, nos révisions en octogone, nos fous rires sincères et nerveux, nos soirées traquenards. Merci d'avoir été là et d'avoir rendu tout plus facile.

Un remerciement supplémentaire pour toi Pauline, pour m'avoir aidé dans la relecture et les quelques articles introuvables !

A toi Susan, d'avoir été d'un soutien sans faille. Pour toutes nos longues journées de révisions, nos concours, nos années de fin d'études passées ensemble : merci d'avoir été présente, et de l'être encore après tout ça. Je suis heureuse de te compter parmi mes amis.

Et enfin, **à toi Logan**, d'avoir été un pilier moral pendant toutes ces années. De fêter avec moi mes réussites et de me reconforter dans mes échecs. D'avoir été toujours compréhensif et de m'avoir soutenue quels que soient mes choix. Merci d'avoir été là et d'être encore là aujourd'hui. A nos 10 années passées, et aux prochaines à venir.

Sommaire

INTRODUCTION	6
GENERALITES	9
I. Le genre <i>Candida</i>	10
A. Épidémiologie	10
B. Morphologie et reproduction	11
C. Physiopathologie et clinique	15
a. Les candidoses superficielles	15
(1) Les candidoses cutanées	15
(2) Les candidoses unguéales (onyxis et périonyxis)	16
(3) Les candidoses anales	17
b. Les candidoses des muqueuses	17
(1) Les candidoses oropharyngées	17
(2) Les candidoses digestives	19
(a) La candidose œsophagienne	19
(b) Les candidoses gastro-intestinales	19
(3) Les candidoses génitales	20
(a) La candidose vulvo-vaginale	20
(b) La balanite	20
(4) Les candidoses urinaires	21
(a) La cystite à <i>Candida</i>	21
(b) La pyélonéphrite à <i>Candida</i>	21
(5) Les candidoses oculaires	21
(6) Les candidoses pulmonaires et bronchiques	21
c. Les candidoses profondes	22
(1) Les candidoses systémiques	22
(2) Les candidoses hépatospléniques	22
D. Traitements existants	23
a. Les azolés	23
b. Les polyènes	26
c. Les antimétabolites	29
d. Les échinocandines	31
e. Les allylamines	34
II. Biofilm à <i>C. albicans</i>	35

A.	Définition d'un biofilm	35
B.	Épidémiologie des biofilms à <i>C. albicans</i>	35
C.	Cycle de vie du biofilm de <i>C. albicans</i>	36
a.	Première phase : l'adhérence.....	38
b.	Deuxième phase : le développement	38
c.	Troisième phase : la maturation	39
d.	Quatrième phase : le détachement.....	39
D.	Résistances induites par le mode de vie biofilm	39
E.	Traitements utilisés contre le biofilm de <i>Candida albicans</i>	42
III.	Les lichens.....	42
A.	Définition.....	42
B.	Les lichens : une source de composés d'intérêt	43
C.	Les lichens étudiés.....	44
a.	<i>Evernia prunastri</i>	44
b.	<i>Nephroma laevigatum</i>	45
c.	<i>Lasallia pustulata</i>	46
d.	<i>Cladonia uncialis</i>	48
e.	<i>Pleurosticta acetabulum</i>	49
IV.	Les micro-organismes associés aux lichens.....	52
A.	Une diversité microbienne associée	52
B.	Les bactéries associées aux lichens	52
C.	Les champignons endolichéniques.....	53
D.	Les champignons endolichéniques issus des lichens <i>E. prunastri</i> et <i>N. laevigatum</i>	55
<i>PARTIE EXPERIMENTALE</i>		57
I.	Travaux antérieurs et objectifs.....	58
II.	Matériels et méthodes	59
A.	Extraits et composés issus de lichens et de champignons endolichéniques	59
B.	Evaluation de l'activité anti-développement du biofilm de <i>C. albicans</i>	60
a.	Organisme et conditions de culture	60
(1)	Souche utilisée	60
(2)	Conditions de culture	60
b.	Préparation du fluide buccal	60
c.	Test anti-développement	60
C.	Évaluation de l'activité hémolytique.....	62
III.	Résultats.....	64

A.	Activité anti-développement du biofilm de <i>C. albicans</i>	64
a.	Extraits du lichen <i>Nephroma laevigatum</i>	64
b.	Extraits du champignon endophyte <i>Sordaria fimicola</i>	65
c.	Extraits des champignons endophytes <i>Nemania sp.</i>	66
d.	Composés lichéniques isolés	67
B.	Activité hémolytique	68
IV.	Discussion et perspectives.....	68
a.	Extraits du lichen <i>Nephroma laevigatum</i>	68
b.	Extraits des champignons endophytes <i>Sordaria fimicola</i> et <i>Nemania sp.</i>	69
c.	Évaluation des activités anti développement et hémolytique des composés lichéniques isolés	70
	<i>CONCLUSION</i>.....	72

Liste des abréviations

CIVD : Coagulation IntraVasculaire Disséminée

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

IFI : Infections Fongiques Invasives

IST : Infection Sexuellement Transmissible

RPM : Rotation Par Minute

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine

Glossaire

Ces définitions sont extraites de Larousse, Le Robert et du CNRTL.

*Tous les mots de ce glossaire seront retrouvés en **gras** dans ce manuscrit.*

Agranulocytose : diminution importante du nombre de globules blancs

Anémie : diminution anormale du taux de globules rouges

Apothécies : réceptacle renfermant les corpuscules reproducteurs des lichens

Balanite : inflammation du gland du pénis

Blastospore : spore ronde ou ovale issue d'un bourgeonnement chez les champignons

Blépharite : inflammation de la paupière et des cils

Commensal : hôte habituel sans causer de dommage

Corticole : qui croît sur les écorces

Cystite : infection urinaire touchant la vessie

Dysgueusie : altération du goût

Dyspareunie : douleurs lors des rapports sexuels

Dyspepsie : sensation d'inconfort digestif apparaissant après les repas

Dysphagie : trouble de la déglutition

Dyspnée : difficulté à respirer

Dysurie : difficulté à uriner

Endocardite : inflammation de l'endocarde

Éosinophilie : augmentation du nombre de polynucléaires éosinophiles

Erythème : lésion de la peau caractérisée par une rougeur pathologique de la peau

Eucaryote : regroupe les organismes qui se caractérisent par la présence d'un noyau

Excoriations : perte des couches superficielles de l'épiderme

Fruticuleux : **qui est** petit et ligneux, qui forme un sous-arbrisseau

Gastralgie : douleurs localisées au niveau de l'estomac

Glossite : inflammation de la langue

Hématurie : émission d'urines contenant du sang

Hyphe : filament allongé constitutif du mycélium de champignons et de lichens.

Hyposialie : production de salive diminuée

Isidie : petite excroissance (quelques dizaines de millimètres) élaborée par un thalle lichénique

Leucocytose : augmentation du nombre de globules blancs dans le sang

Leucorrhées : écoulement non sanglant provenant de l'appareil génital féminin

Mycélium : partie végétative d'un champignon

Neutropénie : taux anormalement faible de granulocytes dans le sang

Nosocomial : infection contractée dans un établissement de santé

Pancytopénie : diminution du nombre des cellules dans les trois lignées de cellules du sang : globules rouges, plaquettes, globules blancs

Papule : gonflement de la peau ne renfermant ni liquide ni pus

Perlèche : inflammation de la commissure des lèvres

Pétéchies : petites taches rouges sur la peau ne s'effaçant pas sous la pression

Photophobie : sensibilité accrue à la lumière

Pollakiurie : fréquence excessive des mictions

Prurit : démangeaisons de la peau

Pustule : lésion de la peau correspondant à un bouton contenant un peu de pus

Pyélonéphrite : infection touchant le rein

Spondylodiscite : infection d'un disque intervertébral et des corps vertébraux adjacents

Stomatite : inflammation de la muqueuse buccale

Symbiose : association entre deux organismes différents, mutuellement bénéfique

Thalle : Tissu végétal composé de cellules non différenciées, dépourvu d'appareil vasculaire où l'on ne reconnaît ni feuilles, ni tiges, ni racines

Thrombopénie : diminution du nombre de plaquettes dans le sang

Tuméfaction : augmentation de volume ou gonflement d'une partie du corps

Vésicule : petite boursouffure de l'épiderme contenant une sérosité

Liste des figures

Figure 1 : *Candida albicans* sous microscope à balayage électronique

Figure 2 : Dessin de *Candida*

Figure 3 : Schéma d'une cellule de *Candida* et zoom sur les structures de la membrane et de la paroi

Figure 4 : Représentation schématique d'une levure

Figure 5 : Représentation d'un bourgeonnement (représentation asexuée) d'une levure

Figure 6 : Photographie d'un intertrigo sur les plis infra-mammaires d'une femme

Figure 7 : Photographie d'un onyxis

Figure 8 : Photographie d'une candidose buccale

Figure 9 : Photographie d'une candidose vaginale

Figure 10 : Exemple de structure chimique d'imidazolé (kétoconazole)

Figure 11 : Exemple de structure chimique de triazolé (fluconazole)

Figure 12 : Schéma de différents exemples de mécanismes de résistance aux azolés

Figure 13 : Structure chimique de l'amphotéricine B

Figure 14 : Structure chimique de la nystatine

Figure 15 : Structures chimiques de la flucytosine et de la cytosine

Figure 16 : Schéma du métabolisme et mécanisme d'action de la flucytosine

Figure 17 : Structures chimiques de la caspofungine, anidulafungine, micafungine

Figure 18 : Structure chimique de la terbinafine

Figure 19 : Cycle de vie d'un biofilm à *Candida albicans*

Figure 20 : Photographies sous microscopie à contraste de phase de *C. albicans*

Figure 21 : Représentation des gradients d'oxygène et de nutriments présents au sein des biofilms

Figure 22 : Résumé des différents mécanismes de résistance des biofilms fongiques

Figure 23 : Photographie d'*Evernia prunastri*

Figure 24 : Photographie de *Nephroma laevigatum*

Figure 25 : Photographie de *Lasallia pustulata*

Figure 26 : Photographie de *Lasallia pustulata* : focus sur les pustules et isidies

Figure 27 : Photographie de *Cladonia uncialis*

Figure 28 : Photographie de *Pleurosticta acetabulum*

Figure 29 : Photographie des apothécies de *Pleurosticta acetabulum*

Figure 30 : Schéma récapitulatif du test anti-développement du biofilm de *C. albicans*

Figure 31 : Schéma récapitulatif du test de mesure de l'activité hémolytique

Liste des tableaux

Tableau 1 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des extraits de *Nephroma laevigatum* après 24h ou 48h de traitement

Tableau 2 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des extraits de *Sordaria fimicola* après 24h ou 48h de traitement

Tableau 3 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des extraits de *Nemania aena var aureolatum* et de *Nemania serpens* après 24h ou 48h de traitement

Tableau 4 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des composés lichéniques isolés

Tableau 5 : Activité hémolytique à 100 µg/mL des composés purs à partir d'extraits lichéniques actifs

INTRODUCTION

L'incidence et la prévalence des infections fongiques invasives ont augmenté depuis plusieurs décennies. Ces infections concernent souvent les patients immunodéprimés et/ou hospitalisés pour des maladies graves (cancers, patients atteints du VIH)¹. Les champignons levuriformes du genre *Candida* représentent à eux-seuls environ 15% des cas de septicémie contractées à l'hôpital² et représentent la quatrième cause d'infections microbiennes sanguines³. *Candida* est présent naturellement chez l'homme qui l'héberge à l'état **commensal**. Néanmoins, ce microorganisme possède un pouvoir pathogène s'exprimant dans certaines conditions comme une défaillance de l'immunité (causée par des traitements ou une pathologie), une rupture de la barrière cutanée ou bien la présence de matériels invasifs (cathéters)⁴. Tout ceci conduit à des infections appelées candidoses⁵. Au sein du genre *Candida*, c'est l'espèce *C. albicans* qui est la plus fréquemment rencontrée dans le cadre d'infections. Cette dernière est la plus fréquemment retrouvée lors d'infections fongiques situées sur les muqueuses orales, vaginales et digestives, et est couramment à l'origine d'infections **nosocomiales**. Elle est isolée majoritairement (46%) lors de candidoses invasives^{6,7}.

Candida est un organisme capable de former des biofilms^{8,9}. Un biofilm se définit comme une structure formée par un ensemble de microorganismes étroitement enchâssés au sein d'une matrice extracellulaire, et fixée à une surface biotique ou abiotique telle qu'un dispositif médical implanté ou un tissu¹⁰. Cette organisation en biofilm est impliquée dans la résistance de ce genre fongique à certains médicaments existants et a engendré un besoin de recherche de nouvelles molécules pour découvrir de nouveaux traitements antifongiques^{11,12,13}.

Les lichens, organismes symbiotiques composés de l'association d'un champignon et d'un organisme photosynthétique (algue verte et/ou cyanobactérie), ainsi que les microorganismes associés à ces lichens (champignons et bactéries vivants à la surface ou à l'intérieur du **thalle** lichénique), produisent des métabolites originaux au potentiel notamment antimicrobien¹⁴. Ils peuvent constituer une source non négligeable de composés anti-biofilm¹⁵. Ainsi, j'ai pu étudier dans le cadre de mon stage d'initiation à la recherche, effectué au laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (EBI), équipe Microbiologie De l'Eau (MDE) de Poitiers du 17 mai au 17 juin 2016, l'effet antibiofilm de molécules issues de lichens et de leurs champignons associés. Ce mémoire va vous en présenter les résultats.

Dans un premier temps, le genre *Candida* sera présenté : son épidémiologie, sa morphologie, sa clinique, ainsi que les traitements existants en cas de candidoses. Puis, nous nous intéresserons aux biofilms de *Candida albicans* ainsi qu'à leur formation. Ensuite, les lichens et leurs champignons associés, objets de l'étude réalisée, seront introduits.

La seconde partie de ce manuscrit sera consacrée à la présentation de ce travail de recherche : ses objectifs, le matériel et les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus. Ces résultats seront discutés et nous finirons par les perspectives futures.

GENERALITES

I. Le genre *Candida*

Le genre *Candida* fait partie du règne des champignons, classe des Saccharomycètes, ordre des Saccharomycétales et famille des Saccharomycétacées¹⁶.

A. Épidémiologie

A travers le monde, l'incidence des infections fongiques ne fait qu'augmenter¹⁷. Cette augmentation peut notamment s'expliquer de par des modulations immunitaires plus fréquentes de l'hôte induites par exemple lors de greffes de cellules souches ou d'organes, ou lors de prise de traitements jouant sur l'immunité comme les inhibiteurs des facteurs de nécrose tumorale indiqués en cas de maladies inflammatoires chroniques¹⁷.

Il a été rapporté que ces infections fongiques étaient responsables de 1 à 8% des septicémies et environ la moitié de ces infections ont lieu dans des unités de soins intensifs^{18,19}. En service de réanimation, les infections fongiques représentent jusqu'à 15% des infections nosocomiales¹⁸.

Les champignons levuriformes du genre *Candida* sont couramment retrouvés chez l'homme au niveau des muqueuses digestives et uro-génitales^{20,21}. Ce sont des microorganismes commensaux qui sont cependant susceptibles de devenir pathogènes notamment en cas de terrains immunodéprimés (patients âgés, patients traités par chimiothérapie ou par antibiothérapie large spectre, patients au stade SIDA...) ou de port de dispositifs médicaux invasifs (tels que les cathéters intraveineux par exemple)^{20,21,22,23}. Le genre *Candida* compte un peu moins de 200 espèces décrites et parmi celles-ci, une vingtaine ont été identifiées comme responsables d'infections humaines^{24,25}. Ces infections, appelées candidoses, peuvent être localisées ou généralisées et surviennent pour la plupart d'entre-elles dans un contexte nosocomial²⁴. Les levures du genre *Candida* sont responsables de la grande majorité des infections fongiques²⁶. Ainsi, une étude menée dans 7 pays européens a rapporté des taux de candidémie allant de 0,2 à 0,38 pour 1000 admissions à l'hôpital²⁷. Il a été rapporté que l'incidence des invasions fongiques invasives (ou IFI) était d'environ 4,7 pour 1000 patients : elle a été multipliée dans les dernières années par cinq environ et place *Candida spp.* entre le quatrième et le sixième rang des infections les plus fréquentes dans les études Américaines et Européennes^{19,28,29}. Les candidoses invasives sont responsables d'un fort taux de mortalité de l'ordre de 36 à 63% dans différents groupes de patients³⁰.

De toutes les espèces de *Candida* recensées, l'espèce la plus couramment impliquée dans les infections fongiques humaines est *Candida albicans* (impliqué dans 66% des infections fongiques) ³¹. On estime que 90% des infections fongiques invasives sont causées par *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*^{18,32}. *C. albicans* est responsable de la majorité des cas de candidoses orales et systémiques, mais est aussi majoritairement responsable des candidoses communautaires et nosocomiales^{21,22}.

Les coûts de santé engendrés par ces infections sont très élevés, estimés entre plusieurs millions de dollars et un milliard de dollars concernant les seuls États-Unis^{4,33,34}.

B. Morphologie et reproduction

Les levures du genre *Candida*, qui sont des organismes **eucaryotes**, sont non pigmentées et non capsulées. Ce sont des levures polymorphes qui se présentent sous différentes formes (Figures 1 et 2):

- la forme **blastospore** correspondant à de petites cellules rondes allant de 2 à 4 μm .
- la forme pseudomycélium (pseudohyphe), mesurant environ 600 μm de longueur et de 3 à 5 μm de largeur. Cette dernière est composée d'un assemblage de cellules ressemblant à un filament mycélien.
- la forme **mycélium** vrai (**hyphe**) qui est retrouvée en particulier chez *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. dubliniensis*, consistant en la formation d'un tube germinatif puis d'un filament mycélien³⁵.

Il existe une alternance morphologique réversible chez certaines espèces de *Candida* entre la forme unicellulaire (blastospore) et les formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes)³⁶.

Des chlamydospores peuvent également être observées. Il s'agit de grandes cellules à paroi épaisse, se formant aux extrémités des hyphes et parfois de pseudohyphes, par des cellules suspensives allongées^{37,38}. Les chlamydospores sont spécifiques de certains champignons et seules deux espèces de *Candida* sont capables de les former : *C. albicans* et *C. dubliniensis*³⁸ (Figure 2).

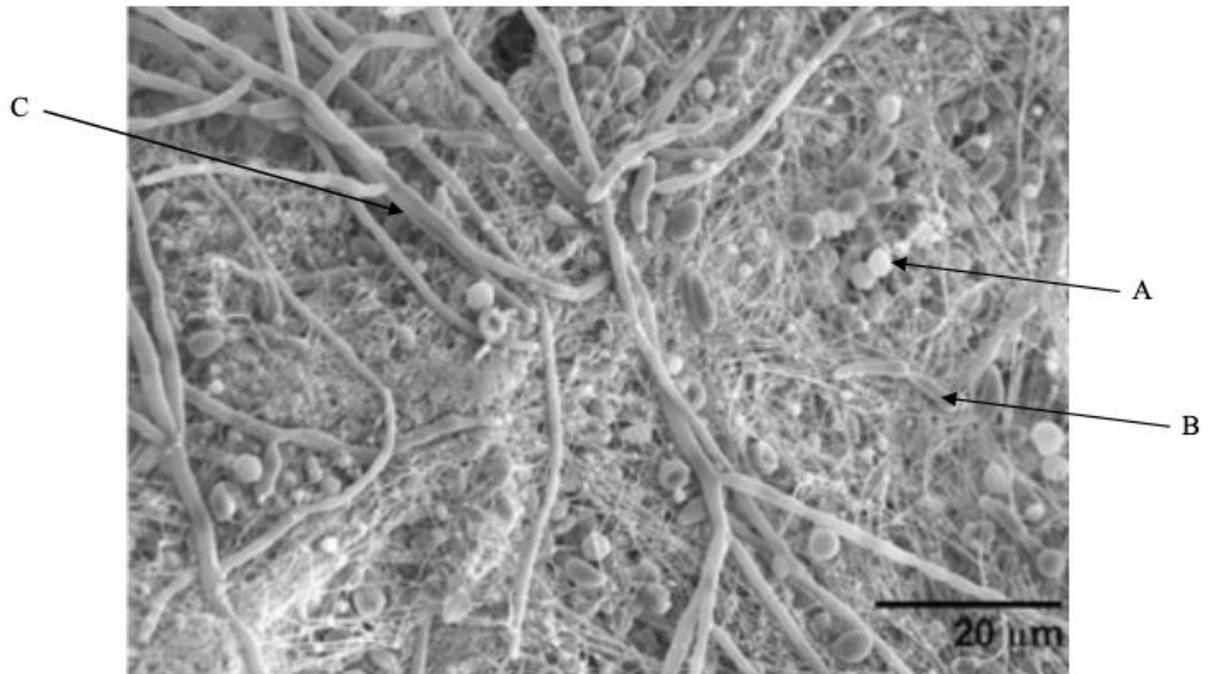


Figure 1 : Observation en microscopie électronique à balayage de *Candida albicans* :
 A : blastospore ; B : pseudohyphe ; C : hyphe. Photographie d'après Finkel et Mitchell³⁹

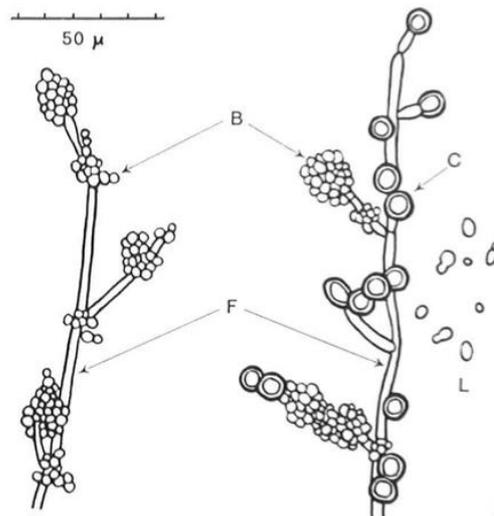


Figure 2 : Dessin de *Candida*. L : blastospores et blastospores bourgeonnantes ; B : amas de blastospores ; F : filaments mycéliens ; C : chlamydospores. Dessin d'après Segretain et coll.⁴⁰

La levure *Candida* est un microorganisme unicellulaire dont la cellule est formée notamment d'une paroi qui constitue le premier élément fongique reconnu par les macrophages.

Cette paroi est constituée en grande partie de polysaccharides (glucanes, chitine, mannanes), de quelques protéines (mannoprotéines) et de lipides très minoritaires^{41,42}. Elle joue un rôle de protection contre les attaques physico-chimiques de l'environnement⁴³.

Le rôle principal des glucanes réside dans la fonction structurale : l'inhibition de leur synthèse ou leur dégradation va donc entraîner des altérations morphologiques et une fragilité cellulaire⁴⁴. La chitine quant à elle, se situe au niveau des couches internes de la paroi, proche de la membrane plasmique (Figure 3)⁴⁴. Les mannanes, polymères de mannoses, se lient de façon covalente à des protéines pour former les mannoprotéines.

Les mannoprotéines sont localisées dans les couches les plus externes de la paroi cellulaire⁴⁴.

La membrane plasmique est quant à elle constituée de deux feuilletts membranaires et assure un rôle de transport actif d'acides aminés, d'oses et de différents ions, ainsi qu'un rôle passif dans le maintien de la pression osmotique^{47,48}. Elle est constituée notamment d'ergostérol⁴⁹ (Figure 3). La présence d'ergostérol en quantité adéquate est nécessaire au fonctionnement normal de la membrane fongique ainsi qu'à sa croissance⁴⁹. Sa synthèse fait intervenir environ une trentaine d'enzymes et peut se décomposer suivant 3 temps : la biosynthèse du mévalonate puis la biosynthèse du pyrophosphate de farnésyl qui aboutira à la biosynthèse de l'ergostérol⁵⁰.

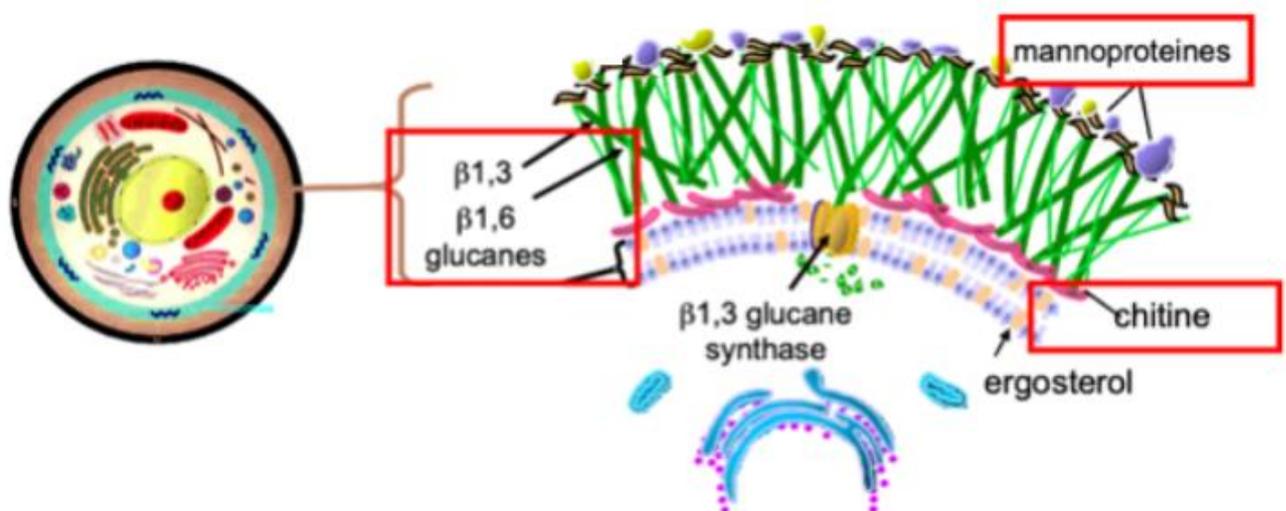


Figure 3 : Schéma d'une cellule de *Candida* et zoom sur les structures de la membrane et de la paroi. D'après Bougnoux et coll⁴⁵.

Candida possède également un noyau et des organites intracytoplasmiques comme un appareil de golgi, un réticulum endoplasmique, des mitochondries ⁵¹ (Figure 4). Il présente également une vacuole et des ribosomes. Les mannanes et autres polysaccharides présents dans la paroi, sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et seront ensuite conjugués aux protéines de la paroi via la voie sécrétoire⁵¹

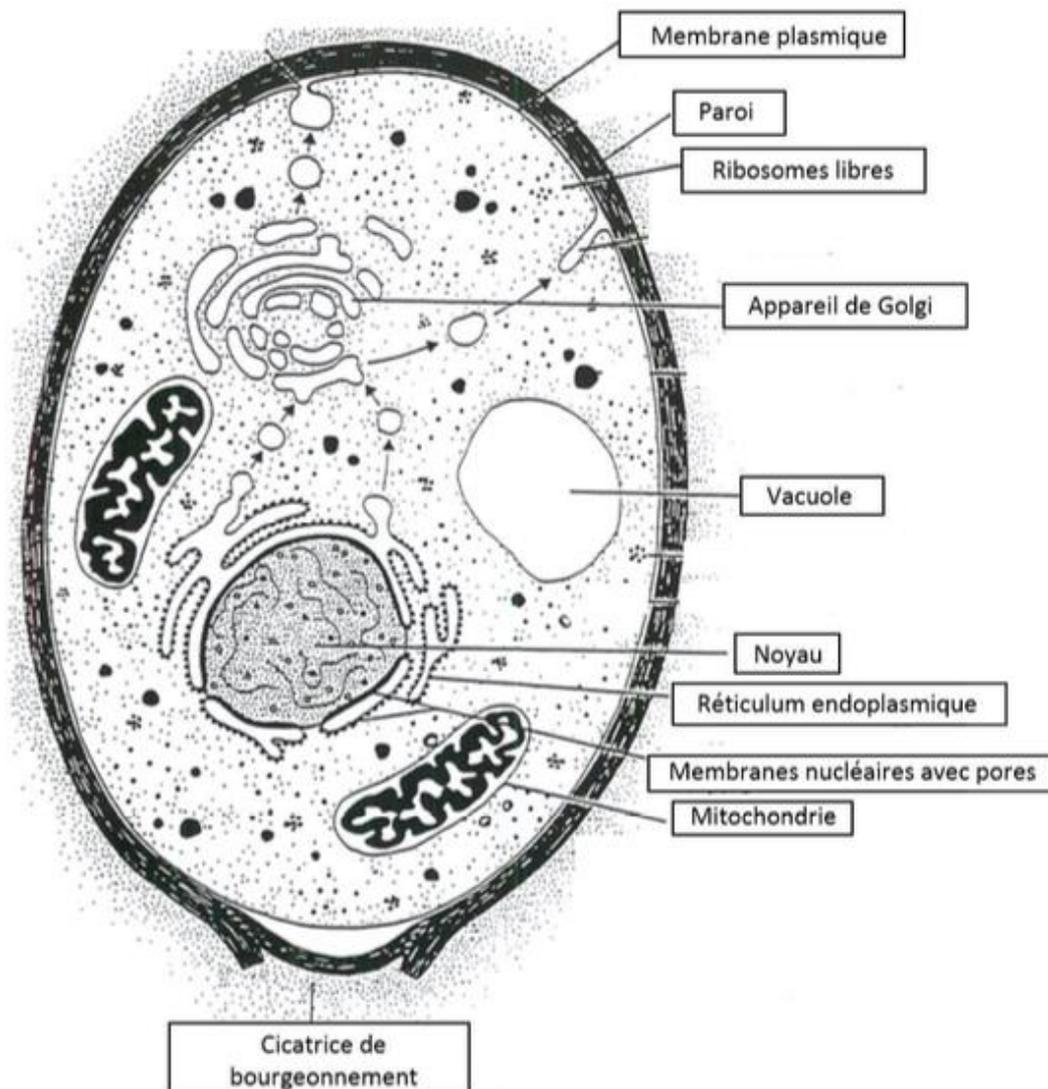


Figure 4 : Représentation schématique d'une levure. D'après le livre *Mémento technique de microbiologie* de Jean-Paul LARPENT (1997)⁴⁶

Le mode de reproduction du genre *Candida* est principalement asexué par bourgeonnement multilatéral. Le bourgeonnement se définit par une duplication du matériel

génétique (mitose) puis une division du cytoplasme de façon inégale, aboutissant finalement à une cellule mère et une cellule fille identiques⁵³ (Figure 5).

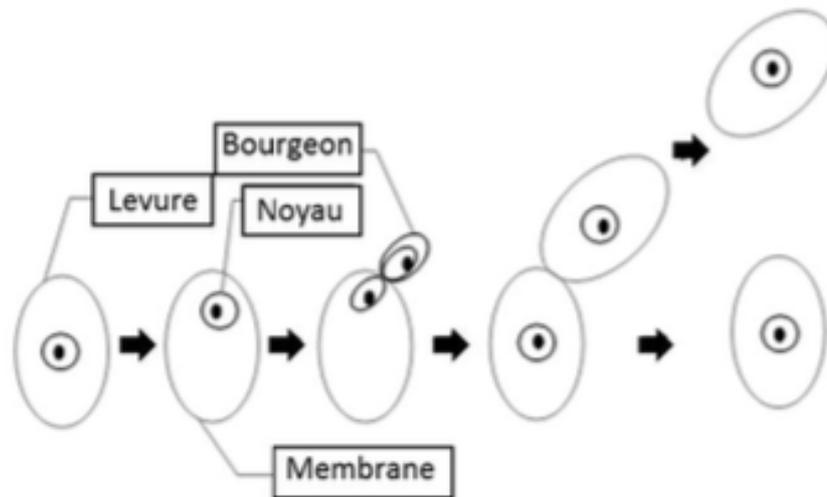


Figure 5 : Représentation d'un bourgeonnement (reproduction asexuée) d'une levure⁵².

C. Physiopathologie et clinique

Les candidoses, infections induites par le genre *Candida*, présentent un large panel de manifestations cliniques, et peuvent être classées en candidoses superficielles, muqueuses ou profondes selon leur localisation, étendue et gravité³².

a. Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles, sont surtout localisées au niveau de la peau et des ongles³². Elles sont fréquentes en milieu communautaire, le plus souvent bénignes, et surviennent chez des personnes immunocompétentes comme immunodéprimées⁵⁴.

(1) Les candidoses cutanées

Les candidoses cutanées aussi nommées intertrigos se traduisent par un **érythème** suintant, lisse avec sensation de brûlures, parfois douloureux, débutant au fond du pli puis s'étendant. Les bords sont irréguliers, avec des papules ou pustules périphériques d'aspect «

émietté ». Le fond du pli est parfois recouvert d'un enduit blanchâtre et peut se fissurer^{55,56}. Les **papules** érythémateuses et prurigineuses peuvent parfois se surinfecter³⁵.

On va distinguer l'intertrigo des grands plis et celui des petits plis.

L'intertrigo des grands plis (plis inguinaux, axillaires, sous-mammaires, abdominaux, inter-fessiers) est caractérisé par des lésions partant du fond du pli puis qui atteint les deux bords du pli pour former une plage érythémateuse et lisse, délimitée parfois par une collerette desquamative blanche et des **pustules**³⁵ (Figure 6).

L'intertrigo des petits plis (c'est-à-dire l'intertrigo digito-palmaire et/ou digito-plantaire) quant à lui se situe, en général, au niveau des orteils, des doigts ou du pli rétro-auriculaire³⁵. Concernant les pieds, tous les espaces peuvent être atteints et peuvent déborder sur la plante du pied. Quant aux mains, ce sont surtout les 3^{ème} et 4^{ème} espaces inter-digitaux qui vont être touchés³⁵.

Quelques facteurs favorisant les intertrigos sont à noter, tels que la macération, l'humidité ainsi que la friction mécanique de la peau⁵⁵.



Figure 6 : Photographie d'un intertrigo sur les plis infra-mammaires d'une femme. Metin et al., 2018⁵⁷.

(2) Les candidoses unguéales (onyxis et périonyxis)

Les candidoses unguéales concernent principalement les ongles des mains et sont plus fréquemment rencontrées chez la femme³⁵. Elles comprennent le périonyxis, qui associe une

tuméfaction rouge douloureuse, un bourrelet inflammatoire péri-unguéal et un exsudat transparent non purulent, ainsi que l'onyxis³⁵. L'onyxis fait suite à un périonyxis avec envahissement latéro-proximal unguéal, une coloration vert-jaunâtre de l'ongle gagnant le bord libre ainsi qu'un décollement progressif de l'ongle³⁵ (Figure 7).

Outre les facteurs immunitaires, les facteurs favorisant ces candidoses unguéales sont les contacts répétés et prolongés avec l'eau, un environnement humide et non respirant (port de gants de protection par exemple), des microtraumatismes ainsi que les abus de soins de manucure^{5,58}.



Figure 7 : Photographie d'un onyxis (Anofel©⁵)

(3) Les candidoses anales

Chez le nouveau-né, les candidoses anales sont caractérisées par une fissuration du pli inter-fessier ainsi qu'un érythème fessier du nouveau-né³⁵.

Chez l'adulte, une anite candidosique est souvent associée, et est caractérisée par un prurit ainsi qu'une sensation de brûlure anale³⁵.

b. Les candidoses des muqueuses

(1) Les candidoses oropharyngées

On estime que 30 à 60% des adultes en bon état de santé sont porteurs de façon commensales et non pathologiques d'espèces de *Candida* dans la cavité buccale⁵⁹. Cependant,

lors de processus affaiblissant le système immunitaire de l'hôte par exemple, certaines espèces de *Candida*, telles que *Candida albicans*, vont proliférer causant une rupture de l'équilibre et passent d'espèces commensales non pathologiques à espèces opportunistes responsables de pathologies telles que les candidoses oropharyngées^{60,61,62}.

Il en existe de trois types :

- La candidose érythémateuse ou atrophique qui est présente sous forme aiguë et souvent secondaire à un traitement antibiotique, entraînant des lésions multifocales, une inflammation et un érythème buccal, une langue rouge vif et dépapillée (autrement appelée **glossite**)³⁵. Elle est aussi présente sous forme chronique, également appelée la « **stomatite** des dentiers », entraînant un érythème chronique des tissus dentaires, un œdème sous et autour de la prothèse et des **pétéchies** inflammatoires³⁵.
- La candidose pseudomembraneuse aiguë (ou muguet buccal) qui se présente sous la forme de lésions blanche-jaunâtres fermes, confluentes en granulations pseudomembraneuses. *Candida* adhère alors aux muqueuses en prenant un aspect de lait caillé et envahit la langue, les gencives, le palais et les faces internes des joues³⁵. Cette forme est retrouvée principalement chez les nouveau-nés, chez les patients immunodéprimés, chez les patients atteints d'un diabète non équilibré, atteints d'**hyposialie** iatrogène ou chez les patients sous corticoïdes en inhalation⁵⁹ (Figure 8).
- La candidose hyperplasique ou pseudotumorale qui est retrouvée au niveau jugal et lingual sous forme de plaques blanche-jaunâtres⁵. Ces plaques sont adhérentes, difficilement détachables. Cette candidose est plus fréquente chez les fumeurs. Une transformation maligne de ce type de lésions est parfois observée.

Ces candidoses oropharyngées, en particulier le muguet, sont souvent accompagnées de **perlèche** (chéilite) angulaire correspondant à une inflammation de la commissure labiale formant une fissuration érythémateuse, squameuse ou croûteuse souvent bilatérale^{5,35}.



Figure 8 : Photographie d'une candidose buccale. (Public Health Image Library)

(2) Les candidoses digestives

(a) La candidose œsophagienne

La candidose œsophagienne est caractérisée par une **dysphagie**, des brûlures rétro-sternales (pyrosis) et un hoquet. Elle peut également être la cause d'anorexie.

Cette candidose est souvent associée à une candidose oropharyngée. Elle est fréquemment retrouvée chez les patients au stade SIDA ayant un taux de lymphocytes T CD4+ < 100/mm³, les patients atteints de cancers ou d'hémopathie maligne (en particulier la leucémie)³⁵.

(b) Les candidoses gastro-intestinales

Les candidoses gastro-intestinales associent diarrhées aqueuses et déshydratation, flatulences et douleurs abdominales³⁵. Elles concernent le tube digestif, de l'estomac au colon et présentent un risque de perforation digestive et d'hémorragie. Elles peuvent être associées à une anite candidosique. Elles sont plutôt rares et principalement retrouvées chez le patient immunodéprimé⁶³.

(3) Les candidoses génitales

(a) La candidose vulvo-vaginale

Cette candidose est fréquente puisqu'elle touche à un moment dans leur vie 75% des femmes et est récidivante dans un quart des cas^{35,64,65,66}. Cette pathologie touche en général des femmes jeunes et actives sexuellement⁶⁴.

Les signes cliniques associés sont un prurit vulvaire intense, une **dyspareunie**, des sensations de brûlures, une **dysurie**, des **leucorrhées** blanchâtres grumeleuses abondantes caillebotées, un érythème et un œdème de la vulve, parfois des fissures ou des **excoriations** (Figure 9)⁶⁷.

L'origine de cette candidose est endogène : *Candida*, en particulier l'espèce *albicans* (espèce responsable de 80% de ces candidoses), passe du tube digestif vers la sphère génitale³⁵. Cette candidose n'est pas considérée comme une infection sexuellement transmissible (IST). Elle est hormonodépendante et apparaît fréquemment lors de la seconde partie du cycle menstruel ou lors d'une grossesse (troisième trimestre)³⁵. Il existe aussi de nombreux autres facteurs la favorisant tels que le port de vêtements serrés, l'utilisation de savon acide lors de la toilette intime, l'utilisation de tampons vaginaux, de stérilets ou encore l'utilisation d'antibiotiques, la présence d'un diabète mal contrôlé, d'une immunodépression...³⁵



Figure 9 : Photographie d'une candidose vaginale (Anofel©⁵)

(b) La balanite

Cette forme de candidose génitale retrouvée chez l'homme est plus rare, généralement d'origine sexuelle^{35,68}. Elle associe un érythème prurigineux de la muqueuse du gland et du prépuce, une inflammation ainsi que des douleurs de la verge. De petites **vésicules** sont

présentes à la surface du sillon balano-préputial ainsi que des papules accompagnées souvent de plaques blanchâtres³⁵.

(4) Les candidoses urinaires

(a) La cystite à *Candida*

Cette forme concerne plutôt les femmes ainsi que les patients diabétiques et ceux ayant des malformations au niveau des voies urinaires^{35,69}. Comme les **cystites** bactériennes, les symptômes associent **pollakiurie**, dysurie, des douleurs mictionnelles et une inflammation du méat urinaire³⁵. La fièvre n'est pas constante⁷⁰.

(b) La pyélonéphrite à *Candida*

Elle survient surtout chez les personnes âgées, les patients sondés ou les patients sous antibiothérapie au long cours³⁵. La **pyélonéphrite** à *Candida* tout comme une pyélonéphrite classique, est considérée comme une urgence thérapeutique³⁵.

Elle se distingue de la cystite par ses signes cliniques, qui sont de la fièvre accompagnée de douleurs lombaires³⁵.

(5) Les candidoses oculaires

Les candidoses oculaires sont rares et la plupart du temps bénignes³⁵. Elles sont souvent dues à l'utilisation d'un collyre antibiotique ou à la prise de corticoïdes³⁵. Une apparition subite de vision floue associée à une douleur et une **photophobie** sont les principaux symptômes évocateurs⁷¹. Les candidoses oculaires peuvent évoluer vers une **blépharite** si elles ne sont pas correctement traitées³⁵.

(6) Les candidoses pulmonaires et bronchiques

Les candidoses pulmonaires et bronchiques sont dues à une dissémination de *Candida* par voie hématogène³⁵. Cette forme de candidose reste une infection rare et est observée lors de candidoses disséminées associant une utilisation prolongée d'antibiotiques ou à un état d'immunosuppression⁷². La clinique est peu spécifique (toux, fièvre)⁷³.

c. *Les candidoses profondes*

Les candidoses profondes sont des affections graves avec pour signes cliniques en général une fièvre résistante aux antibiotiques à large spectre ainsi qu'une altération de l'état général⁷⁴. Ces candidoses peuvent avoir deux origines, à savoir, endogène (à partir d'un foyer digestif par exemple) et exogène (dispositifs médicaux (cathéter veineux central)...)⁷⁴. Les candidoses profondes comptent les candidoses systémiques ainsi que la candidose hépatosplénique (ou candidose chronique disséminée)⁷⁴.

(1) Les candidoses systémiques

Les candidoses systémiques représentent une cause de mortalité et de morbidité importante⁷⁵. Elles correspondent à la présence de *Candida* dans plusieurs sites non contigus ce qui sous-entend une dissémination via le flux sanguin⁵. Aussi appelées candidémies, elles sont principalement des co-infections chez les patients immunodéprimés (VIH, cancers...), ainsi que chez les patients traités par des antibiotiques à large spectre, des immunosuppresseurs lors de greffes d'organe ou des traitements anti-leucémiques⁵⁷. Il n'existe pas de symptomatologie spécifique. Cependant, une fièvre irrégulière résistante à une antibiothérapie à large spectre de plus de 72h et une altération de l'état général est observée dans environ 80 % des cas. Une **leucocytose** est également observée dans 50 % des cas⁵.

Dans ces candidoses systémiques, les *Candida* peuvent parfois se loger dans des localisations particulières telles que des localisations cardiaques (causant des **endocardites**), ostéoarticulaires (responsables de **spondylodiscites**) ou neurologiques.

(2) Les candidoses hépatospléniques

Cette forme de candidose est rare⁷⁶. Pour une grande partie des patients, elle se manifeste après une **neutropénie** sévère et prolongée (induite par chimiothérapie)^{76,77,78}. Elle concerne 3 à 29% des patients atteints de leucémie aiguë⁷⁹. Les symptômes ne sont pas spécifiques: on note des douleurs abdominales, une hépato- et/ou splénomégalie, des diarrhées, nausées, vomissements, et une fièvre résistante à une antibiothérapie à large spectre^{76,79}.

D. Traitements existants

Les classes d'agents antifongiques principalement utilisées dans les infections à *Candida* correspondent aux azolés, polyènes, antimétabolites, échinocandines et allylamines. Ces antifongiques présentent différents modes d'action. Certains agissent sur la paroi cellulaire par inhibition de la formation de cette dernière, d'autres sur la membrane plasmique en inhibant la synthèse de l'ergostérol, ou encore en interagissant directement avec l'ergostérol membranaire. D'autres encore agissent en inhibant la division cellulaire^{80,81}.

Voyons ci-dessous ces principaux traitements.

a. Les azolés

Les agents antifongiques azolés vont cibler l'enzyme 14- α -déméthylase qui est une enzyme permettant la conversion du lanostérol en ergostérol. Les azolés vont donc inhiber la synthèse de l'ergostérol provoquant une accumulation de précurseurs toxiques ainsi qu'une déplétion en ergostérol qui est un constituant essentiel de la membrane fongique⁸².

Peuvent être distingués les antifongiques azolés à usage systémique (fluconazole, voriconazole) de ceux à usage topique (kétoconazole). On distingue également les antifongiques imidazolés (kétoconazole) (Figure 10) des triazolés (fluconazole, itraconazole) (Figure 11). Ces derniers peuvent être de 1^{ère} génération (fluconazole, itraconazole) ou de 2nde génération (voriconazole, posaconazole)⁸².

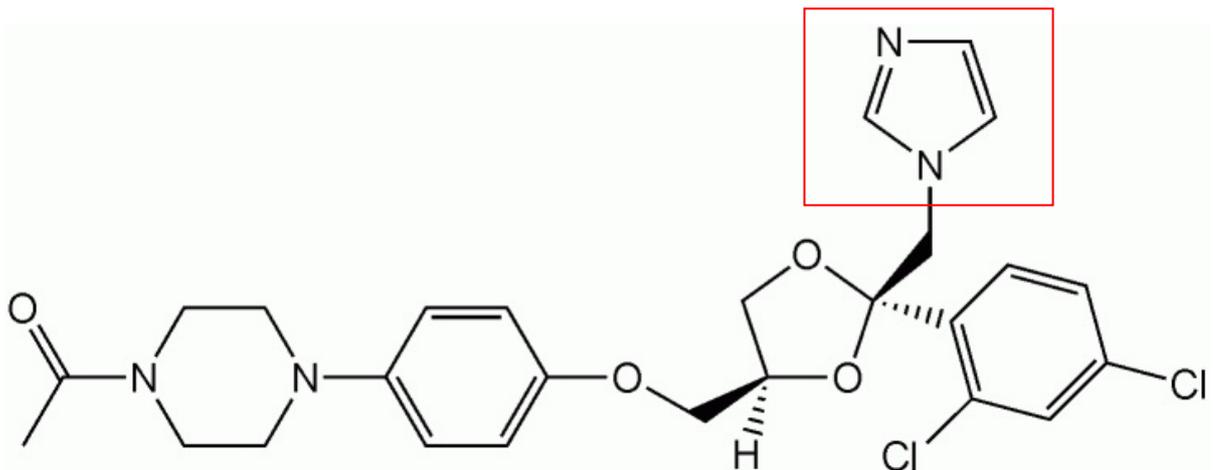


Figure 10 : exemple de structure chimique d'imidazolé (kétoconazole)

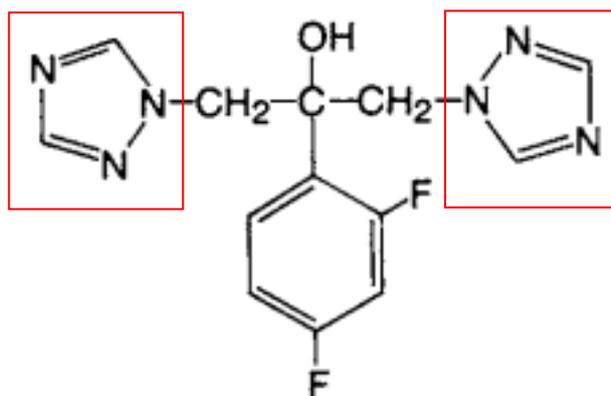


Figure 11 : exemple de structure chimique de triazolé (fluconazole)

Le fluconazole (BEAGYNE®, TRIFLUCAN® par voie orale) est indiqué en cas de candidoses oropharyngées, oesophagiennes, urinaires et systémiques, ainsi qu'en prophylaxie des candidoses (ou de la méningite à cryptocoques) chez les patients VIH ou affectés d'une neutropénie prolongée⁸².

Les effets indésirables recensés du fluconazole sont des nausées, douleurs abdominales, céphalées ainsi que des diarrhées, vomissements, vertiges, **anémie**, épilepsie...⁸².

L'itraconazole (SPORANOX® par voie orale et buvable) est indiqué dans les candidoses oropharyngées et/ou oesophagiennes. Il est aussi indiqué dans d'autres affections fongiques telles que l'aspergillose bronchopulmonaire et pulmonaire nécrosante, la kératite fongique ou le pytiriasis versicolor⁸².

Pour les traitements de moins d'un mois d'itraconazole, des nausées, douleurs abdominales, **céphalées**, **dyspepsies** ont été rapportées. Pour les traitements prolongés, des nausées, **gastralgies**, hépatites toxiques, insuffisance cardiaque ont été rapportées⁸².

Le voriconazole (VFEND® par voie orale et injectable) est indiqué dans les candidémies du patient non neutropénique, les candidoses invasives graves résistantes au fluconazole ainsi qu'en prophylaxie des infections fongiques invasives chez les receveurs d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) à haut risque⁸². Son absorption digestive est diminuée par les aliments (la prise se fait donc 2 heures avant ou après les repas)⁸².

L'apparition d'effets indésirables est très fréquente. Les effets indésirables les plus souvent observés sont une modification des ongles ainsi qu'une alopécie⁸². Des hépatites,

thrombopénies, purpura, **pancytopénie**, **hématurie**, allongement de l'intervalle QTc etc. sont des effets indésirables qui sont fréquents, de l'ordre de 1 à 10%, et plus rarement, des réactions anaphylactiques, une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), une **agranulocytose**, une **éosinophilie** ont été rapportés⁸².

Le posaconazole (NOXAFIL® par voie orale et injectable) est indiqué dans les infections fongiques invasives chez les patients adultes réfractaires/intolérants à l'amphotéricine B, à l'itraconazole ou au fluconazole, dans la prophylaxie des infections fongiques invasives chez les patients sous chimiothérapie d'induction (LAM) ou recevant un traitement immunosuppresseur ainsi que dans les candidoses oropharyngées chez les patients immunodéprimés⁸².

Les effets indésirables rapportés de cette molécule sont sensiblement identiques aux autres molécules de cette classe, à savoir céphalées, nausées, anorexie, douleurs abdominales, etc.⁸².

Le miconazole (DAKTARIN®, LORAMYC® par voie orale) est utilisé dans le traitement des candidoses buccales (muguet, perlèche, glossite, gingivite, stomatite)⁸². Ses effets indésirables sont des troubles digestifs tels que nausées, diarrhées voire vomissements, ainsi que, plus rarement, des éruptions cutanées allergiques, une augmentation des transaminases et une **dysgueusie**⁸².

Il faut aussi noter que ces antifongiques sont des inhibiteurs puissants du cytochrome P450⁸². Il existe donc des interactions possibles avec de nombreux médicaments, ainsi qu'une potentielle hépatotoxicité.

Les résistances acquises aux azolés sont nombreuses. Parmi les mécanismes de résistance, on peut citer une diminution de la concentration intracellulaire en azolés par surexpression des pompes à efflux, une modification de la cible par mutation génétique ou une surexpression de la cible, une modification de la composition en stérol de la membrane fongique⁸³ ... (Figure 12). Ces mécanismes de résistance induisent une diminution voire une disparition de l'effet de ces azolés.

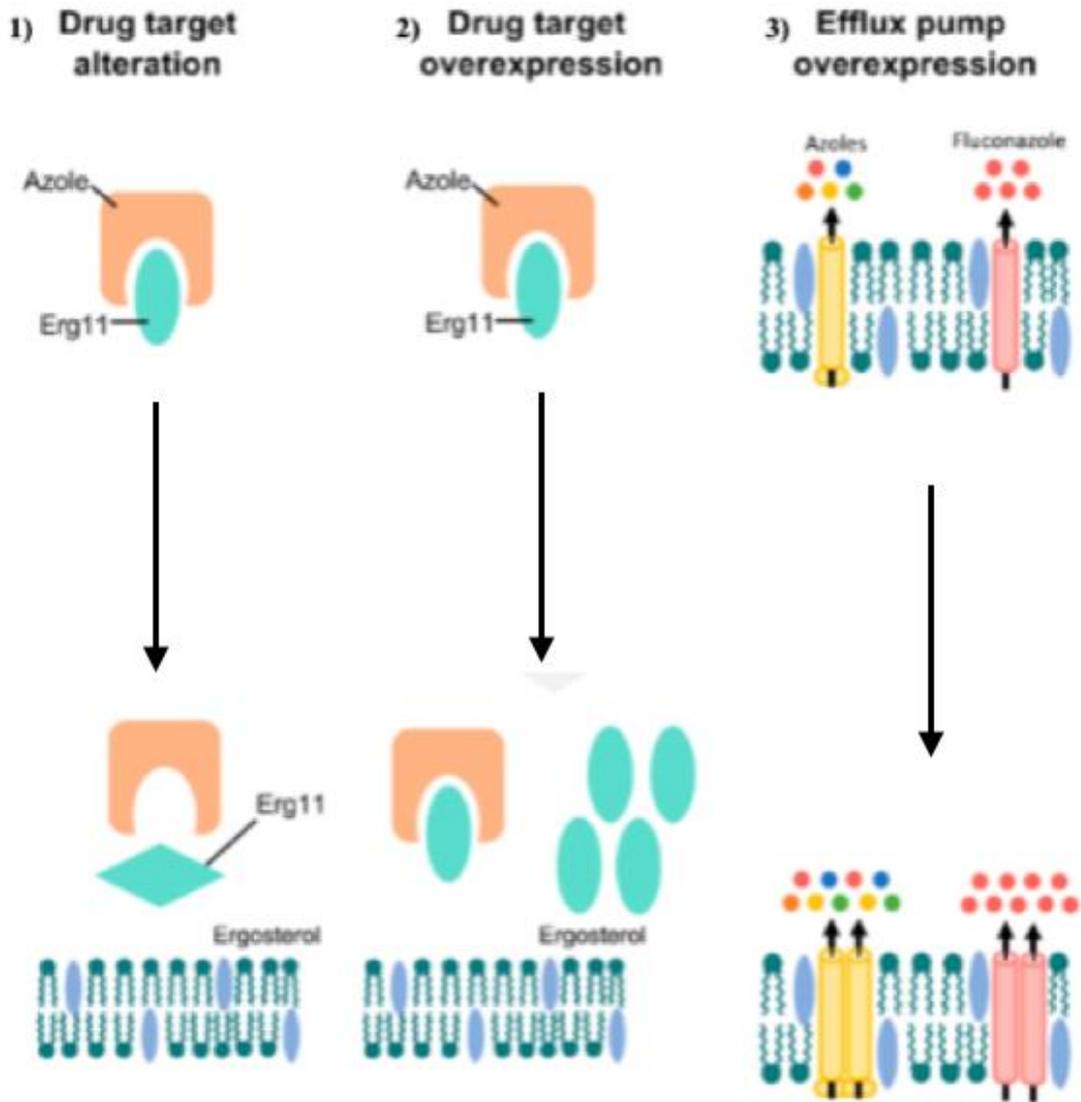


Figure 12 : Schéma de différents exemples de mécanismes de résistance aux azolés. 1) Mutation au niveau de la cible des azolés (ici, *ERG11*) 2) surexpression de la cible des azolés; 3) surexpression des pompes à efflux ou des transporteurs. D'après Lee et coll. (2021)⁸⁴

b. Les polyènes

Les principaux polyènes antifongiques sont l'amphotéricine B (FUNGIZONE® par voie orale ou injectable) (figure 13) et la nystatine (MYCOSTATINE® par voie orale) (Figure 14).

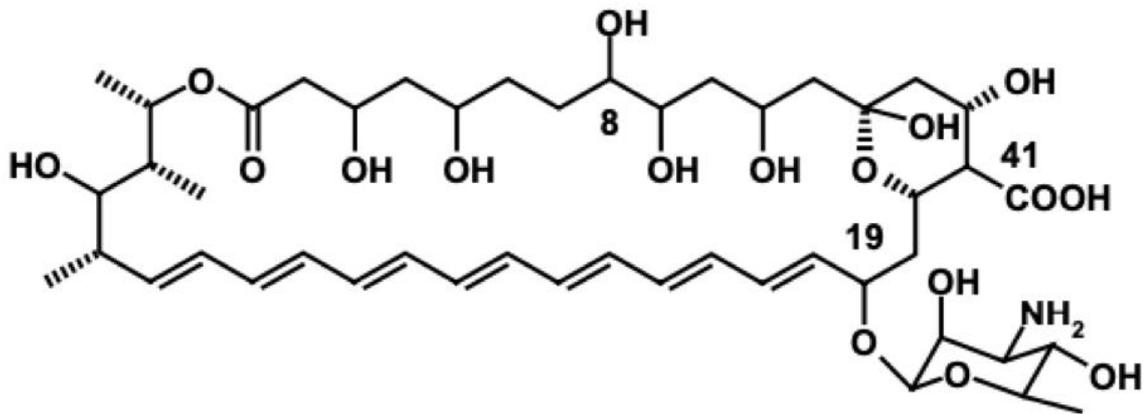


Figure 13 : Structure chimique de l'amphotéricine B

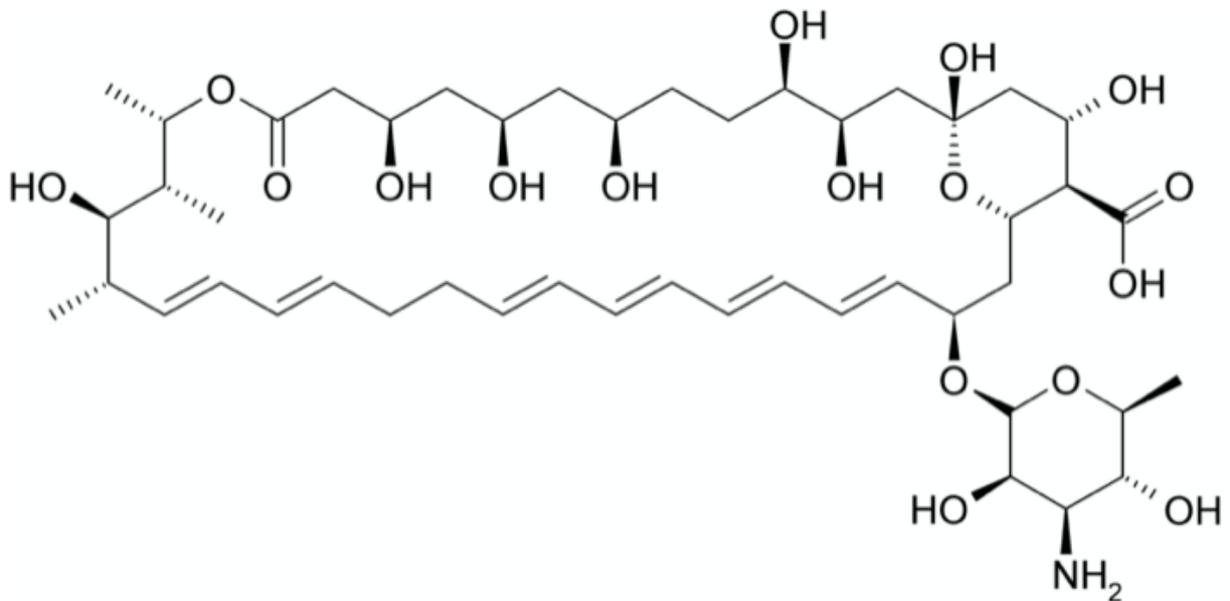


Figure 14 : Structure chimique de la nystatine

Ces deux polyènes ont pour cible l'ergostérol. Ils vont se lier à l'ergostérol présent dans la membrane fongique et ainsi, vont provoquer une discontinuité de celle-ci.

Utilisés *per os*, ils sont indiqués en cas de mycoses cutanéomuqueuses (notamment digestives) ou pour la prévention des candidoses chez des sujets dits à très haut risque (tels que les prématurés, patients sous chimiothérapie ou immunodéprimés)⁸². Lorsque l'amphotéricine B est utilisée par voie injectable, cette dernière est indiquée en cas de mycoses systémiques à

germes sensibles et opportunistes (notamment *Candida*), ainsi qu'en cas d'infections à d'autres organismes tels que la méningo-encéphalite amibienne ou les leishmanioses⁸².

Les effets indésirables de l'amphotéricine B et de la nystatine par voie orale sont des troubles digestifs tels que des vomissements ainsi que des manifestations allergiques⁸². Pour optimiser au maximum l'effet thérapeutique, il est recommandé d'utiliser les suspensions buvables en dehors des repas, en bain de bouche, puis de les avaler en cas de candidose digestive⁸².

Les effets indésirables liés à l'utilisation de l'amphotéricine B injectable comptent une fièvre dose-dépendante avec frissons, crampes, céphalées lors de la perfusion, une néphrotoxicité dose-dépendante, une anémie, une hématotoxicité avec thrombopénie, potentielle agranulocytose...^{82,83}.

Deux autres formes d'amphotéricine B existent actuellement : l'amphotéricine B complexée avec des phospholipides (ABELCET®) et l'amphotéricine B liposomale (AMBISOME®). La première est une forme à libération différée : l'amphotéricine B est incorporée dans une matrice de deux phospholipides qui une fois dans l'organisme vont être dégradés par des enzymes phagocytaires (phospholipases) libérant ainsi l'amphotéricine B⁸³. La seconde forme incorpore l'amphotéricine B dans de petits liposomes lamellaires⁸³. Cette dernière forme, très largement utilisée en clinique, présente moins de toxicité rénale que l'amphotéricine conventionnelle⁸⁵. Elle présente également une excellente pénétration intracellulaire, dans le liquide céphalo-rachidien ou l'œil par exemple, où beaucoup d'autres thérapeutiques échouaient jusqu'alors⁷⁵.

Ces deux produits (ABELCET® et AMBISOME®) sont indiqués chez les patients atteints de mycoses systémiques à germes sensibles et opportunistes (dont *C. albicans*), ayant développé une insuffisance rénale sous amphotéricine B conventionnelle ou ceux qui possèdent une insuffisance rénale préexistante et persistante⁸².

La résistance à la classe des polyènes est assez rare. Elle résulte de mutations dans le gène ERG3 qui est un gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ergostérol, diminuant ainsi sa concentration dans la membrane fongique⁸⁶.

c. Les antimétabolites

Parmi les antimétabolites, seule la flucytosine est utilisée en cas de candidoses. Elle peut être employée par voie orale ou injectable (ANCOTIL®)⁸².

La flucytosine est un antifongique de synthèse, dérivé fluoré de la cytosine, possédant une biodisponibilité et diffusion élevées (y compris dans le LCR, l'humeur aqueuse et les sécrétions bronchiques), ainsi qu'une toxicité inférieure à celle de l'amphotéricine B^{82,83} (Figure 15).

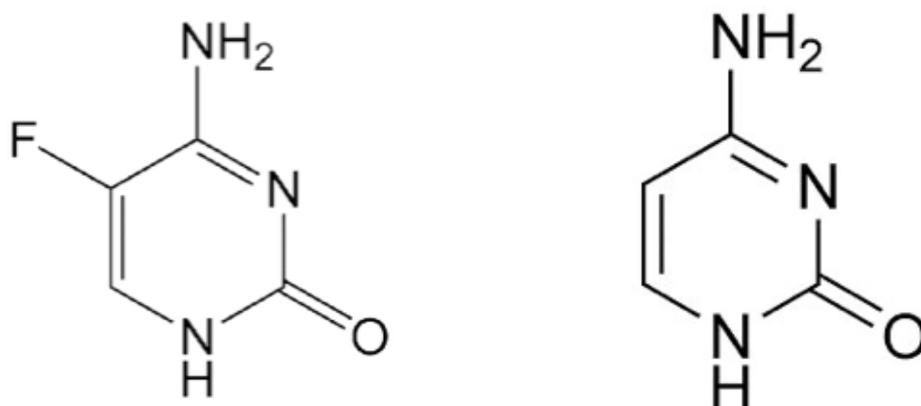


Figure 15 : Structures chimiques de la flucytosine (à gauche) et de la cytosine (à droite)

Elle agit en inhibant la synthèse d'ARN et d'ADN fongique. La flucytosine entre dans la cellule via des cytosine-perméases, puis, une fois arrivé à l'intérieur du cytosol, cette dernière va être désaminée par une enzyme spécifique aux champignons (la cytosine-désaminase), afin de générer du 5-fluorouracile (5-FU)^{83,87}. Le 5-FU nouvellement généré va être phosphorylé par une autre enzyme (l'uridine phosphoribosyl transférase) pour donner du 5-fluorouridine monophosphate (ou 5-FUMP)⁸³. Puis, le 5-FUMP, par action de kinases va former du 5-fluorouridine triphosphate (ou 5-FU triphosphate) et, sous l'action à nouveau de l'uridine phosphoribosyl transférase, va donner le 5-fluoro désoxyribouridine monophosphate. Le 5-FU triphosphate est ensuite incorporé dans l'ARN à la place de l'uracile et entraîne donc un ARN frauduleux ainsi que des erreurs de lecture du code génétique⁸³. Le 5-fluoro désoxyribouridine monophosphate quant à lui, forme un complexe ternaire avec l'acide folinique et la thymidilate synthase (enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la thymidine, un des précurseurs de l'ADN), entraînant une inhibition de la synthèse de la thymidine et de l'ADN⁸³ (Figure 16).

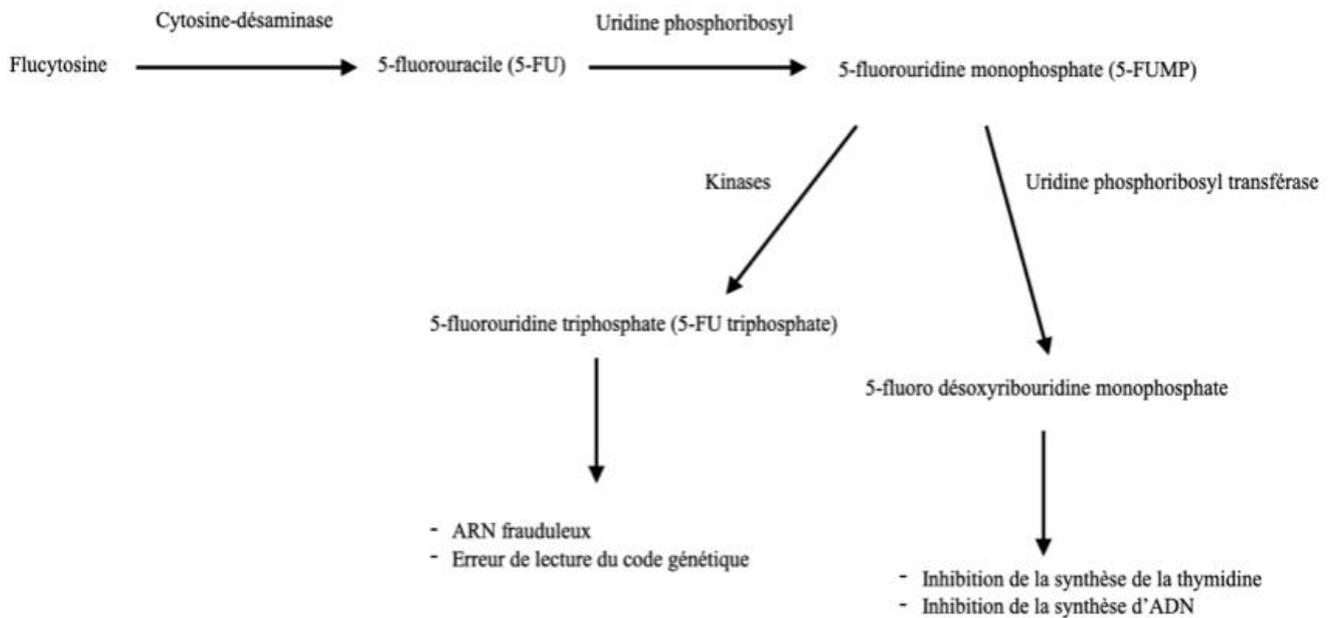


Figure 16 : Schéma du métabolisme et mécanisme d'action de la flucytosine

La flucytosine est indiquée, en association avec l'amphotéricine B injectable, en cas de candidoses urinaires, digestives, respiratoires, ainsi que lors d'endocardites et de septicémies à *Candida*. Elle est également indiquée dans les cryptococcoses et certaines formes d'aspergillomes⁸². La flucytosine n'est jamais utilisée en monothérapie car de nombreuses résistances acquises ont déjà été observées. Ces résistances se traduisent par une augmentation de la sélectivité des perméases (enzymes permettant normalement l'entrée de la flucytosine dans la cellule) limitant ainsi sa concentration intracellulaire⁸³. Des modifications au niveau des enzymes responsables de la transformation de la flucytosine en 5-FU puis en 5-FUMP sont aussi impliquées dans ces mécanismes de résistance.

Les effets indésirables de la flucytosine sont : une toxicité hématologique dose-dépendante (leucopénie, thrombopénie, anémie voire risque d'aplasie médullaire), des troubles digestifs dose-dépendants (par transformation en fluoro-uracile toxique : nausée, diarrhée...), une atteinte hépatique avec élévation des transaminases parfois réversibles à l'arrêt du traitement⁸². Son association avec l'amphotéricine B est une association synergique. Associée au kétoconazole, l'effet est alors additif⁸².

d. *Les échinocandines*

Cette classe est plus récente que les autres précédemment présentées. En effet, la première échinocandine a été hémi-synthétisée en 1974. Il s'agit de l'anidulafungine. Puis la caspofungine a été découverte en 1989 puis la micafungine en 2000. Il s'agit de lipopeptides semi-synthétiques qui sont utilisés en thérapeutique depuis les années 2000^{83,88}. On peut citer trois molécules, utilisées en cas de candidoses, actuellement sur le marché : la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine (Figure 17).

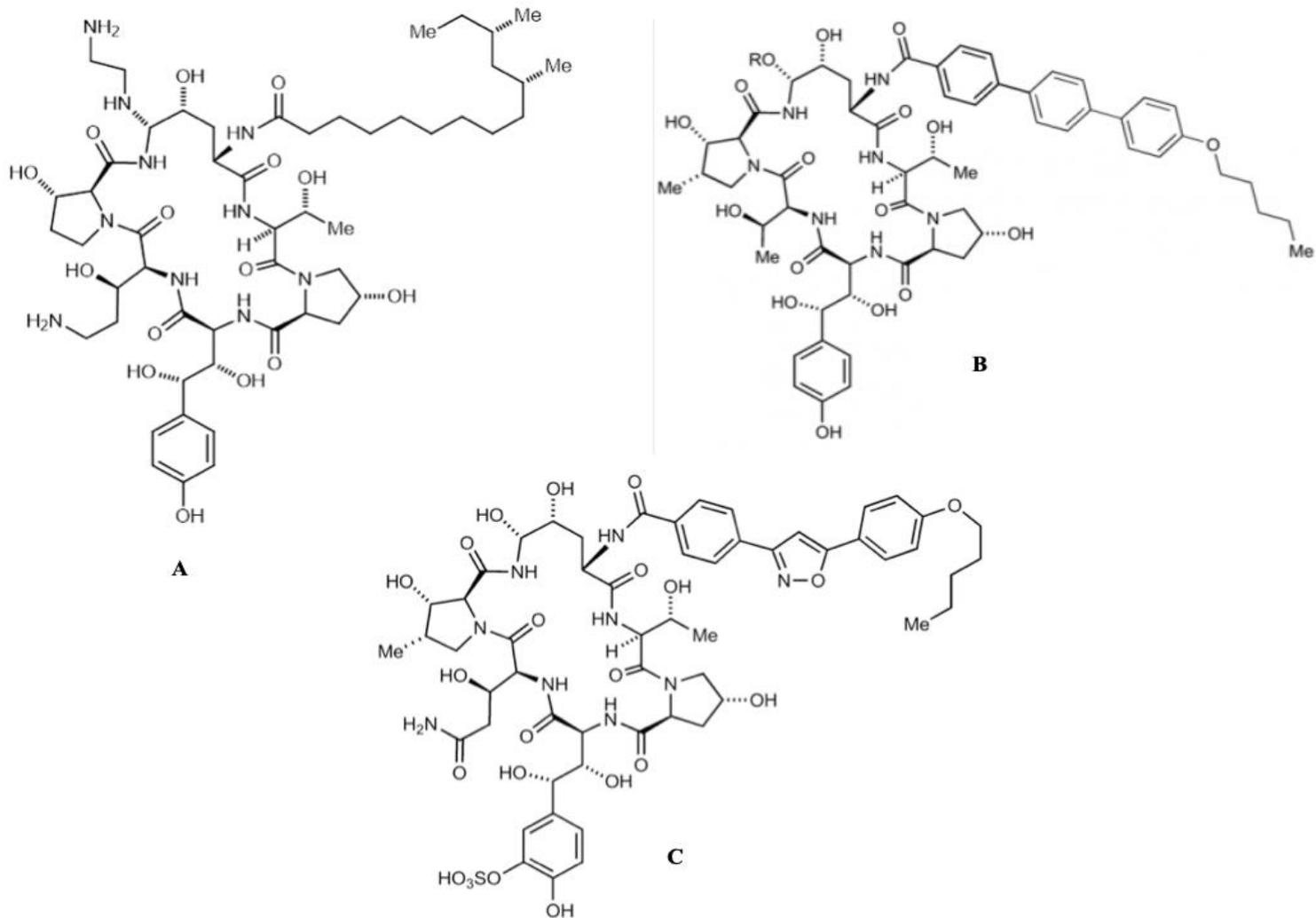


Figure 17 : Structures chimiques de a) la caspofungine ; b) l'anidulafungine; c) la micafungine

Les échinocandines vont inhiber de façon non compétitive l'enzyme 1,3-β-D-glucane synthétase. Ce système enzymatique est nécessaire à la production du β-(1,3)-D-glucane, constituant indispensable de la paroi fongique^{82,88}. Une diminution de la synthèse des glucanes et ainsi, une perte d'intégrité de la paroi fongique sera donc observée^{82,88}. Il est à noter que leur action est sélective car l'enzyme que ces molécules bloquent est une enzyme qui est absente des cellules de mammifères⁸³. Les échinocandines constituent une alternative face à la recrudescence des infections mycosiques sévères et leurs résistances ou intolérances aux traitements conventionnels⁸⁸.

La caspofungine (CANCIDAS® par voie injectable) est indiquée dans les candidoses invasives de la population adulte et pédiatrique ainsi que dans les cas d'aspergillose invasive adulte ou pédiatrique, réfractaires ou intolérants à l'amphotéricine B⁸².

L'élévation des phosphatases alcalines et des transaminases sont des effets indésirables très fréquents (>10%) de la caspofungine. On note aussi potentiellement l'apparition d'un rash cutané, de fièvre, nausées ou encore plus rarement, de chocs anaphylactiques et d'accidents cutanés graves⁸².

La micafungine (MYCAMINE® par voie injectable) est indiquée dans les candidoses invasives, tout âge confondu, dans les candidoses oesophagiennes (pour les adolescents \geq 16 ans) et dans la prévention des infections à *Candida* chez les patients bénéficiant d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou chez les patients ayant une neutropénie attendue \geq 10 jours⁸².

Les effets indésirables fréquents de la micafungine sont des troubles hématologiques tels qu'une leucopénie ou une anémie, ainsi qu'un risque de phlébites, céphalées, **dyspnées**, nausées, vomissements et, plus rarement, une réaction allergique avec éruption cutanée et frissons ou une hémolyse⁸².

L'anidulafungine (ECALTA® par voie injectable) est indiquée dans les candidoses invasives de l'adulte⁸². Parmi les effets indésirables fréquents, on note des troubles digestifs (nausées, diarrhées), une hypokaliémie, des céphalées, prurits, convulsions, coagulopathie, et plus rarement une hypertension, des bronchospasmes ou un choc anaphylactique⁸².

La résistance aux échinocandines s'explique par des phénomènes de mutation de certains gènes impliqués dans la sous-unité catalytique de l'enzyme 1,3- β -D-glucane synthétase⁸⁶.

myalgies, arthralgies, imposant l'arrêt du traitement en cas d'élévation des enzymes hépatiques (rares cas d'hépatites dont des cas mortels), exanthème, urticaire, angioedème, syndrome de Lyell⁸².

Pour la voie locale, les effets indésirables comptent des érythèmes, des démangeaisons ou encore un eczéma de contact qui imposera par la suite l'arrêt du traitement⁸².

II. Biofilm à *C. albicans*

A. Définition d'un biofilm

Les biofilms sont des amas structurés de cellules microbiennes, enrobées d'une matrice polymérique et attachées à une surface⁸⁹. Cette organisation protège les microorganismes notamment des agressions extérieures, leur permettant de survivre dans des conditions environnementales hostiles⁹⁰. Elle leur permet de résister au système immunitaire de l'hôte et leur confère une certaine résistance aux traitements antimicrobiens. De plus, les cellules libérées par les biofilms peuvent migrer dans la circulation sanguine et causer des infections systémiques à mortalité élevée³⁹.

Ainsi, ces biofilms ont un impact important en terme de santé publique.

B. Épidémiologie des biofilms à *C. albicans*

Candida albicans est l'une des espèces fongiques la plus associée à la formation de biofilms impliqués dans des pathologies humaines^{32,89,91}. Les biofilms de cette espèce de *Candida* se développent notamment sur presque tout type de dispositifs médicaux et en particulier sur les matériaux médicaux invasifs, tels que les cathéters, les pacemakers, les prothèses etc^{2,32,89}.

Le risque, chez les patients possédant un cathéter intraveineux, de développer un biofilm à *Candida albicans* a été estimé à 30%⁴.

Le coût annuel pour les thérapies antifongiques liées à ces infections à biofilm de *Candida albicans* a été estimée à 2,6 milliards de dollars aux États-Unis par an³⁹.

Les biofilms de *Candida* formés sur les cathéters veineux centraux et autres matériaux invasifs constituent le principal facteur de risque de candidémie. L'incidence des candidémies impliquant des biofilms ainsi que la mortalité liée a augmenté depuis quelques années, ce qui est notamment lié à la recrudescence de l'utilisation des dispositifs intravasculaires^{89,92}. Et

malgré les thérapies antifongiques actuellement disponibles, le taux de mortalité lié à ces candidémies invasives avoisine les 40%⁹³.

En comparaison aux cellules planctoniques, les levures se dispersant à partir de biofilms matures seraient plus virulentes et avec une plus grande capacité d'adhérence aux surfaces⁸⁶.

C'est cet ensemble qui fait que la forme biofilm représente l'un des principaux facteurs de virulence de *C. albicans*, contribuant à la pathogénèse des candidoses^{86,92}.

C. Cycle de vie du biofilm de *C. albicans*

Le biofilm de *C. albicans* se forme en plusieurs étapes : une première phase dite d'adhérence, suivie par une phase de développement puis une phase de maturation. La phase de détachement ou dite de dissémination est la dernière phase du cycle de vie du biofilm^{90,94} (Figure 19).

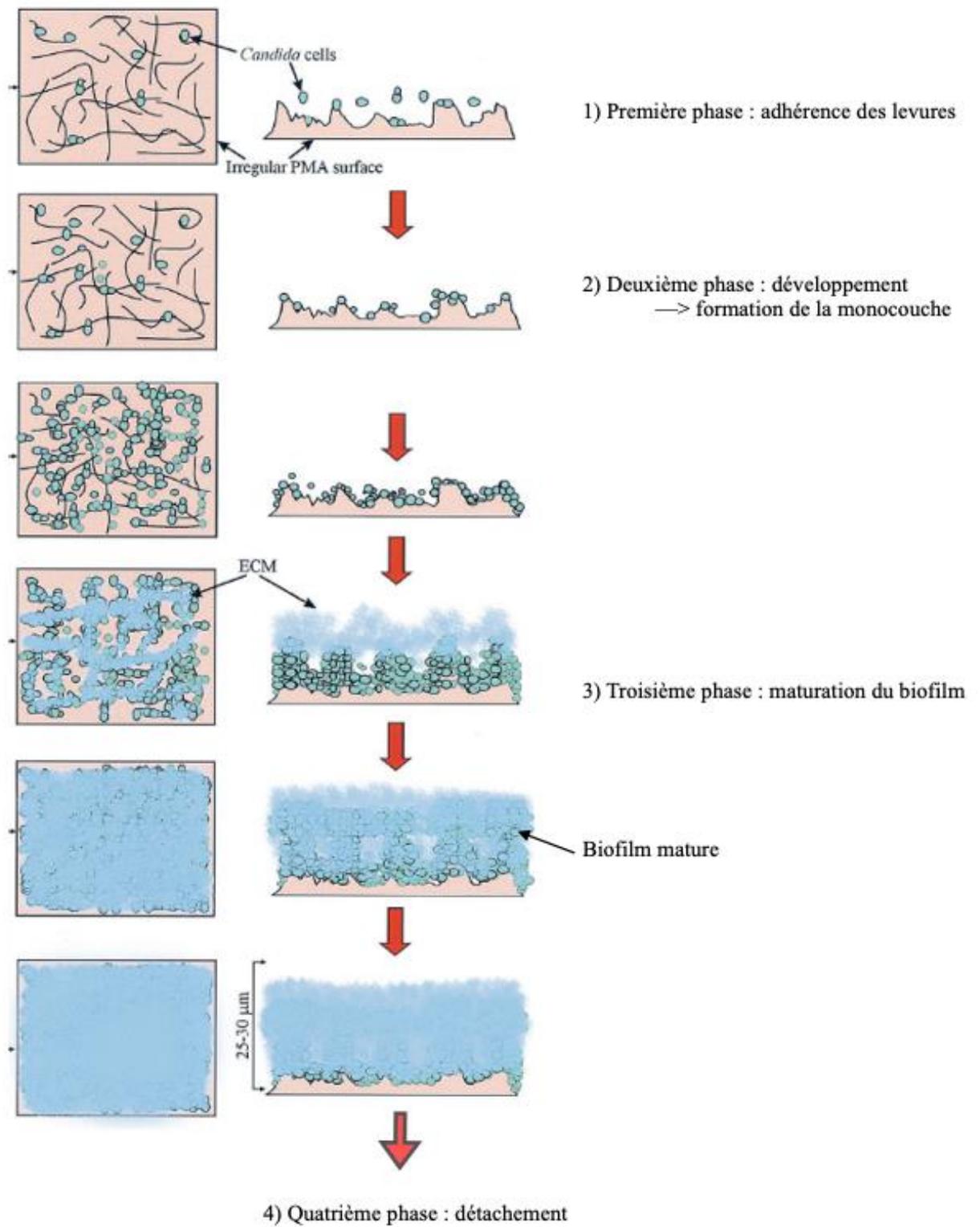


Figure 19 : Cycle de vie d'un biofilm à *Candida albicans*. Adapté de Chandra J. et al, 2008⁹⁵; PMA : polyméthylméthacrylate , ECM : matrice extracellulaire

a. *Première phase : l'adhérence*

En premier lieu, les cellules fongiques sous la forme de blastospores vont adhérer individuellement et de façon réversible à une surface biotique ou abiotique (comme une prothèse en polyméthylméthacrylate)⁹⁰ (Figure 19) . Ces cellules vont proliférer et former des microcolonies. Des interactions non spécifiques (comme des liaisons hydrophobes, électrostatiques, ou de Van der Waals etc.) puis spécifiques (ligands-récepteurs) permettent cette adhérence^{90,96}. Des molécules d'adhérences, nommées adhésines, permettent ensuite aux levures d'adhérer de façon irréversible. Cette étape peut durer jusqu'à 11 heures et est nécessaire pour la phase suivante de développement du biofilm^{90,94}.

b. *Deuxième phase : le développement*

Les microcolonies vont ensuite former des macrocolonies par bourgeonnement et vont ainsi former une monocouche basale à confluence sur le support⁹⁷. Cette phase intermédiaire dure entre 12 et 30 heures. La filamentation des blastospores intervient lors de cette phase : les blastospores vont former des saillies allongées lors de leur différenciation en hyphes⁹¹ (Figure 20). Cette différenciation en hyphe permet de renforcer la structure du biofilm⁹⁰. La production de matrice extracellulaire est également initiée lors de cette phase⁹⁰.

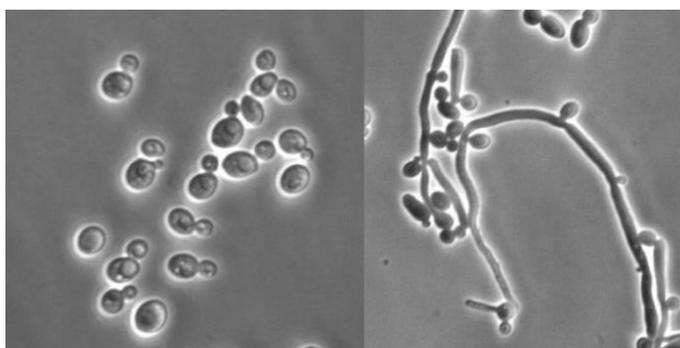


Figure 20 : Photographies sous microscopie à contraste de phase de C. albicans.

Gauche : forme blastospore.

Droite : forme hyphe (et quelques blastospores). Anofel⁵©

c. Troisième phase : la maturation

Cette étape se déroule entre 31 et 72 heures après l'étape d'adhérence initiale des levures^{90,93}. Le biofilm nouvellement formé va continuer de croître. Parallèlement, la production par les cellules de matrice polysaccharidique extracellulaire s'intensifie^{90,91}. Cette matrice est composée principalement de protéines, glucides, lipides et d'acides nucléiques^{96,98}. Le biofilm mature présente ainsi des cellules fongiques sous forme de blastospores et hyphes englobées dans la matrice formant ainsi une couche épaisse⁹⁰.

d. Quatrième phase : le détachement

L'étape finale du cycle de vie d'un biofilm est le détachement et la dispersion des cellules fongiques. Elle survient au-delà de 48 heures⁹⁰. Cette dernière étape joue un rôle clé dans la dissémination du biofilm dans l'organisme, mais aussi dans la propagation de l'infection : les levures sous forme blastospores non adhérentes au substrat peuvent se détacher du biofilm, se disperser de façon isolée ou en amas et peuvent coloniser d'autres surfaces pour former de nouveaux biofilms^{90,93,97}. Elles peuvent être alors à l'origine de candidémies invasives par dissémination dans les tissus de l'hôte⁹⁹. Il peut être noté que ces cellules détachées voient leurs propriétés phénotypiques modifiées : leurs capacités de filamentation, de formation de biofilm ainsi que leur pathogénicité sont augmentées⁹⁰.

D. Résistances induites par le mode de vie biofilm

Ce mode de vie biofilm confère aux levures *C. albicans* une résistance à plusieurs classes de médicaments se traduisant par la nécessité de concentrations d'antifongiques jusqu'à 1000 fois supérieures aux concentrations efficaces contre les cellules planctoniques (non en mode de vie biofilm)^{89,93,100}.

Cette résistance est due à plusieurs mécanismes⁴. Il peut tout d'abord être cité le métabolisme ralenti des cellules au cœur du biofilm, du fait de l'accès limité aux ressources. Cet accès limité s'explique par une densité très forte en cellules et la présence de matrice extracellulaire entraînant des gradients à l'intérieur du biofilm. En effet, les cellules les plus extérieures auront un accès simplifié à l'oxygène et aux nutriments, contrairement aux cellules les plus internes, qui auront un métabolisme ralenti et donc une sensibilité réduite aux antimicrobiens (Figure 21)^{101,102}.

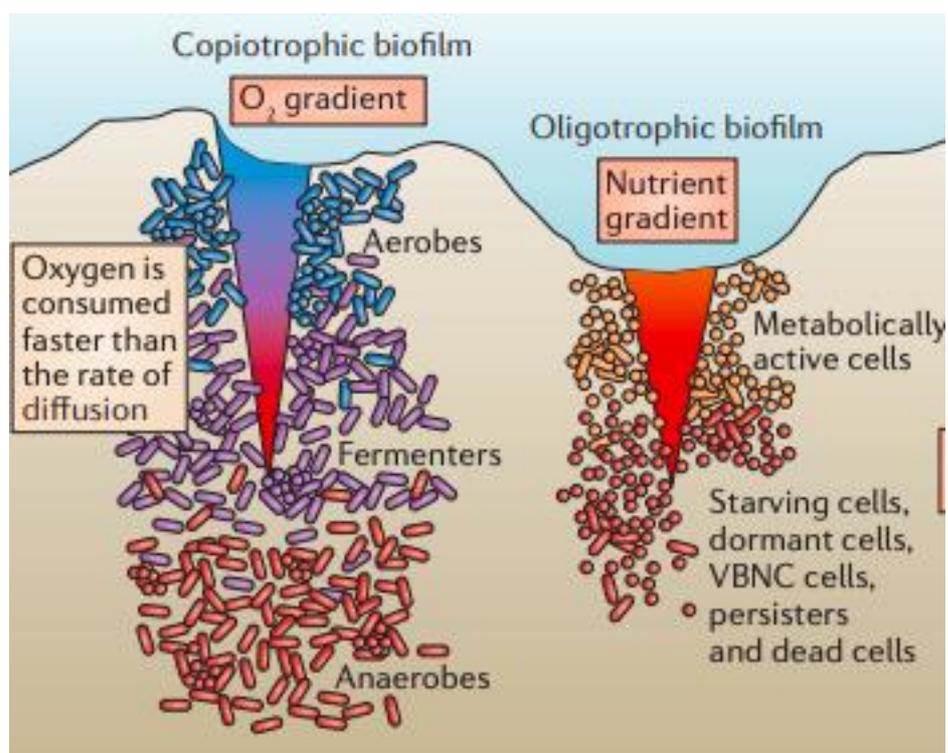


Figure 21 : Représentation des gradients d'oxygène et de nutriments présents au sein des biofilms. D'après Flemming et coll. (2016)¹⁰².

D'autres facteurs peuvent être cités tels que le pH, la température ou le stress environnemental qui sont susceptibles de modifier l'architecture du biofilm et donc sa sensibilité aux antifongiques⁸¹. La surexpression des cibles des antifongiques conventionnels ou l'activation des pompes à efflux réduisant alors la concentration intracellulaire en antimicrobiens, en particulier en traitements azolés sont d'autres mécanismes qui ont également été observés^{4,100,103,104}.

Enfin, il existe une sous population de cellules appelées persisters ou cellules persistantes se trouvant à l'intérieur d'un biofilm et présentant une sensibilité réduite à quelques classes thérapeutiques telles que les polyènes et azolés^{90,105}. Le mécanisme de transition reste incomplètement connu, mais il semblerait que cette transition impliquerait des modifications de leurs paroi et membrane cellulaire¹⁰⁵.

La figure 22 résume ces différents mécanismes de résistance des biofilms fongiques.

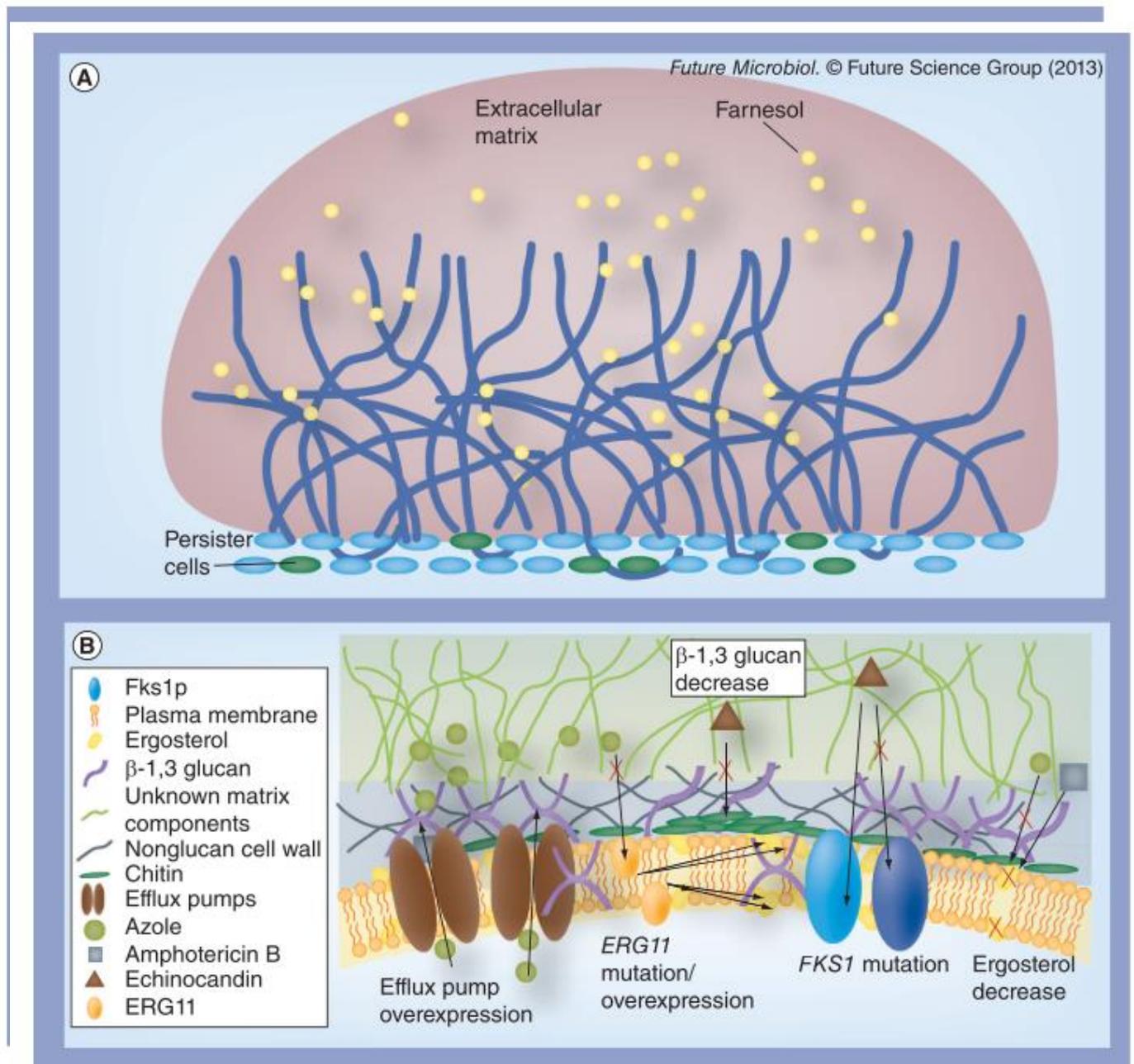


Figure 22: Résumé des différents mécanismes de résistance des biofilms fongiques. Schéma d'après Taff et coll. (2013)¹⁰⁵

En outre, la résistance aux traitements induite par le biofilm est multifactorielle et rend ainsi les pathologies impliquant des biofilms telles que les candidoses systémiques difficilement traitables.

E. Traitements utilisés contre le biofilm de *Candida albicans*

Actuellement, seules les échinocandines telles que la caspofungine, la micafungine ou l'anidulafungine ainsi que les formulations lipidiques de l'amphotéricine B (sous forme liposomale et à complexes de phospholipides), précédemment décrites, ont montré une activité significative contre les biofilms de *C. albicans in vitro*, sans toutefois parvenir à totalement éradiquer un biofilm déjà formé (notamment dû à certains mécanismes de résistance évoqués plus haut). Ces traitements sont utilisés notamment dans les candidémies invasives impliquant la formation de biofilm^{74,106}.

En conclusion, il n'existe que très peu de traitements à l'heure actuelle actifs contre les biofilms de *C. albicans*. La recherche de nouvelles alternatives est donc indispensable. Certaines recherches se tournent actuellement vers des molécules produites par les lichens. En effet, certains lichens sont utilisés par les populations pour leurs propriétés médicinales et notamment leurs propriétés antimicrobiennes. Ces organismes formés par la symbiose entre un champignon et un organisme photosynthétique sont la source de composés originaux aux activités prometteuses. Ils présentent donc un fort potentiel dans la découverte de nouvelles molécules actives contre les biofilms. Nous allons les présenter ci-dessous.

III. Les lichens

A. Définition

Les lichens sont définis comme des organismes symbiotiques correspondant à l'association entre un champignon (mycobionte) et un organisme photosynthétique (photobionte), comme par exemple une algue dans 85% des cas ou une cyanobactérie dans 10% des cas voire les deux (5% restant)^{14,107,108,109}. Ils représentent l'un des mode de vie symbiotique les plus anciens et diversifiés des champignons¹¹⁰. Cette **symbiose**, association à bénéfices réciproques, se traduit par un apport de matière organique nécessaire au développement du lichen par l'organisme photosynthétique via la photosynthèse, et une protection structurale par l'élément fongique qui permettra également l'ancrage du lichen^{111,112}.

Ces organismes sont formés d'un thalle, et n'ont par conséquent ni feuilles, ni tige, ni racines¹¹³. L'identité du mycobionte étant utilisée comme base pour leur classification, la plupart des lichens sont classés dans le groupe des Ascomycètes^{114,115,116}.

Environ 10% de la surface terrestre est recouverte par les lichens et ces derniers représentent plus de 20% de la biodiversité fongique mondiale, comptant plus de 20 000 espèces identifiées^{14,117,118}. Ils sont présents dans divers habitats naturels; ils sont observables par exemple à la surface de rochers, d'écorces, de tiges ou de feuilles d'arbres ou au sol^{118,119,120}.

Concernant leur reproduction : elle peut être sexuée ou asexuée.

La reproduction sexuée est assurée par le champignon qui via diverses structures va émettre des spores dans l'air qui germeront et se développeront après la rencontre avec l'organisme photosynthétique.

La reproduction asexuée s'effectue par fragmentation du thalle ou au moyen de boutures naturelles. Ces fragments sont souvent disséminés par le vent ou les animaux et permettent ainsi une colonisation d'autres milieux¹¹¹.

B. Les lichens : une source de composés d'intérêt

Depuis longtemps, les lichens sont utilisés comme aliments, colorants (teinture) voire comme traitement en médecine traditionnelle du fait de leurs contenus en métabolites d'intérêt^{118,121,122,123}. Par exemple, les lichens *Parmelia sulcata* et *Lobaria pulmonaria* étaient utilisés pour les maladies pulmonaires et crâniennes. *Peltigera aptosa* était utilisé, comme son nom latin l'indique, pour soigner les aphtes ou *Parmelia saxatilis* était employé en cas d'épilepsie, etc.¹²⁴.

Environ 700 substances lichéniques ont été dénombrées jusqu'à maintenant¹²⁵. Ces métabolites sont classés en deux groupes : les métabolites primaires et secondaires^{126,127}.

Les métabolites primaires des lichens vont contribuer au métabolisme cellulaire et à la structure du lichen et sont produits par le mycobionte et le photobionte¹²⁵. Les plus retrouvés sont les acides aminés, vitamines, polyols, pigments, chitine et polysaccharides¹¹².

Le mycobionte est responsable de la synthèse des métabolites secondaires, et le photobionte peut avoir une influence sur ce métabolisme¹¹⁶. Les métabolites secondaires ne sont pas essentiels pour la survie et le développement du lichen, et leur contribution n'est pas entièrement connue : ils pourraient intervenir dans la protection du thalle contre les agents/agressions extérieurs (tels que les animaux, les UVs qui induisent la génération de radicaux libres) ou encore avoir un impact sur les interactions biotiques et abiotiques du lichen avec l'environnement¹¹⁶.

Plusieurs classes chimiques y sont retrouvées telles que les anthraquinones, les depsides, les depsidones ou dibenzofuranes, des composés aromatiques, ainsi que des xanthones (plus de 100 xanthones ont été isolées de lichens en 2016)^{14,126,128,129}. Ces différentes classes ont montré

des actions diverses et sont notamment responsables d'activités pharmacologiques, telles qu'une activité antioxydante, anti-microbienne, antivirale, cytotoxique^{14,116,130,131,132,133}... Par exemple, certaines xanthones lichéniques ont déjà démontré des activités antimycobactériennes comparables aux effets des traitements utilisés pour la tuberculose, ainsi que des activités antibiotiques contre *Bacillus subtilis*^{128,134}. Les dibenzofuranes (comme l'acide usnique par exemple) ont, quant à eux, démontré des propriétés antimicrobiennes, antivirales, anti-inflammatoires et antiprolifératives¹³⁵. Les anthraquinones (telle que l'émodine) ont présenté des activités antitumorales, antibactériennes, diurétiques, vasorelaxantes, antiprolifératives^{135,136,137}.

C. Les lichens étudiés

L'étude portant sur cinq lichens, leur présentation va être faite ci-dessous.

a. *Evernia prunastri*

Evernia prunastri est un lichen répandu en Europe et en Asie¹³⁸. Il appartient à l'ordre des *Lecanorales* et à la famille des *Parmeliaceae*¹³⁹. Il est communément appelé « mousse des chênes » car principalement collecté sur les troncs et branches de chênes ainsi que des frênes, saules, pins et parfois sur des rochers^{140,141}.

Son thalle est **fruticuleux** à structure foliacée¹³⁹. Ses lobes sont souvent blancs en dessous et nervurés au-dessus¹¹⁸. Sa couleur vire du vert au blanc verdâtre lorsque le lichen est sec, ainsi que du vert foncé au jaune lorsqu'il est humidifié¹¹⁸ (Figure 23).



Figure 23 : Photographie d'*Evernia prunastri*, (©Mambu L., 2016)

Plusieurs métabolites sont retrouvés chez *E. prunastri*, dont les principaux sont l'acide évernique (appartenant à la classe des depsides), l'acide usnique (dibenzofurane) et l'atranorine (depside)^{122,142}. D'autres composés, non majoritaires, ont été retrouvés chez ce lichen comme l'acide physodique et la chloroatranorine qui font respectivement partis de la classe des depsidones et des depsides^{118,143}.

Concernant ses activités pharmacologiques, *Evernia prunastri* a déjà démontré des activités antibactériennes contre plusieurs bactéries comme *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, des activités antifongiques (contre *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Penicillium purpurescens* et *Penicillium verrucosum*) et anti-oxydante^{118,142,144}. L'acide évernique, usnique et l'atranorine sont connus pour être des inhibiteurs puissants de certaines enzymes liées au métabolisme des polyamines, telles que l'arginine décarboxylase par exemple ou encore l'ornithine décarboxylase qui sont deux enzymes intervenant dans le métabolisme des acides aminés^{118,122,144,145}. L'atranorine aurait de plus des effets photoprotecteurs¹⁴⁴.

Ce lichen a été beaucoup utilisé en cosmétique, notamment en parfumerie^{145,146}. L'extrait de ce lichen, appelé aussi "absolue de mousse de chêne", fait partie de la composition de parfums. Cependant il s'est révélé très allergène pour la peau. En effet, cet extrait a une composition complexe et parmi cette composition figure l'atranorine et les acides évernique et usnique désignés comme responsables de dermatites allergiques^{147,148}. Ainsi, la présence de cet extrait doit être indiquée dans la liste des ingrédients lorsque sa concentration est supérieure:

- à 0,001 % dans les produits sans rinçage,
- à 0,01 % dans les produits à rincer.

b. *Nephroma laevigatum*

Nephroma laevigatum est un lichen appartenant à l'ordre des *Peltigerales* et à la famille des *Nephromataceae*¹⁴⁹. Il croit principalement dans les forêts humides, sur des troncs couverts de mousse ainsi que sur des murs et rochers des régions proches de l'océan¹⁵⁰. Il a pour partenaire photosynthétique une cyanobactérie¹⁵⁰. Il possède un thalle foliacé, à lobes arrondis. Sa face supérieure est lisse, gris bleuté à brun, et sa face inférieure est un peu ridée ou sillonnée, glabre et brun clair à la marge et un peu plus foncée vers le centre^{149,150,151} (Figure 24).



Figure 24 : Photographie de *Nephroma laevigatum* (© Mambu L., 2016)

Le genre *Nephroma* compte plus de 40 espèces, se ressemblant sur de nombreux points morphologiques mais différant sur la nature des métabolites secondaires qu'ils produisent¹⁵¹. En effet, certaines espèces vont produire par exemple majoritairement des anthraquinones, alors que d'autres majoritairement des triterpénoïdes¹⁵².

Les métabolites de *N. laevigatum* décrits actuellement sont peu nombreux : il a été identifié plusieurs anthraquinones telles que l'émodyne, la 7-chloroémodyne et d'autres dérivés chlorés, ainsi qu'une mycosporine décrite récemment^{153,154}.

L'émodyne et ses dérivés chlorés ont montré une activité anti-virale et notamment une activité anti-HSV1^{153,155,156}.

Des extraits de *N. laevigatum* (obtenus par extraction avec de l'acétone) ont déjà démontré des activités antiprolifératives modérées sur cellules humaines cancéreuses colorectales (HT-29) ainsi que des activités antibiofilm modérées sur une souche de *C. albicans*. Une absence d'effet antibiofilm de ces extraits sur *S. aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa* a également été décrit^{157,158}.

c. *Lasallia pustulata*

Lasallia pustulata est un lichen qui appartient à l'ordre des *Umbilicariales* et à la famille des *Umbilicariaceae* (Figure 25)¹⁵⁹. Il est retrouvé le long des côtes du sud de la Scandinavie sur des falaises, ou encore en France, plutôt en zone continentale, sur des rochers^{159,160}. C'est

une grande espèce foliacée à thalles arrondis attachés centralement¹⁶¹. Elle présente des pustules convexes visibles sur sa face supérieure, blanchâtres souvent pruineuses (d'où le nom de "*pustulata*")^{161,162}. Par temps sec, ce lichen est brun à gris blanchâtre et brunâtre à vert/jaune par temps humide avec de rares **apothécies** et des marges **d'isidies** noires qui croissent sur ou entre les pustules vers la périphérie (Figure 25 et 26)^{161,162}.



Figure 25 : Photographie de Lasallia pustulata, (©Gonnet Olivier, 2005)¹⁶²



Figure 26 : Photographie de *Lasallia pustulata* : Focus sur les pustules et isidies (©Gonnet Olivier, 2005)¹⁶²

En ce qui concerne sa composition chimique, *Lasallia pustulata* comporte notamment de l'acide gyrophorique, de l'umbiciline, du pustulan, de l'arabitol, du mannitol, du saccharose, du tréhalose, des enzymes ainsi que des acides aminés¹⁶¹. Cependant, il n'existe que très peu de données quant à ses activités pharmacologiques. Une étude de 2016 avec un extrait méthanolique de ce lichen a montré que ce dernier possédait un pouvoir antioxydant et une activité antimicrobienne modérée sur les souches testées de *B. subtilis*, *B. cereus* et *S. aureus* (activité plus faible que celle de l'acide ascorbique, le kétonazole et la streptomycine utilisés comme contrôles). Cependant aucun effet génotoxique ou anticancéreux sur les lymphocytes humains *in vitro* n'a été observé¹⁶¹. Une autre étude de 2007 a montré que *L. pustulata* possédait une activité antimicrobienne significative contre des bactéries Gram + (*Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *S. aureus*) et Gram – (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*) à l'exception d'*Escherichia coli* qui s'était montrée résistante¹⁶³.

d. *Cladonia uncialis*

Cladonia uncialis est un lichen appartenant à l'ordre des *Lecanorales* et à la famille des *Cladoniaceae*¹⁶⁴. Il est retrouvé sur le sol, l'humus, les mousses, les rochers, dans les landes

à bruyères ou les bois, principalement dans les lieux bien éclairés. Il est commun en Europe, en Amérique du Nord et en Asie^{164,165}. Son thalle est jaune-vert voire verdâtre avec des sommets pointus bruns¹⁶⁵ (Figure 27).



Figure 27 : Photographie de *Cladonia uncialis* (©Delhoume Arnaud, 2018)

Ce lichen produit des dibenzofuranes tels que l'acide usnique ainsi que des depsides comme l'acide squamatique et l'acide thamnolique¹⁶⁵. Un extrait de *C. uncialis* a déjà démontré une activité antibactérienne contre une souche de *S. aureus* et une activité antifongique contre *C. albicans* mais cette dernière restait tout de même inférieure à l'activité de l'amphotéricine B. Ces activités ont été expliquées par la présence de l'acide usnique, composé majoritaire dans l'extrait et reconnu pour ses activités antibiotique et antifongique^{165,166}.

e. *Pleurosticta acetabulum*

Ce lichen appartient à l'ordre des *Lecanorales* et à la famille des *Parmeliaceae*¹⁶⁷. *Pleurosticta acetabulum* est **corticole** c'est à dire poussant sur les écorces de troncs

principalement. On le retrouve sur les écorces de feuillus, sur des arbres isolés en bord de route, dans les vergers, les pâtures ou encore en forêts claires¹⁶⁷. C'est un lichen foliacé. Sa surface supérieure est de couleur brun-vert¹⁵⁸. Ses **apothécies** sont légèrement pédicellées, de grande taille et de couleur rouge-brun^{158,167} (Figures 28 et 29).



Figure 28 : Photographie de Pleurosticta acetabulum (©Danièle Lacoux, 2010)¹⁶⁷



Figure 29 : Photographie des apothécies de Pleurosticta acetabulum
(©Gavériaux Jean-Pierre, 2008)¹⁶⁷

P. acetabulum produit plusieurs métabolites dont les deux plus communs sont l'acide norstictique et l'acide connorstictique. D'autres métabolites plus minoritaires ont été décrits tels que la cytochalasine E, l'atranorine, la chloratranorine, l'acide salazinique, l'acide α -méthylestersalazinique et l'acide stictique¹⁵⁸. Un extrait de *Pleurosticta acetabulum* a démontré des propriétés anti-prolifératives sur des cellules cancéreuses colorectales humaines HT-29. Cette activité est attribuée à la cytochalasine E présente dans l'extrait¹⁵⁸.

IV. Les micro-organismes associés aux lichens

A. Une diversité microbienne associée

En plus de cette association mycobionte/photobionte formant le lichen, un ensemble d'organismes d'origines bactérienne et fongique vivent associés à ce lichen. La découverte de ce consortium a entraîné chez certains auteurs une évolution de la définition du lichen incluant alors aussi ces microorganismes associés¹²¹. Ainsi pour certains, les lichens seraient apparus au début de la vie terrestre et ce, à partir d'une association de cyanobactéries, champignons, et d'autres microorganismes s'organisant à la manière d'un biofilm¹⁶⁸.

Ces microorganismes sont retrouvés à l'intérieur et/ou à l'extérieur du lichen et sont alors qualifiés d'endolichéniques ou d'épilichéniques (ectolichéniques) respectivement^{169,170,171,172}. Ces organismes sont encore assez méconnus et étudiés depuis peu. Ils semblent contribuer à la symbiose lichénique en augmentant la résistance du lichen au stress environnant, en contribuant à l'apport en nutriments, en détoxifiant les métabolites et en éliminant les anciennes parties du thalle. Ils pourraient être aussi impliqués dans la défense du lichen contre ses pathogènes^{110,173}.

B. Les bactéries associées aux lichens

Les bactéries peuvent être présentes en grande quantité associées aux lichens. Il a été démontré que leur densité totale sur un lichen pouvait être 1000 fois plus élevée que celle trouvée à la surface d'une feuille. La diversité bactérienne peut également être importante. Il a par exemple été observé chez le lichen *Lobaria pulmonaria* une association avec plus de 800 espèces bactériennes¹¹⁵.

Les espèces bactériennes les plus représentées semblent appartenir à la classe des *Alphaproteobacteria*, suivie des classes des *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*¹¹⁵. Elles ne sont pas systématiquement spécifiques aux lichens et peuvent ainsi, pour certaines, être retrouvées dans d'autres milieux¹¹⁵.

Ces bactéries associées aux lichens sont capables de produire une large gamme de composés et certains de ces composés ont d'ores et déjà démontré des activités thérapeutiques¹⁷³. Par exemple, il est connu que les actinomycètes (ou *Actinobacteria*) produisent un grand nombre de métabolites secondaires potentiellement actifs. En effet, une

étude rapporte que sur 22 500 métabolites microbiens bioactifs analysés, presque la moitié d'entre eux sont dérivés d'actinomycètes, et en particulier du genre *Streptomyces*¹¹⁵. Une étude de 2005 évoque la production d'une cytokine appelée l'uncialamycine par *Streptomyces uncialis* (bactérie isolée du lichen *Cladonia uncialis*). Cette molécule a montré une activité antibactérienne contre une souche de *S. aureus*, *E. coli* et *Burkholderia cepacia*^{115,174}. Une autre étude de 2010 rapporte la production de nouvelles aminocoumarines antibiotiques : les coumabiocins A–F par *Streptomyces* sp. L-4-4 isolé du lichen *Cladonia gracilis*. *Streptomyces* sp. L-9-10 isolé du lichen *Platismatia glauca* est la source de quatre nouveaux analogues d'herbicidine aux propriétés antibactériennes¹¹⁵.

Cependant, on peut remarquer que les activités, la diversité ainsi que les rôles fonctionnels des métabolites secondaires provenant des bactéries associées aux lichens ne sont que peu élucidés. Il est vrai qu'à l'heure actuelle, la majorité des métabolites secondaires de la sphère lichénique décrits dans la littérature sont le plus souvent attribués au mycobionte ou au champignon endolichénique¹¹⁵.

Dans les paragraphes suivants, nous allons donc détailler les champignons endolichéniques, étant l'objet de mon travail de recherche lors de mon stage d'initiation à la recherche effectué au sein du laboratoire EBI.

C. Les champignons endolichéniques

Il existe plus de 13 500 espèces de champignons endolichéniques recensées¹⁷⁵. Ces champignons appartiennent pour la plupart aux Ascomycètes comme leurs homologues endophytes¹⁷⁶. Ils sont non pathogènes pour le lichen et sont physiologiquement et taxonomiquement différents des mycobiontes^{176,177,178,179}.

Bien qu'encore peu étudiés, les champignons endolichéniques sont une source potentielle de métabolites actifs qui mériterait d'être plus profondément explorée¹⁸⁰. Les métabolites décrits actuellement sont des alcaloïdes, composés phénoliques, stéroïdes, terpénoïdes, peptides dont certains ont déjà démontré des activités biologiques d'intérêt¹⁸⁰.

Par exemple concernant les terpénoïdes: des tricycloalternarènes, des diterpénoïdes, des sesquiterpènes et des sesterterpènes ont déjà été décrits^{181,182,183,184}. Certains de ces métabolites ont démontré une activité cytotoxique, des effets inhibiteurs modérés du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) et une activité inhibitrice de *C. albicans* planctonique^{181,183,184}.

Les alcaloïdes produits par des champignons endolichéniques identifiés dans la littérature sont peu nombreux. Peuvent être cités la chaetoglobosine Y (alcaloïde extrait du champignon endolichénique *Chaetomium globosum* isolé du lichen *Everniastrum nepalense*) dépourvue d'activité anticancéreuse sur les lignées de cellules cancéreuses humaines HCT-116 et le variécolortide (alcaloïde extrait du champignon endolichénique *Eurotium* sp. isolé du lichen *Cladonia grisea*) pourvu d'une activité inhibitrice de la caspase-3 (protéase jouant un rôle dans l'apoptose)^{180,185,186,187}.

Les nodulisporistéroïdes et la déméthoxyviridine sont des stéroïdes isolés de champignons endolichéniques du genre *Nodulisporium* sp.^{188,189}. Ces composés ont été testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et ont montré pour certains une activité proche de la mémantine (médicament anti-Alzheimer de référence)¹⁹⁰.

Concernant les composés phénoliques, les principaux issus de champignons endophytes sont des furanones, pyrones, quinones (anthraquinones) et xanthones^{185,191,192,193}. Deux anthraquinones (8-O-méthylversicolorine A et B) extraites du champignon endolichénique *Aspergillus versicolor* ont montré une faible activité cytotoxique contrairement aux phaeosphaerines A à F (autres anthraquinones) isolées du champignon endolichénique *Phaeosphaeria* sp. qui ont démontré une activité cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses^{185,194}.

Une nouvelle naphthalénone et une isocoumarine isolées du champignon endolichénique CR1546C de la famille des *Xylariaceae* sp. ont révélé une activité antifongique contre *C. albicans*¹⁹⁵.

Enfin, concernant les peptides, seulement deux composés ont été isolés de champignons endolichéniques. Il s'agit de deux pentapeptides cycliques isolés de champignons du genre *Xylaria* sp. Un des deux composés a démontré une activité antifongique contre *C. albicans* en synergie avec le kétoconazole¹⁹⁶.

Au regard de cette littérature et des précédents résultats obtenus au laboratoire, il semblait donc pertinent de s'intéresser aux champignons endolichéniques de deux des cinq lichens étudiés: *E. prunastri* et *N. laevigatum*.

D. Les champignons endolichéniques issus des lichens *E. prunastri* et *N. laevigatum*

A l'heure actuelle, peu d'études évoquent les différents champignons endolichéniques retrouvés dans le lichen *E. prunastri*. Une de ces études datée de 2018 décrit la présence de *Sordaria fimicola*, *Preussia persica*, *Coniochaeta lignicola*, *Nemania serpens* ainsi que *Nemania aenea*, *Anthostomella pinea*, *Xylaria longipes* et *Trametes versicolor*¹¹⁴.

Coniochaeta lignicola, *Xylaria longipes*, *Sordaria fimicola*, *Nemania serpens* et *aenea* ainsi que *Anthostomella pinea* font partis de la classe des *Sordariomycetes*, *Trametes versicolor* fait partie de la classe des *Basidiomycetes*, et *Preussia persica* appartient aux *Dothideomycetes*. In fine, la plupart des champignons endolichéniques retrouvés dans *E. prunastri* font partis de la classe des *Sordariomycetes*¹¹⁴.

Quelques études rapportent des effets pharmacologiques de certains de ces champignons endolichéniques. Par exemple, le genre *Preussia* a précédemment démontré une activité antimicrobienne contre *S. aureus* résistant à la méticilline ainsi qu'une activité antifongique contre *C. albicans*¹¹⁴.

Concernant *N. laevigatum*, les champignons endolichéniques retrouvés en majorité sont *Nemania serpens* et *Nemania aenea* var. *aureolatum*¹⁵⁷. Sont retrouvés, en plus du genre *Nemania*, les genres *Daldinia*, *Coniochaeta*, et *Peziza*¹⁵⁷. Ces derniers font partis de la classe des *Sordariomycetes* pour les genres *Daldinia* et *Coniochaeta* et *Pezizomycetes* pour le genre *Peziza*. Le genre *Nemania* est le plus représenté dans le lichen *N.laevigatum*¹⁵⁷.

Concernant des activités pharmacologiques décrites dans la littérature, l'espèce *Nemania serpens* a déjà démontré une activité antiproliférative intéressante contre des cellules humaines cancéreuses colorectales HT-29 et HCT-116 et contre des cellules humaines cancéreuses prostatiques PC-3 et DU145¹⁵⁷.

Ainsi, deux de ces champignons endophytes : *Nemania serpens* et *Nemania aenea* var. *aureolatum* et les cinq lichens précédemment présentés ont été l'objet de l'étude à laquelle je me suis attelée lors de mon stage d'initiation à la recherche réalisé du 17 mai au 17 juin 2016. Cette étude va vous être présentée dans le chapitre suivant.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Travaux antérieurs et objectifs

J'ai donc intégré le laboratoire EBI, équipe MDE dans le cadre de mon stage d'initiation à la recherche réalisé du 17 mai au 17 juin 2016. Ce stage avait pour objectif de poursuivre des travaux commencés quelques temps auparavant en collaboration avec des chercheurs du laboratoire de pharmacognosie de Limoges, spécialistes des lichens et de leurs champignons endophytes. Avant mon arrivée, un screening des effets de 40 extraits lichéniques acétoniques a été réalisé contre différentes étapes de développement du biofilm de *Candida albicans*. Parmi ces 40 extraits, plusieurs ont démontré des activités anti-biofilm significatives dont les extraits issus de deux lichens en particulier : *Evernia prunastri* (concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) anti-développement du biofilm = 50 µg/mL) et *Nephroma laevigatum* (CI₅₀ anti-développement = 6,25 µg/mL).

De ces premiers résultats, 3 axes de poursuite ont alors été déduits et réalisés à Limoges:

- La confection d'extraits à partir d'autres solvants d'extraction des deux lichens les plus actifs afin de voir l'impact du solvant d'extraction sur l'activité biologique. Il m'a donc été confié la tâche d'évaluer l'activité anti-développement du biofilm de *C. albicans* d'extraits méthanolique et dichlorométhane de *Nephroma laevigatum* (et d'utiliser l'extrait acétonique comme témoin de référence).
- La culture, l'isolement et l'extraction des champignons associés à ces deux lichens. Le champignon endophyte *Sordaria fimicola* a alors été isolé du lichen *Evernia prunastri*, et les champignons *Nemania serpens* (deux génotypes) ainsi que *Nemania aena var aureolatum* (quatre génotypes) ont été isolés du lichen *Nephroma laevigatum*. Afin d'obtenir les composés chimiques produits par ces champignons, ceux-ci ont été placés sur différents milieux de culture puis ces milieux ont été extraits à l'acétone aboutissant à l'obtention de six extraits pour *Sordaria fimicola*, deux extraits pour *Nemania serpens* et quatre extraits pour *Nemania aena var aureolatum*. Mon objectif a été d'évaluer l'activité anti-développement du biofilm de ces extraits fongiques.
- Enfin l'isolement de composés purs à partir des extraits lichéniques actifs mis en évidence lors du screening. Ainsi cinq molécules ont été obtenues: l'acide pseudoévernique, l'acide gyrophorique, l'acide norstictique, l'acide thamnolique et l'acide usnique. Mon objectif a alors été d'évaluer l'activité anti-développement du

biofilm de *C. albicans* et hémolytique (afin de vérifier une absence de toxicité cellulaire) de ces composés.

Je me suis donc appliquée à la réalisation de ces 3 objectifs.

II. Matériels et méthodes

A. Extraits et composés issus de lichens et de champignons endolichéniques

Tous les extraits ont été obtenus par les chercheurs du laboratoire de pharmacognosie de Limoges puis envoyés au laboratoire EBI de Poitiers pour évaluation biologique. Pour l'axe 1, trois extraits ont été réceptionnés à Poitiers : les extraits méthanolique, dichlorométhane et acétonique de *Nephroma laevigatum*. Ces extraits ont été obtenus par macération de poudre du lichen dans les différents solvants puis évaporation à sec à l'évaporateur rotatif.

Concernant l'axe 2, six extraits issus de *Sordaria fimicola* (champignon endophyte présent dans le lichen *Evernia prunastri*) ont été réceptionnés. Ces six extraits ont été obtenus par développement du champignon sur six milieux de culture différents: MEA (Malt Extract Agar), Mix, PDA (Potato Dextrose Agar), Sabouraud, CMA (Corn Meal Agar) et Riz pendant 25 jours. Puis ces milieux ont été extraits par de l'acétate d'éthyle puis les extraits obtenus ont été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Deux extraits de *Nemania serpens* (génotypes 1 et 2) et quatre extraits de *Nemania aena* var. *aureolatum* (génotypes 1, 2, 3 et 4) (champignons endophytes présents dans le lichen *Nephroma laevigatum*) ont été également reçus. Ils ont été obtenus par culture des champignons pendant 21 jours en milieu PDA puis extraction du milieu à l'acétate d'éthyle et évaporation à sec¹⁹⁷.

Concernant l'axe 3, cinq composés purs ont été réceptionnés:

- L'acide pseudoévernique et l'acide évernique isolé du lichen *Evernia prunastri*
- L'acide gyrophorique isolé du lichen *Lasallia pustulata*
- L'acide usnique isolé du lichen *Cladonia uncialis*
- L'acide norstictique isolé du lichen *Pleurosticta acetabulum*

Ces composés ont été obtenus par précipitation ou fractionnement chromatographique¹⁹⁸.

B. Evaluation de l'activité anti-développement du biofilm de *C. albicans*

a. *Organisme et conditions de culture*

(1) Souche utilisée

La souche de *Candida albicans* ATCC 28367® provenant de l'American Type Culture Collection (à Manassas aux Etats-Unis) a été utilisée.

(2) Conditions de culture

Les cultures de *C. albicans* ont été réalisées sur milieu gélosé de Sabouraud supplémenté en chloramphénicol et incubées à 37°C pendant 24h.

Pour obtenir le biofilm, des colonies de levures provenant de cette culture après incubation ont été prélevées puis transférées dans 30mL de milieu YNB (Yeast Nitrogen Base) enrichi de 50 mM de glucose (YNB-Glc). Cette suspension a ensuite été incubée à 37°C pendant une nuit.

b. *Préparation du fluide buccal*

Du fluide buccal non stimulé prélevé sur 12 volontaires sains a été rassemblé, traité par du dithiothréitol (2,5 mmol/L), agité dans la glace pendant 10 min, centrifugé pendant 20 min à 3000 g et 4 °C, dilué dans trois volumes d'eau distillée (25 %) et enfin filtré à travers une membrane de 0,45 µm. Cette solution mère a été stockée à -80°C.

c. *Test anti-développement*

Après incubation d'une nuit, la suspension de levures précédemment préparée a été centrifugée à 2000 RPM pendant 10 minutes à 25°C. Le surnageant a été éliminé, et le culot a été lavé avec du PBS. Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, le surnageant a, à nouveau, été éliminé et le culot obtenu a été re-suspendu dans du milieu YNB-Glc. Cette culture ainsi obtenue a été portée à une concentration de 1.10^7 cellules/mL après comptage sur cellules de KOVA.

Des microplaques 96 puits non traitées ont ensuite été prétraitées par 200 µL de fluide buccal humain à 2%, obtenu par dilution de la solution mère dans de l'eau distillée, incubées 1 h à 37 °C, puis entièrement aspirées avant production de biofilms ; ce prétraitement a pour rôle notamment de recréer le revêtement présent sur les parois buccales (des biofilms de *Candida* pouvant être retrouvés dans la bouche, sur des prothèses dentaires) et surtout de favoriser l'adhérence des levures au fond des puits. Après aspiration, 200 µL de culture de *C. albicans* à 1.10^7 cellules/mL ont été ajoutés dans les puits et les microplaques ont à nouveau été incubées 2h à 37°C.

Pendant ce temps, une autre microplaque 96 puits a été utilisée pour la préparation des dilutions des produits à tester. Pour cela ont été ajoutés 194 µL de YNB-Glc dans la première colonne de la microplaque, et 110 µL de YNB-Glc dans tous les autres puits de la microplaque. 26,5 µL de produits (à partir d'une solution stock à 10 mg/mL dans du DMSO de chaque extrait de lichens, de champignons endolichéniques ou composé isolé à tester) ont ensuite été ajoutés dans la première colonne de la microplaque. Des dilutions en série au ½ ont été effectuées afin d'obtenir des concentrations finales allant de 200 µg/mL à 0,09 µg/mL. A noter que des lignes de puits sont réservés pour des contrôles négatifs (contenant uniquement de la culture non traitée), et un contrôle avec du DMSO 2% est également réalisé afin de vérifier son innocuité.

Après 2h d'incubation, les microplaques contenant les cultures subissent des lavages successifs au PBS afin d'éliminer les levures non adhérentes et les déchets présents dans le milieu. 250 µL de YNB-glucose ont ensuite été ajoutés dans chaque puits ainsi que 50 µL de chaque dilution de produit à tester. Les microplaques ont ensuite été incubées pendant 24h ou 48h à 37°C (Figure 30, 1)).

Après 24h ou 48h d'incubation, le milieu de culture est aspiré et plusieurs lavages au PBS sont effectués afin d'éliminer les levures planctoniques et déchets présents dans le milieu. Les microplaques sont ensuite observées au microscope inversé avant de quantifier le biofilm à l'aide de l'essai métabolique basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium (XTT). Ainsi, 300 mg/L de XTT et 0,13 mM de ménadione ont été ajoutés dans 200 µL de PBS dans chaque puits. Les plaques ont été incubées pendant 2h30 à 37 °C sans agitation. Le XTT sous l'action des enzymes mitochondriales se transforme en formazan dont l'absorbance est mesurée par colorimétrie à 450 nm et à 620 nm. De ce fait, seules les levures qui possèdent une activité métabolique sont mises en évidence (Figure 30, 2)). Tous les tests ont été effectués en dupliqua dans au moins deux expériences distinctes. La concentration qui a inhibé 50% du développement du biofilm (CI_{ad50}) a été déterminée pour chaque échantillon testé en construisant une courbe dose-réponse et en sélectionnant la plus proche valeur de concentration testée supérieure ou égale à 50 % d'inhibition.

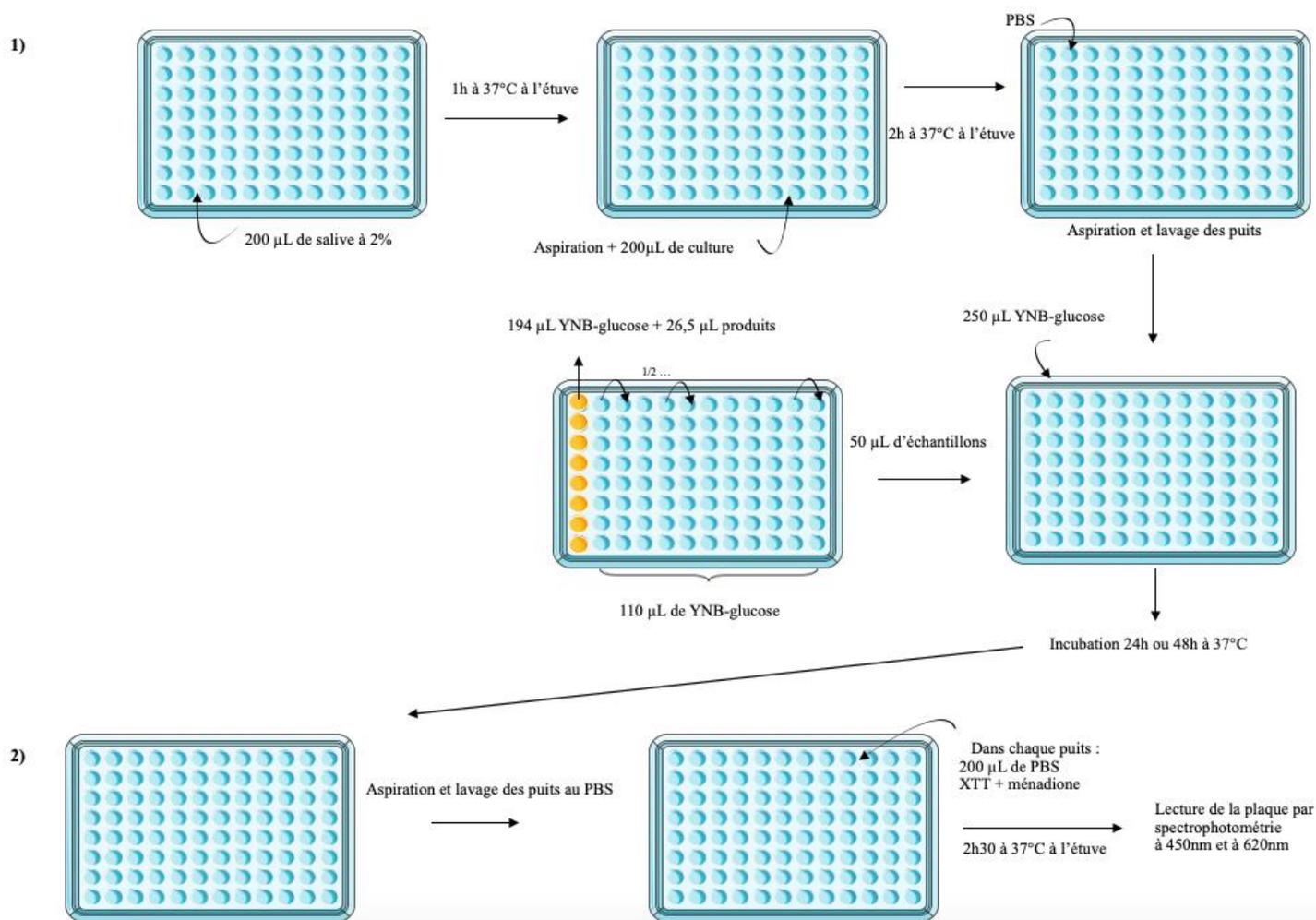


Figure 30 : Schéma récapitulatif du test anti-développement du biofilm de *C. albicans*.

C. Évaluation de l'activité hémolytique

Dans un premier temps, 980 µL de sérum physiologique ont été ajoutés à 20 µL d'échantillon à tester (solutions stocks précédentes à 10 mg/mL dans du DMSO) dans un tube Eppendorf pour constituer le premier point de gamme. Puis dans les 9 autres tubes, 500 µL de sérum physiologique ont été ajoutés et une dilution en série est effectuée au 1/2.

Dans un second temps, 20 µL de sang EDTA ont été mis en contact de 480 µL de la gamme précédemment réalisée dans des tubes Eppendorf (hématocrite à 4%, concentrations finales 100 µg/mL à 0,78 µg/mL). Deux autres tubes ont été réservés pour mettre en contact 20 µL de sang EDTA à 480 µL d'eau distillée (témoin 100% hémolyse) ou 480 µL de sérum physiologique (témoin 0% hémolyse). Les tubes sont incubés 1h à 37°C. Après incubation, ces derniers sont centrifugés à 14 000 g. 200 µL de surnageant de chaque tube est transvasé dans

une microplaque 96 puits et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 450 nm (Figure 31). Le pourcentage d'hémolyse est ensuite déterminé. Chaque test n'a été réalisé qu'une seule fois.

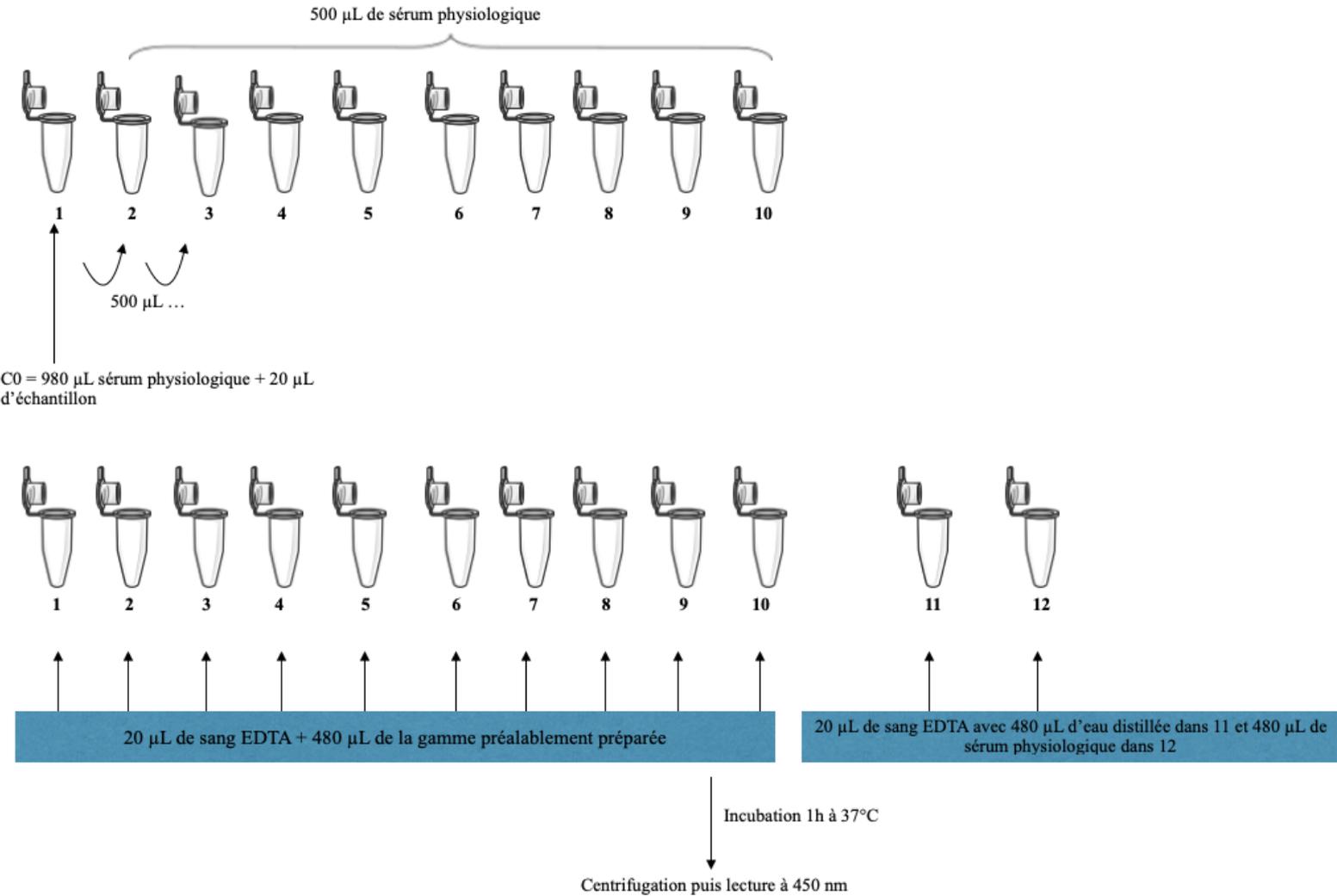


Figure 31 : Schéma récapitulatif du test de mesure de l'activité hémolytique

III. Résultats

A. Activité anti-développement du biofilm de *C. albicans*

a. Extraits du lichen *Nephroma laevigatum*

Afin de voir si un changement de solvant d'extraction améliore l'activité anti-développement précédemment observée avec l'extrait acétonique de *Nephroma laevigatum*, deux autres extraits ont été évalués sur 24h et 48h. L'extrait acétonique sert ici de contrôle. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.

Extraits testés	CI _{ad} 50 (µg/mL)	
	24h	48h
Extrait méthanolique	12,5	6,25
Extrait dichlorométhane	6,25	6,25
Extrait acétonique	50	50

Tableau 1: Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad}50) des extraits de *Nephroma laevigatum* après 24h ou 48h de traitement (n=2)

Tout d'abord on peut noter que l'extrait acétonique semble moins actif lors de ces tests puisque les précédents résultats démontraient une activité à 24 et 48h de 6,25 µg/mL alors qu'ici les CI_{ad}50 sont de 50 µg/mL. Cela pourrait s'expliquer par plusieurs éléments comme le changement de manipulateur ou une dégradation éventuelle de l'échantillon.

Les deux autres extraits inhibent à 50% le développement à des concentrations entre 6,25 et 12,5 µg/mL donc plus faibles que celles de l'extrait acétonique de cette expérience. Les effets sont observables dès 24h et perdurent à 48h.

Deux conclusions sont donc possibles:

- En tenant compte de l'activité précédente de l'extrait acétonique, on peut observer que l'activité est conservée quel que soit le solvant utilisé. Un changement de solvant n'améliore pas l'activité.
- En ne tenant compte que des résultats présents, il semblerait qu'une extraction par le méthanol ou le dichlorométhane pourrait améliorer l'activité probablement par

l'entraînement d'autres composés actifs ou l'augmentation de la concentration au sein des extraits des composés responsables de l'activité.

Mais pour confirmer cela, une répétition de ces manipulations est nécessaire ainsi que l'analyse de la composition chimique de ces extraits pour étudier leurs différences et similitudes.

b. *Extraits du champignon endophyte Sordaria fimicola*

Les extraits du champignon endophyte *Sordaria fimicola* (champignon isolé du lichen *Evernia prunastri*) après culture sur six milieux différents ont été évalués contre le développement du biofilm de *C. albicans*. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 2).

Extraits testés	CI _{ad50} (µg/mL)	
	24h	48h
PDA	200	12,5
MEA	>200	25
Riz	200	200
Mix	>200	50
Sab	25	6,25
CMA	>200	50

Tableau 2 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des extraits de *Sordaria fimicola* après 24h ou 48h de traitement (n = 3)

Seul l'extrait obtenu après culture sur milieu de Sabouraud (Sab) présente une activité inhibitrice à faible concentration (CI_{ad50}=25 µg/mL) dès 24h de traitement. Son activité s'améliore même après 48h de traitement (CI_{ad50}=6,25 µg/mL).

Quatre autres extraits (PDA, MEA, Mix et CMA) ont démontré une activité inhibitrice après 48h de traitement (CI_{ad50} entre 50 µg/mL et 12,5 µg/mL) le plus actif étant l'extrait PDA (CI_{ad50}= 12,5 µg/mL). Ces extraits nécessitent donc un temps de contact plus long pour exercer leur effet inhibiteur. L'extrait Riz présente une activité à des concentrations plus élevées (CI_{ad50}= 200 µg/mL) quel que soit le temps de traitement.

c. *Extraits des champignons endophytes Nemanía sp.*

Les extraits des champignons endophytes *Nemanía aena var aureolatum* et *Nemanía serpens* (champignons isolés du lichen *Nephroma laevigatum*) ont été évalués contre le développement du biofilm de *C. albicans*. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 3).

Extraits testés	CI _{ad50} (µg/mL)	
	24h	48h
<i>Nemanía aena var aureolatum</i> (génotype 1)	200	50
<i>Nemanía aena var aureolatum</i> (génotype 2)	50	200
<i>Nemanía serpens</i> (génotype 2)	200	50
<i>Nemanía serpens</i> (génotype 2)	>200	200
<i>Nemanía serpens</i> (génotype 3)	200	200
<i>Nemanía serpens</i> (génotype 4)	>200	>200

Tableau 3 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des extraits de *Nemanía aena var aureolatum* et de *Nemanía serpens* après 24h ou 48h de traitement (n = 3)

L'extrait de *Nemanía aena var aureolatum* génotype 2 présente une CI_{ad50} de 50 µg/mL dès 24h puis l'activité diminue à 48h de traitement (CI_{ad50} = 200 µg/mL). Les extraits de *Nemanía aena var aureolatum* génotype 1 et de *Nemanía serpens* génotype 2 nécessitent un temps de contact d'au moins 48h pour exercer un effet à une concentration plus modérée (CI_{ad50} de 50 µg/mL à 48h versus 200 µg/mL à 24h). Cependant on peut remarquer que ces activités sont globalement modérées, les CI_{ad50} n'étant pas inférieures à 50 µg/mL.

Les autres extraits de *Nemanía serpens* n'ont pas démontré d'activité remarquables après 24 ou 48 h de contact (CI_{ad50} ≥ 200 µg/mL).

d. *Composés lichéniques isolés*

Dans le temps imparti au stage, seuls 3 composés parmi les 5 réceptionnés ont pu être testés contre le développement du biofilm de *C. albicans*. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 4)

Composés testés	CI _{ad50} (µg/mL)	
	24h	48h
Acide gyrophorique ^a	>200	100
Acide pseudoévernique ^b	100	6,25
Acide évernique ^a	200	12,5

Tableau 4 : Concentration inhibitrice anti-développement à 50% (CI_{ad50}) des composés lichéniques isolés; a: (n=3), b: (n=2)

L'acide pseudoévernique et évernique, isomères l'un de l'autre, présentent des activités du même ordre: CI_{ad50} de 100 et 200 µg/mL respectivement après 24h de traitement puis 6,25 et 12,5 µg/mL respectivement après 48h. 48h de traitement sont donc nécessaires pour atteindre un effet à faibles concentrations.

Bien que s'améliorant avec le temps, l'activité de l'acide gyrophorique reste faible (CI_{ad50} ≥ 100 µg/mL).

B. Activité hémolytique

Dans le temps imparti au stage, seule l'activité hémolytique de 3 composés parmi les 5 réceptionnés a pu être déterminée. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 5).

Composés testés	Activité hémolytique (%) à 100 µg/mL
Acide gyrophorique	0,5
Acide usnique	0
Acide norstictique	0,7

Tableau 5 : Activité hémolytique à 100 µg/mL des composés purs obtenus à partir d'extraits lichéniques (n=1)

Ces 3 composés n'ont pas induit (0 %) ou ont induit une très faible hémolyse (0,5 et 0,7%) des globules rouges à la plus forte concentration testée (100 µg/mL).

IV. Discussion et perspectives

a. *Extraits du lichen Nephroma laevigatum*

Des résultats contradictoires ont été obtenus avec l'extrait acétonique utilisé comme contrôle ne permettant pas de conclure simplement. Selon si on tient compte ou non des résultats précédemment obtenus avec cet extrait, le solvant d'extraction pourrait avoir un impact sur les activités anti-développement observées (les extraits méthanolique et dichlorométhane du lichen *Nephroma laevigatum* sembleraient plus actifs que l'extrait acétonique) ou au contraire n'aurait pas d'effet d'amélioration d'activité (mais maintiendrait quand même une activité du même ordre). Ainsi n'ayant procédé qu'à deux répétitions, il est donc nécessaire de répéter cette manipulation afin de confirmer ces résultats et d'étudier la composition chimique de ces extraits (réaliser des profils chimiques par chromatographie liquide haute performance seule et/ou couplée à de la spectrométrie de masse) afin de comprendre les différences d'activités observées. Dans tous les cas, il serait intéressant de poursuivre la recherche de

molécules actives à partir des extraits ayant une CI_{ad} 50 à 6,25 $\mu\text{g/mL}$ en procédant à leur fractionnement et purification.

On peut noter que dans la littérature, il a déjà été démontré un impact du solvant d'extraction sur les activités biologiques. Par exemple une étude datant de 2016 a démontré l'importance du choix des solvants d'extraction par rapport au rendement et à l'activité antioxydante : les rendements varient d'un rapport de 3 selon le solvant choisi et l'activité antioxydante est plus importante avec l'extrait acétone 70% qu'avec les extraits acétone ou méthanol purs, faisant des solvants une variable à prendre en compte¹⁹⁹.

b. *Extraits des champignons endophytes Sordaria fimicola et Nemaniasp.*

Concernant les extraits de *Sordaria fimicola* testés, seul l'extrait obtenu après culture sur milieu de Sabouraud semble présenter une efficacité dès 24h de traitement et à plus faibles concentrations. Ce milieu semble permettre la production par le champignon des composés les plus actifs. Il faudrait donc par la suite le sélectionner et réaliser des cultures à grande échelle afin d'obtenir suffisamment d'extrait pour étudier sa composition chimique et isoler les composés responsables de l'activité.

Les extraits du lichen *Evernia prunastri* dont a été isolé ce champignon, ont précédemment démontré une activité anti-développement CI_{ad50} de 25 $\mu\text{g/mL}$ à 24h et 1,56 $\mu\text{g/mL}$ à 48h . On peut donc noter des résultats d'activité proches entre le lichen et son champignon associé. Le champignon pourrait être à l'origine des composés responsables de l'activité retrouvée dans l'extrait lichénique. L'étude de la composition chimique de l'extrait Sabouraud précédemment évoquée pourrait donner des pistes afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Une autre piste de perspective serait de tester l'extrait Sabouraud sur un biofilm mature afin de déterminer si l'extrait est aussi bien actif sur un biofilm en développement que sur un biofilm déjà formé.

Les extraits de *Nemaniasp.* présentent en globalité une activité modérée d'inhibition. De plus, on peut remarquer que ces extraits de champignons semblent moins actifs que les extraits du lichen *Nephroma laevigatum* dont sont issus ces derniers (CI_{ad50} [200-50] versus [50-6,25] $\mu\text{g/mL}$). On peut donc en déduire que la présence de ces champignons ne semblent pas expliquer complètement l'activité retrouvée avec le lichen. Au vu des résultats obtenus, il serait plus intéressant de se tourner vers d'autres champignons isolés de *Nephroma* afin d'étudier leur potentiel anti développement du biofilm de *C. albicans*.

c. *Évaluation des activités anti développement et hémolytique des composés lichéniques isolés*

Concernant les composés lichéniques testés, l'acide pseudoévernique et l'acide évernique semblent être les composés les plus actifs contre le développement du biofilm de *C. albicans* avec des CI_{ad50} de 6,25 et 12,5µg/mL respectivement à 48h de traitement. Il serait intéressant de voir si cet effet est retrouvé également contre un biofilm mature, plus difficile à traiter. Des tests sur d'autres souches de *Candida albicans*, notamment des souches cliniques, sont à envisager avec ces deux composés. Si les activités sont retrouvées, des observations en microscopie électronique et à balayage pourront donner des compléments d'information sur les mécanismes d'action de ces composés. Actuellement, la littérature rapporte pour l'acide évernique une potentielle capacité d'inhibition des systèmes de *quorum sensing* de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres effets biologiques lui sont également attribué comme des effets antioxydants ou antiprolifératifs^{118,200}.

Les deux autres composés n'ayant pas pu être testés contre le développement du biofilm de *C. albicans* lors de mon stage l'ont été après mon départ. Ainsi, l'acide usnique et l'acide norstictique n'ont pas présenté d'activité anti développement à faible concentration (CI_{ad50} >200 ug/mL pour 24h et 48h).

Enfin, les 3 composés testés n'ont pas entraînés d'hémolyse lors du test hémolytique ou alors à des taux très faibles (<1%). Ces tests n'ayant été effectués qu'une seule fois, ils ont été répétés ultérieurement et les résultats ont permis de confirmer l'absence d'effet hémolytique de ces 3 composés. Les deux composés non évalués lors de ce stage l'ont été par la suite et n'ont également présenté aucune activité hémolytique (0% d'hémolyse pour l'acide pseudoévernique et l'acide évernique). Ainsi aucun des 5 composés isolés n'ont présenté d'activité toxique sur cellule sanguine. Il serait maintenant intéressant de les tester sur d'autres cellules telles que les cellules Hela afin de confirmer leur absence de toxicité cellulaire dans un contexte d'usage en thérapeutique.

En croisant avec les résultats des tests anti développement, il convient donc de retenir l'acide évernique et pseudoévernique pour des expériences complémentaires sur le biofilm de *C. albicans* étant donné que l'acide gyrophorique, norstictique et usnique n'ont pas présenté d'effets anti développement à faible concentration.

En perspective à plus long terme, des tests de synergie de l'acide évernique et pseudoévernique avec des antifongiques conventionnels pourraient être envisagés en fonction des mécanismes d'action observés.

CONCLUSION

Le champignon levuriforme *Candida albicans* est un commensal de l'homme mais il peut devenir dans certaines conditions un pathogène à l'origine de candidoses pouvant être plus ou moins graves. Ce microorganisme a la capacité de former des biofilms sur des surfaces biotiques (organes par exemple) ou abiotiques (comme des dispositifs médicaux). Cette forme de vie est un facteur de résistance aux thérapeutiques actuelles, conduisant à des échecs thérapeutiques de plus en plus fréquents. C'est pourquoi la recherche de nouvelles stratégies afin de pallier à ce problème de santé publique est nécessaire.

Les lichens, organismes symbiotiques, ainsi que leurs microorganismes associés, constituent une source importante de composés. Ces composés ont déjà démontré des effets antimicrobiens et pourraient alors constituer une autre voie de traitement alternatif à développer.

Durant mon stage d'initiation à la recherche, j'ai donc été amenée à m'atteler à trois objectifs, c'est à dire : l'évaluation de l'activité anti développement du biofilm de *Candida albicans* i) de différents extraits du lichen *Nephroma laevigatum*, ii) de différents extraits de champignons endolichéniques isolés des lichens *Evernia prunastri* et *Nephroma laevigatum*, et enfin iii) de différents composés lichéniques isolés d'extraits de lichens. Pour cette dernière partie, j'ai également eu comme objectif de tester l'activité hémolytique des composés lichéniques isolés afin de vérifier l'absence de toxicité cellulaire.

Parmi les extraits et produits testés et présentés dans ce rapport, deux extraits de *Nephroma laevigatum* : l'extrait dichlorométhane et l'extrait méthanolique, se sont montrés efficaces. Ces deux extraits seront à l'avenir obtenus en plus grosse quantité afin d'étudier leur composition chimique et de mettre en évidence les composés responsables de l'activité.

Parmi les extraits du champignon endolichénique *Sordaria fimicola* qui ont été testés, seul l'extrait obtenu après culture sur milieu Sabouraud (Sab) a présenté un effet anti développement à faible concentration et ce dès 24h de contact.

Ces résultats suggèrent :

- Que le milieu Sabouraud est le plus optimum pour l'obtention des métabolites actifs
- Que les milieux de culture influencent la production des métabolites
- Que les activités anti développement observées chez le lichen pourraient être liées à ce champignon endolichénique. Une étude de la composition chimique des extraits lichéniques et fongiques pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Les extraits des champignons endolichéniques du genre *Nemania sp.* ont quant à eux démontré une faible activité anti développement. Leur étude ne sera donc pas poursuivie.

Enfin, les produits isolés d'*Evernia prunastri* : l'acide pseudoévernique et l'acide évernique, ont démontré un effet anti développement de *C. albicans* à faible concentration. Ces deux produits ont été testés après mon départ pour leur activité hémolytique et n'ont montré aucune activité d'hémolyse. Ainsi ils semblent donc prometteurs et ont été sélectionnés pour des tests complémentaires dans un but de constituer une alternative thérapeutique possible aux traitements conventionnels face aux biofilms de *Candida*. Les autres composés isolés ne semblent pas actifs contre le développement du biofilm mais ne présentent pas non plus d'activité hémolytique ce qui pourrait permettre de les valoriser contre d'autres cibles biologiques.

Ce stage m'a permis de découvrir une autre facette du métier de pharmacien, c'est à dire le volet recherche et développement de nouveaux médicaments. J'ai beaucoup apprécié ces quelques semaines d'initiation à la recherche, et remercie encore l'équipe MDE du laboratoire EBI de Poitiers de m'avoir permis d'effectuer ce stage.

Bibliographie

1. Arendrup, M. C. *et al.* Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4434–40 (2005).
2. Nobile, C. J. & Johnson, A. D. Candida albicans Biofilms and Human Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 71–92 (2015).
3. Lackner, M. *et al.* Positions and numbers of FKS mutations in Candida albicans selectively influence In Vitro and In Vivo susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3626–3635 (2014).
4. Mathé, L., Patrick, • & Dijk, V. Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms. (2013).
5. ANOFEL-Candidoses-(2014). Available at: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/candidoses/site/html/cours.pdf>.
6. Ruhnke, M. Epidemiology of Candida albicans Infections and Role of Non-Candida albicans Yeasts. *Curr. Drug Targets* **7**, 495–504 (2006).
7. Dadar, M. *et al.* Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microb. Pathog.* **117**, 128–138 (2018).
8. And, C. & Immunology, V. Characterization of the Immune Status of CD8 T Cells in Oral Lesions of Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons with Oropharyngeal Candidiasis. **13**, 678–683 (2006).
9. Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N. & Fries, B. C. Biofilm formation in clinical Candida isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* **11**, 753–761 (2009).
10. Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D. & Nobile, C. J. Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 19–31 (2018).
11. Mendes Giannini, M. J. S., Bernardi, T., Scorzoni, L., Fusco-Almeida, A. M. & Sardi, J. C. O. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **62**, 10–24 (2013).
12. Sardi, J. C. O., Almeida, A. M. F. & Mendes Giannini, M. J. S. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—A brief review. *Arch. Oral Biol.* **56**, 951–959 (2011).
13. White, T. C., Marr, K. A. & Bowden, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382–402 (1998).

14. Muggia, L., Schmitt, I. & Grube, M. Lichens as treasure chests of natural products. *SIM News* 85–97 (2009).
15. Millot, M., Girardot, M., Dutreix, L., Mambu, L. & Imbert, C. Antifungal and Anti-Biofilm Activities of Acetone Lichen Extracts against *Candida albicans*. *Molecules* **22**, (2017).
16. Wilson, D. *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **27**, 188–189 (2019).
17. Lockhart, S. R. & Guarner, J. Emerging and reemerging fungal infections. *Semin. Diagn. Pathol.* **36**, 177–181 (2019).
18. Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 772–785 (2003).
19. Bassetti, M. *et al.* Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect. Dis.* **6**, 1–6 (2006).
20. Ahariz, M., Loeb, I. & Courtois, P. Candidoses orales et prothèses dentaires Oral candidosis and dentures. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **111**, 74–78 (2010).
21. Mcmanus, B. A. & Coleman, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. (2013).
22. Armstrong-James, D. Invasive *Candida* species infection: the importance of adequate empirical antifungal therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 459–460 (2007).
23. Sardi, J. C. O. *et al.* *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J. Oral Sci.* **52**, 177–185 (2010).
24. Institut Pasteur. *Candida* : informations et traitements (2011).
25. Neppelenbroek, K. H. *et al.* Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* **20**, 329–344 (2014).
26. Sanguinetti, M., Posteraro, B. & Lass-Flörl, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses* **58**, 2–13 (2015).
27. Tortorano, A. M. *et al.* Epidemiology of candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 317–322 (2004).
28. Poissy, J. Physiopathologie des candidoses invasives Pathophysiology of Invasive Candidiasis. (2015).
29. Segrelles-Calvo, G. *et al.* *Candida* spp. co-infection in COVID-19 patients with severe pneumonia: Prevalence study and associated risk factors. *Respir. Med.* **188**, (2021).
30. Kullberg, B. J. *et al.* European expert opinion on the management of invasive candidiasis in adults. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1–12 (2011).

31. Lim, C. S. Y., Rosli, R., Seow, H. F. & Chong, P. P. Candida and invasive candidiasis: Back to basics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 21–31 (2012).
32. Sardi, J. C. O. *et al.* Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **62**, 10–24 (2013).
33. Bodey, G. P. *et al.* The epidemiology of Candida glabrata and Candida albicans fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am. J. Med.* **112**, 380–385 (2002).
34. Samaranayake, L. P. *et al.* Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis.* **8 Suppl 2**, 151–60 (2002).
35. Valeix, N. *PrépaPharma : Parasitologie - Mycologie.* (2016).
36. Gonçalves, B. *et al.* Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**, 905–927 (2016).
37. Nobile, C. J., Bruno, V. M., Richard, M. L., Davis, D. A. & Mitchell, A. P. Genetic control of chlamyospore formation in Candida albicans. *Microbiology* **149**, 3629–3637 (2003).
38. Böttcher, B., Pöllath, C., Staib, P., Hube, B. & Brunke, S. Candida species rewired hyphae developmental programs for chlamyospore formation. *Front. Microbiol.* **7**, 1–17 (2016).
39. Finkel, J. S. & Mitchell, A. P. Genetic control of Candida albicans biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 109–18 (2011).
40. Segretain, G., Drouhet, E. & Mariat., F. *Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale.* (Maloine1. Segretain G, Drouhet E, Mariat. F. Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale. 5e édition. Maloine; 1987. 150 p., 1987).
41. Ripert, C. *Mycologie médicale.* (Lavoisier, 2013).
42. Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. & Gow, N. A. R. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 67–78 (2008).
43. Firon, A., Lesage, G. & Bussey, H. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 617–623 (2004).
44. Gozalbo, D., Roig, P., Villamón, E. & Gil, M. L. Candida and candidiasis: The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr. Drug Targets - Infect. Disord.* **4**, 117–135 (2004).
45. Bougnoux, M.-E. *Facteurs de virulence de Candida albicans.* (2010).
46. LARPENT, J.-P. *Mémento technique de microbiologie.* (1997).
47. Klis, F. M., De Groot, P. & Hellingwerf, K. Molecular organization of the cell wall of

- Candida albicans*. *Med. Mycol. Suppl.* **39**, 1–8 (2001).
48. Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239–256 (2002).
 49. Chang, W. *et al.* Lichen endophyte derived pyridoxatin inactivates *Candida* growth by interfering with ergosterol biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 1762–1771 (2015).
 50. Liu, J. F., Xia, J. J., Nie, K. L., Wang, F. & Deng, L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1–8 (2019).
 51. Ahmadipour, S., Field, R. A. & Miller, G. J. Prospects for anti-*Candida* therapy through targeting the cell wall: A mini-review. *Cell Surf.* **7**, 100063 (2021).
 52. Les levures et le vin rosé. (2013). Available at: <http://jeunes-oenologues-en-herbe.overblog.com/iii-les-levures>.
 53. Ghorri, S. Cours: Les microorganismes eucaryotes.
 54. Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N. & Fries, B. C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* **11**, 753–761 (2009).
 55. Metin, A., Dilek, N. & Bilgili, S. G. Recurrent candidal intertrigo: Challenges and solutions. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **11**, 175–185 (2018).
 56. McKay, M. Cutaneous manifestations of candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 991–993 (1988).
 57. Taudorf, E. H., Jemec, G. B. E., Hay, R. J. & Saunte, D. M. L. Cutaneous candidiasis – an evidence-based review of topical and systemic treatments to inform clinical practice. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **33**, 1863–1873 (2019).
 58. Francophones, O. de la S. F. de D. et de l'Association des D. Onychomycoses : modalités de diagnostic et prise en charge. *J. Mycol. Med.* **17**, 284–293 (2007).
 59. Hellstein, J. W. & Marek, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Spec. issue Color. textures, a Rev. oral mucosal entities* **13**, 25–32 (2019).
 60. Mohamed, A. A., Lu, X.-L. & Mounmin, F. A. Diagnosis and Treatment of Esophageal Candidiasis: Current Updates. (2019).
 61. Martins, N., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Silva, S. & Henriques, M. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia* **177**, 223–240 (2014).
 62. Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L. & Kullberg, B. J. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 1–20 (2018).
 63. Prentice, A. G. Oral and Gastrointestinal Candidosis: Prophylaxis During Immunosuppressive Therapy. *Mycoses* **32**, 42–46 (1989).

64. Eckert, L. O. *et al.* Vulvovaginal candidiasis: Clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet. Gynecol.* **92**, 757–765 (1998).
65. Mtibaa, L. *et al.* Les candidoses vulvovaginales : étiologies, symptômes et facteurs de risque. *J. Mycol. Med.* **27**, 153–158 (2017).
66. Ribeiro, F. C. *et al.* Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *J. Appl. Microbiol.* **129**, 175–185 (2020).
67. Dovník, A., Golle, A., Novak, D., Arko, D. & Takač, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: A review of the literature. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat.* **24**, 5–7 (2015).
68. Edwards, S. Balanitis and balanoposthitis: A review. *Genitourin. Med.* **72**, 155–159 (1996).
69. Fisher, J. F., Sobel, J. D., Kauffman, C. A. & Newman, C. A. *Candida* Urinary Tract Infections—Treatment. *Clin. Infect. Dis.* **52**, S457–S466 (2011).
70. Fisher, J. F., Chew, W. H. & Shadomy, S. Urinary Tract Infections Due to *Candida albicans*. **4**, 1107–1118 (2016).
71. Shah, C. P., McKey, J., Spirm, M. J. & Maguire, J. Ocular candidiasis: A review. *Br. J. Ophthalmol.* **92**, 466–468 (2008).
72. Shweihat, Y., Perry, J. & Shah, D. Isolated *Candida* infection of the lung. *Respir. Med. Case Reports* **16**, 18–19 (2015).
73. Gouin, F. & Viggiano, M. Candidoses systémiques : épidémiologie et diagnostic. **5**, 7–11 (1996).
74. Vaubourdolle, M. *Infectiologie Pharmacie - Biologie.* (2013).
75. Bassetti, M., Peghin, M. & Timsit, J. F. The current treatment landscape: Candidiasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, ii13–ii22 (2016).
76. Cornely, O. A., Bangard, C. & Jaspers, N. I. Hepatosplenic candidiasis. *Clin. Liver Dis.* **6**, 47–50 (2015).
77. Bjerke, J. W., Meyers, J. D. & Bowden, R. A. Hepatosplenic candidiasis - A contraindication to marrow transplantation? *Blood* **84**, 2811–2814 (1994).
78. Kontoyiannis, D. P., Luna, M. A., Samuels, B. I. & Bodey, P. A Manifestation of Chronic Disseminated. **14**, 721–739 (2000).
79. Rammaert, B., Desjardins, A. & Lortholary, O. New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses* **55**, 74–84 (2012).
80. Hani, U., Shivakumar, H., Vaghela, R., M. Osmani, R. & Shrivastava, A. Candidiasis: A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment.

- Infect. Disord. - Drug Targets* **15**, 42–52 (2015).
81. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L. & Williams, C. Fungal Biofilm Resistance. *Int. J. Microbiol.* **2012**, (2012).
 82. Vital Durand, D. & Le Jeunne, C. *DOROSZ - Guide pratique des médicaments*. (2020).
 83. Bianchi, V. & El Anbassi, S. *Médicaments*. (2018).
 84. Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N. & Cowen, L. E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.* **121**, 3390–3411 (2021).
 85. Brad Spellberg, Scott J Filler, J. E. E. J. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin. Pract.* **31**, 386–408 (2006).
 86. Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S. & de Morais, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J. Appl. Microbiol.* **131**, 11–22 (2021).
 87. Robbins, N., Wright, G. D. & Cowen, L. E. Antifungal drugs: The current armamentarium and development of new agents. *The Fungal Kingdom* 903–922 (2017).
 88. Pilmis, B., Lopes, A., Lortholary, O. & Charlier, C. Les échinocandines: Mise au point. *J. des Anti-Infectieux* **15**, 83–94 (2013).
 89. Douglas, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**, 30–36 (2003).
 90. Imbert, C. Biofilms fongiques. 21 (2014).
 91. Tsui, C., Kong, E. F. & Jabra-Rizk, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog. Dis.* **74**, (2016).
 92. Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Vidal Bonifacio, B., Lopez-Ribot, J. L. & Uppuluri, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **52**, 1–6 (2019).
 93. Chandra, J. *et al.* Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J. Bacteriol.* **183**, 5385–5394 (2001).
 94. Blankenship, J. R. & Mitchell, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 588–594 (2006).
 95. Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat. Protoc.* **3**, 1909–1924 (2008).
 96. Zarnowski, R. *et al.* Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio* **5**, e01333-14 (2014).
 97. Gulati, M. & Nobile, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 310–321 (2016).

98. Al-Fattani, M. A. & Douglas, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *J. Med. Microbiol.* **55**, 999–1008 (2006).
99. Uppuluri, P. *et al.* Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* **6**, e1000828 (2010).
100. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A. & Andes, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* **8**, (2013).
101. Baillie, G. S. & Douglas, L. J. Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1900 (1998).
102. Flemming, H. C. *et al.* Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016).
103. Perumal, P., Mekala, S. & Chaffin, W. L. Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2454 (2007).
104. Morschhäuser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1587**, 240–248 (2002).
105. Taff, H., Mitchell, K., Edward, J. & Andes, D. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Futur. Med.* 1325–1337 (2013).
106. Pappas, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. An Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **62**, e1 (2016).
107. Honegger, R. Differential gene expression within the cyanobacterial cell population of a lichen thallus. *New Phytol.* **196**, 657–660 (2012).
108. White, P. A. S. *et al.* Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: A systematic review. *Molecules* **19**, 14496–14527 (2014).
109. Upreti, D. K., Divakar, P. K., Shukla, V. & Bajpai, R. Recent advances in lichenology: Modern methods and approaches in Lichen systematics and culture techniques, volume 2. *Recent Adv. Lichenol. Mod. Methods Approaches Lichen Syst. Cult. Tech. Vol. 2* 1–232 (2015).
110. Grube, M. *et al.* Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *ISME J.* **9**, 412–424 (2015).
111. Agnan, Y. Biologie des lichens : symbiose lichénique et reproduction. Available at: <https://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/environnement-lichens-temoins-pollution-atmospherique-1900/page/3/>.

112. Zhao, Y., Wang, M. & Xu, B. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *J. Funct. Foods* 104283 (2020).
113. Grube, M. & Wedin, M. Lichenized Fungi and the Evolution of Symbiotic Organization. *The Fungal Kingdom* 749–765 (2017).
114. Lagarde, A. *et al.* Fungal communities associated with *Evernia prunastri*, *Ramalina fastigiata* and *Pleurosticta acetabulum*: Three epiphytic lichens potentially active against *Candida* biofilms. *Microbiol. Res.* **211**, 1–12 (2018).
115. Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, R. A. & Owen, J. G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 1730–1760 (2018).
116. Molnár, K. & Farkas, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites : a review. 157–173 (2010).
117. Zambare, V. P. & Christopher, L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm. Biol.* **50**, 778–798 (2012).
118. Kosanicá, M., Manojlovic, N., Jankovic, S., Stanojkovic, T. & Rankovicá, B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. (2012).
119. Melo, M. G. D. *et al.* Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol. Vitro.* **25**, 462–468 (2011).
120. Garvie, L. A. J., Knauth, L. P., Bungartz, F., Klonowski, S. & Nash, T. H. Life in extreme environments: Survival strategy of the endolithic desert lichen *Verrucaria rubrocincta*. *Naturwissenschaften* **95**, 705–712 (2008).
121. Carr, E. C., Harris, S. D., Herr, J. R. & Riekhof, W. R. Lichens and biofilms: Common collective growth imparts similar developmental strategies. *Algal Res.* **54**, 102217 (2021).
122. Shukla, V., Joshi, G. P. & Rawat, M. S. M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: A review. *Phytochem. Rev.* **9**, 303–314 (2010).
123. Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M. P. & Crespo, A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharm. Biol.* **54**, 1–17 (2016).
124. Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M. P. & Crespo, A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharm. Biol.* **54**, 1–17 (2016).
125. Podterob, A. P. Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharm. Chem. J.* **42**, 582–588 (2008).
126. Xu, M. *et al.* Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological

- activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine* **23**, 441–459 (2016).
127. Mitrović, T. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 5428–5448 (2011).
 128. Le Pogam, P. & Boustie, J. Xanthones of lichen source: A 2016 update. *Molecules* **21**, (2016).
 129. Schmitt, I. & Lumbsch, H. T. Molecular phylogeny of the Pertusariaceae supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **33**, 43–55 (2004).
 130. Becker, H. Book review : identification of lichens substances. *J. Plant Physiol.* **150**, 767 (1997).
 131. Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F. & Song, Y. Sources, extraction and biomedical properties of Polysaccharides. 1–23 (2019).
 132. Olafsdottir, E. S. & Ingólfssdottir, K. Polysaccharides from lichens: Structural characteristics and biological activity. *Planta Med.* **67**, 199–208 (2001).
 133. Alpsy, L. *et al.* Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicol. Ind. Health* **31**, 153–161 (2015).
 134. Wang, Q. X. *et al.* Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. *Fitoterapia* **83**, 209–214 (2012).
 135. Ulus, G. Antiangiogenic properties of lichen secondary metabolites. *Phyther. Res.* **35**, 3046–3058 (2021).
 136. Kwak, H. J. *et al.* Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation. *Int. J. Cancer* **118**, 2711–2720 (2006).
 137. Ma, J. *et al.* The anthraquinone derivative emodin inhibits angiogenesis and metastasis through downregulating Runx2 activity in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **46**, 1619–1628 (2015).
 138. Staples, R. *et al.* Structure and Chemical Analysis of Major Specialized Metabolites Produced by the Lichen *Evernia prunastri*. *Chem. Biodivers.* **17**, (2020).
 139. AFL. *Evernia prunastri* - Association Française de Lichénologie. Available at: https://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_E/Evernia_prunastri.htm.
 140. Joulain, D. & Tabacchi, R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: Oakmoss. *Flavour Fragr. J.* **24**, 49–61 (2009).
 141. Poncet, R. *Evernia prunastri* (L.) Ach., 1810. (2015). Available at: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/59053/tab/fiche.
 142. Aslan, A. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*,

- Dermatocarpon miniatum, Everinia divaricata, Evernia prunastri, and Neofuscella pulla. *Pharm. Biol.* **44**, 247–252 (2006).
143. AHAD, A. M. Nematocidal principles in ‘Oakmoss absolute’ and nematocidal activity of 2,4-dihydroxybenzoates. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1043–1046 (1991).
 144. Blanch, M., Blanco, Y., Fontaniella, B., Legaz, M. E. & Vicente, C. Production of phenolics by immobilized cells of the lichen *Pseudevernia furfuracea* the role of epiphytic bacteria. *Int. Microbiol.* **4**, 89–92 (2001).
 145. Calchera, A., Dal Grande, F., Bode, H. B. & Schmitt, I. Biosynthetic Gene Content of the ‘Perfume Lichens’ *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuracea*. *Molecules* **24**, 1–21 (2019).
 146. Huneck, S. The significance of lichens and their metabolites. **570**, 559–570 (1999).
 147. Johansen, J. D. Contact allergy to fragrances: Clinical and experimental investigations of the fragrance mix and its ingredients. *Contact Dermatitis, Supplement* **46**, (2002).
 148. Crépy, M. . Dermatoses professionnelles aux cosmétiques. 367–379 (2006).
 149. AFL. *Nephroma laevigatum* - Association Française de Lichénologie. Available at: https://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_N/Nephroma_laevigatum.htm.
 150. Lagarde, A. *et al.* Chlorinated bianthrone from the cyanolichen *Nephroma laevigatum*. *Fitoterapia* **149**, (2021).
 151. Lohtander, K., Oksanen, I. & Rikkinen, J. A phylogenetic study of *nephroma* (lichen-forming ascomycota). *Mycol. Res.* **106**, 777–787 (2002).
 152. James, P. W. & White, F. J. Studies on the genus *nephroma* i. The european and macaronesian species. *Lichenol.* **19**, 215–268 (1987).
 153. Cohen, P. A. & Towers, G. H. N. Biosynthetic studies on chlorinated anthraquinones in the lichen *Nephroma laevigatum*. *Phytochemistry* **42**, 1325–1329 (1996).
 154. Roullier, C. *et al.* Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry* **72**, 1348–1357 (2011).
 155. Cohen, A., Hudson, J. . & Towers, G. H. . Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. 180–183 (1996).
 156. COHEN, P. A. & TOWERS, G. . N. Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. **58**, 520–526 (1995).
 157. Lagarde, A. *et al.* Antiproliferative and antibiofilm potentials of endolichenic fungi associated with the lichen *Nephroma laevigatum*. *J. Appl. Microbiol.* **126**, 1044–1058 (2019).

158. Delebassée, S. *et al.* Cytochalasin E in the lichen *Pleurosticta acetabulum*. Anti-proliferative activity against human HT-29 colorectal cancer cells and quantitative variability. *Fitoterapia* **121**, 146–151 (2017).
159. INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel. *Lasallia pustulata* (L.) Mérat, 1821-Présentation. Available at: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/57969.
160. SLETVOLD, N. & HESTMARK, G. Thallus Growth Asymmetry and Habitat Inclination in *Lasallia pustulata*. **100**, 465–466 (1997).
161. Kosanić, M. *et al.* *Lasallia pustulata* lichen as possible natural antigenotoxic, antioxidant, antimicrobial and anticancer agent. *Cytotechnology* **68**, 999–1008 (2016).
162. Association Française de Lichénologie. *Lasallia pustulata*. (2005). Available at: https://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_L/Lasallia_pustulata.htm.
163. Ranković, B., Mišić, M. & Sukdolak, S. Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa*, and *Umbilicaria cylindrica*. *Microbiology* **76**, 723–727 (2007).
164. AFL : Association Française de Lichénologie. *Cladonia uncialis*. Available at: http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_C/Textes_C/Cladonia_uncialis_biuncialis.htm.
165. Studzińska-Sroka, E. *et al.* In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Nat. Prod. Res.* **29**, 2302–2307 (2015).
166. Liao, C., Piercey-Normore, M. D., Sorensen, J. L. & Gough, K. In situ imaging of usnic acid in selected *Cladonia* spp. by vibrational spectroscopy. *Analyst* **135**, 3242–3248 (2010).
167. AFL : Association Française de Lichénologie. *Pleurosticta acetabulum*. Available at: http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_P/Pleurosticta_acetabulum.htm.
168. Spribille, T. Relative symbiont input and the lichen symbiotic outcome. *Curr. Opin. Plant Biol.* **44**, 57–63 (2018).
169. Grube, M., Cardinale, M., De Castro, J. V., Müller, H. & Berg, G. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME J.* **3**, 1105–1115 (2009).
170. Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G. & Grube, M. Age, sun and substrate: Triggers of bacterial communities in lichens. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**, 23–28 (2012).
171. Cardinale, M., Vieira De Castro, J., Müller, H., Berg, G. & Grube, M. In situ analysis of

- the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**, 63–71 (2008).
172. Biosca, E. G., Flores, R., Santander, R. D., Díez-Gil, J. L. & Barreno, E. Innovative approaches using lichen enriched media to improve isolation and culturability of lichen associated bacteria. *PLoS One* **11**, 1–22 (2016).
 173. Grube, M. & Berg, G. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biol. Rev.* **23**, 72–85 (2009).
 174. Davies, J. *et al.* Uncialamycin, a new enediyne antibiotic. *Org. Lett.* **7**, 5233–5236 (2005).
 175. Singh, B. N., Upreti, D. K., Gupta, V. K., Dai, X. F. & Jiang, Y. Endolichenic Fungi: A Hidden Reservoir of Next Generation Biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* **35**, 808–813 (2017).
 176. Arnold, A. E. *et al.* A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous Fungi: Are lichens cradles of symbiotrophic Fungal diversification? *Syst. Biol.* **58**, 283–297 (2009).
 177. Rajulu, M. B. G. *et al.* Endolichenic fungal diversity associated with some lichens of the Western Ghats. *Planta Med.* **86**, 960–966 (2020).
 178. U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J. & Arnold, A. E. Community Analysis Reveals Close Affinities Between Endophytic and Endolichenic Fungi in Mosses and Lichens. *Microb. Ecol.* **60**, 340–353 (2010).
 179. Tripathi, M. & Joshi, Y. Endolichenic fungi in Kumaun Himlaya : a case study. *Recent Adv. Lichenol. Mod. Methods Approaches Lichen Syst. Cult. Tech. Vol. 2* 111–120 (2015).
 180. Kellogg, J. J. & Raja, H. A. Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon. *Phytochem. Rev.* **16**, 271–293 (2017).
 181. Wang, Q. X. *et al.* Tricycloalternarenes F-H: Three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. using OSMAC method. *Fitoterapia* **85**, 8–13 (2013).
 182. García, P. A., De Oliveira, A. B. & Batista, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules* **12**, 455–483 (2007).
 183. Wu, Y. H. *et al.* Pericoterpenoid A, a new bioactive cadinane-type sesquiterpene from *Periconia* sp. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **17**, 671–675 (2015).
 184. Wang, Q. X. *et al.* Ophiobolins P-T, five new cytotoxic and antibacterial sesterterpenes from the endolichenic fungus *Ulocladium* sp. *Fitoterapia* **90**, 220–227 (2013).
 185. Zhang, K. *et al.* Mono- and bis-furanone derivatives from the endolichenic fungus *Peziza*

- sp. *Fitoterapia* **92**, 79–84 (2014).
186. Chen, G. D. *et al.* Three pairs of varicolorotide enantiomers from *Eurotium* sp. with caspase-3 inhibitory activity. *Fitoterapia* **92**, 252–259 (2014).
187. Zheng, Q. C. *et al.* Chaetoglobosin Y, a new cytochalasan from *Chaetomium globosum*. *Fitoterapia* **93**, 126–131 (2014).
188. Zhao, Q. *et al.* Nodulisporisteroids C-L, new 4-methyl-progesteroid derivatives from *Nodulisporium* sp. *Steroids* **102**, 101–109 (2015).
189. Zheng, Q. C. *et al.* Nodulisporisteroids A and B, the first 3,4-seco-4-methyl-progesteroids from *Nodulisporium* sp. *Steroids* **78**, 896–901 (2013).
190. Zhao, Q. *et al.* Nodulisporiviridins A-H, Bioactive Viridins from *Nodulisporium* sp. *J. Nat. Prod.* **78**, 1221–1230 (2015).
191. Li, W., Li, X. Bin, Li, L., Li, R. J. & Lou, H. X. α -Pyrone derivatives from the endolichenic fungus *Nectria* sp. *Phytochem. Lett.* **12**, 22–26 (2015).
192. Dou, Y. *et al.* Metabolites from *Aspergillus versicolor*, an endolichenic fungus from the lichen *Lobaria retigera*. *Drug Discov. Ther.* **8**, 84–88 (2014).
193. Chen, G. D. *et al.* Xanthoquinodins from the endolichenic fungal strain *Chaetomium elatum*. *J. Nat. Prod.* **76**, 702–709 (2013).
194. Li, G. *et al.* Phaeosphaerins A-F, cytotoxic perylenequinones from an endolichenic fungus, *Phaeosphaeria* sp. *J. Nat. Prod.* **75**, 142–147 (2012).
195. Kim, K. H. *et al.* Naphthalenones and isocoumarins from a Costa Rican fungus *Xylariaceae* sp. CR1546C. *J. Chem. Res.* **38**, 722–725 (2014).
196. Wu, W. *et al.* Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp. *J. Nat. Prod.* **74**, 1303–1308 (2011).
197. Lagarde, A. Études phytochimiques du lichen *Nephroma laevigatum* et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms. <http://www.theses.fr> (2017).
198. Andraud-Dieu, A. Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs. <http://www.theses.fr> (2015).
199. Bourgou, S., Beji Serairi, R., Medini, F. & Ksouri, R. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *J. new Sci. Agric. Biotechnol.* **28**, 1650–1655 (2016).
200. Gökalsın, B. & Sesal, N. C. Lichen secondary metabolite evernic acid as potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol.*

Biotechnol. **32**, 1–7 (2016).



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Résumé

Candida albicans est une levure commensale et un pathogène opportuniste responsable d'infections fongiques plus ou moins graves. Cette espèce est capable de former des biofilms, qui sont définis comme des communautés microbiennes structurées, attachées à une surface et enfermées dans une matrice extracellulaire. De par leur organisation, les biofilms empêchent la diffusion de certains traitements et augmentent ainsi considérablement la résistance aux agents antifongiques. La découverte de nouvelles molécules antibiofilm est donc nécessaire.

Les lichens, correspondant à une association symbiotique entre un champignon et un organisme photosynthétique, et leurs champignons endolichéniques associés, sont une source de nouveaux composés aux activités biologiques intéressantes.

C'est dans ce contexte que 3 objectifs m'ont été confiés lors de mon stage d'initiation à la recherche effectué au laboratoire EBI de Poitiers : l'évaluation de l'activité anti développement du biofilm de *C. albicans* i) de différents extraits du lichen *Nephroma laevigatum*, ii) de différents extraits de champignons endolichéniques isolés des lichens *Evernia prunastri* et *Nephroma laevigatum*, et enfin iii) de différents composés lichéniques isolés d'extraits de lichens. L'activité hémolytique des composés lichéniques isolés a également été déterminée.

Ainsi les extraits dichlorométhane et méthanolique du lichen *Nephroma laevigatum* se sont montrés efficaces à faible concentration contre le développement du biofilm de *C. albicans* ($CI_{ad50} = 6,25 \mu\text{g/mL}$ à 48h). Seul l'extrait du champignon endolichénique *Sordaria fimicola* (champignon isolé du lichen *Evernia prunastri*) obtenu après culture sur milieu Sabouraud a présenté un effet anti développement à faible concentration et ce dès 24h de contact ($CI_{ad50}=25 \mu\text{g/mL}$). Les extraits des champignons endolichéniques du genre *Nemania sp.* (champignon isolé du lichen *Nephroma laevigatum*) ont quant à eux démontré une faible activité anti développement. Enfin, les composés isolés d'*Evernia prunastri* : l'acide pseudoévernique et l'acide évernique, ont démontré un effet anti développement de *C. albicans* à faible concentration ($CI_{ad50} = 6,25$ et $12,5 \mu\text{g/mL}$ respectivement à 48h) et une absence d'activité hémolytique.

Les résultats obtenus semblent donc prometteurs et contribuent à la découverte d'alternatives pour la prise en charge des biofilms à *C. albicans*.

Mots-clés : *Candida albicans*, lichens, champignons endophytes, biofilm