

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2015

Thèse n°

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

présentée et soutenue publiquement
le lundi 6 juillet 2015 à POITIERS
par Mademoiselle GUERINEAU Amandine
née le 8 Août 1988 à Niort

Evaluation du potentiel d'extraits de lichens et de fruits rouges contre des
biofilms de *Candida* et *Malassezia*

Composition du jury :

Président : Madame PAIN Stéphanie, Maître de conférences en toxicologie

Membre : Madame LABELLE Stéphanie, Docteur en pharmacie, Pharmacien
d'officine

Directeur de thèse : Madame GIRARDOT Marion, Maître de conférences en
pharmacognosie, botanique et biodiversité végétale



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique (HDR)
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite,

Remerciements

A Madame Stéphanie Pain, Maître de conférences en toxicologie,

qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A ma directrice de thèse, Madame Marion Girardot, Maître de conférences en pharmacognosie, botanique et biodiversité végétale,

pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour tous vos conseils, vos corrections et votre disponibilité, je vous adresse mes sincères remerciements.

A Stéphanie Labelle, Docteur en pharmacie,

qui a accepté d'être dans ce jury. Après ces nombreuses années d'études côte à côte, je t'adresse mes sincères remerciements. J'espère que cette amitié continuera encore de nombreuses années.

A Christine Imbert, Professeur en parasitologie,

qui m'a proposé ce sujet en collaboration avec Marion Girardot, merci pour vos conseils lors du stage d'initiation à la recherche.

A la pharmacie Vanier,

là où tout a commencé en stage de 3ème. Merci de m'avoir fait découvrir ce métier et de m'avoir accueillie tous les étés en tant qu'étudiante, j'y ai appris beaucoup.

Aux pharmacies où j'ai effectué mes stages officinaux, la pharmacie Souchet et la pharmacie Saint Florent,

merci pour votre accueil, votre gentillesse, vos conseils et la transmission de votre savoir.

A toutes ces belles rencontres faites au cours de mes études, j'espère que cette amitié durera encore longtemps.

A mes parents, ma sœur,

qui m'ont toujours soutenue tout au long de mes études. Merci de m'avoir toujours écoutée, supportée pendant toutes ces révisions. Voilà, la soutenance de la thèse arrive enfin!

A Hugo,

merci d'être présent à mes côtés. Cette thèse met fin à une aventure. Avec toi, d'autres nous attendent.

Sommaire

Abréviations.....	1
Liste des figures.....	2
Liste des tableaux.....	2
Glossaire.....	3

Introduction.....	5
--------------------------	----------

PARTIE I : Synthèse bibliographique.....	7
---	----------

A. Le genre Candida.....	8
I.Taxonomie.....	8
II.Biotope.....	8
III.Morphologie.....	8
IV.Culture et aspect des colonies.....	10
V. Facteurs pathogéniques.....	10
VI.Candidoses.....	12
VI.1.Candidoses superficielles.....	12
VI.1.1.Candidoses des muqueuses.....	12
VI.1.1.1.Candidoses buccales.....	12
VI.1.1.2.Candidoses génitales.....	13
VI.1.1.3.Candidoses digestives.....	13
VI.1.1.4.Candidoses urinaires.....	13
VI.1.2.Candidoses cutanées.....	13
VI.1.2.1.Intertrigo des grands plis.....	13
VI.1.2.2.Intertrigo des petits plis.....	14
VI.1.3.Candidoses unguéales.....	14
VI.1.3.1.Périonyxis.....	14
VI.1.3.2.Onyxis.....	14
VI.2.Candidoses profondes.....	15
VII.Traitements.....	15
VII.1.Polyènes.....	15
VII.2.Echinocandines.....	15
VII.3.Dérivés azolés.....	16
VII.4. Analogues de la pyrimidine	16
VII.5.Allylamines.....	16
VII.6.Dérivés synthétiques de la morpholine.....	17
VII.7.Pyridones.....	17
VIII. Résistance aux traitements.....	19
VIII.1.Définition.....	19
VIII.2.Mécanismes de résistance décrits pour quelques molécules anti-Candida.....	19
VIII.2.1.Polyènes.....	19
VIII.2.2.Echinocandines.....	19
VIII.2.3.Dérivés azolés.....	19
VIII.2.4.Analogues de la pyrimidine	20
VIII.3.Le biofilm : forme de résistance.....	20
VIII.3.1.Définition.....	20
VIII.3.2.Les étapes de formation du biofilm.....	20
VIII.3.2.1.Phase d'adhérence.....	20
VIII.3.2.2.Phase intermédiaire.....	21
VIII.3.2.3.Phase de maturation	21

VIII.3.2.4.Phase de dispersion.....	21
VIII.3.3.Forme de résistance.....	22
VIII.3.4.Antifongiques actifs contre les biofilms de Candida.....	23
B. Le genre Malassezia.....	24
I.Taxonomie.....	24
II.Biotope.....	24
III.Morphologie et caractéristiques.....	24
IV.Culture et aspect des colonies.....	25
V. Infections impliquant Malassezia.....	26
V.1.Pityriasis versicolor.....	26
V.2.Dermatite séborrhéique.....	27
V.3.Pityriasis capitis.....	27
V.4.Dermatite atopique.....	27
V.5.Folliculite à Malassezia.....	28
V.6.Infections systémiques.....	28
V.7.Psoriasis.....	28
V.8.Otites externes chez le chien.....	28
VI.Traitements.....	28
VI.1.Polyènes.....	28
VI.2.Dérivés azolés.....	29
VI.3.Allylamines et pyridones.....	29
VI.4.Autres traitements.....	29
VI.4.1.Sulfure de sélénium.....	29
VI.4.2.Pyrithione de zinc.....	29
VII.Résistance aux traitements.....	29
VII.1.Mécanismes de résistance décrits pour quelques molécules anti-Malassezia.....	29
VII.2.Biofilms : forme de résistance.....	30
VII.2.1.Les étapes de formation du biofilm.....	30
VII.2.2.Forme de résistance.....	30
VII.2.3.Antifongiques actifs contre les biofilms de Malassezia.....	30
C. Les sources naturelles étudiées.....	31
La Canneberge.....	31
I.Botanique.....	31
II.Composition chimique.....	31
III. Propriétés pharmacologiques.....	32
I.1.Activité anti-adhérente.....	32
I.1.1.Bactérienne.....	32
I.1.2.Fongique.....	32
I.2.Activité anti-oxydante.....	32
IV. Emplois.....	33
La Myrtille.....	34
I.Botanique.....	34
II.Composition chimique.....	34
III. Propriétés pharmacologiques.....	34
IV. Emplois.....	35
L'acérولا.....	36
I.Botanique.....	36
II.Composition chimique.....	36
III. Propriétés pharmacologiques.....	36
IV. Emplois.....	37
La framboise	38

I. Botanique.....	38
II. Composition chimique.....	38
III. Propriétés pharmacologiques.....	38
IV. Emplois.....	38
Les Lichens.....	39
I. Définition.....	39
II. Composition chimique.....	39
III. Propriétés pharmacologiques.....	41
IV. Emplois.....	41
PARTIE II : Étude expérimentale.....	42
A. Étude menées sur Candida.....	43
I. Matériels et méthodes.....	43
I.1. Organismes et conditions de culture.....	43
I.1.1. Espèces utilisées.....	43
I.1.2. Conditions de culture.....	43
I.2. Matériel végétal et lichénique.....	43
I.2.1. Quatre extraits commerciaux de fruits rouges en poudre	43
I.2.2. Fractions et sous-fractions issues d'un jus de canneberge commercial transformé.....	44
I.2.3. Vingt-cinq extraits acétoniques de lichens.....	44
I.2.4. Préparation des échantillons à tester.....	45
I.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice : CMI.....	45
I.4. Détermination de l'activité anti-biofilm	46
I.4.1. Préparation du fluide buccal à 2%.....	46
I.4.2. Préparation de la suspension de levures.....	46
I.4.3. Tests anti-biofilms.....	46
I.4.3.1. Test anti-adhérent	47
I.4.3.2. Test d'activité contre la phase de maturation du biofilm.....	48
I.4.4. Test XTT.....	49
I.4.5. Analyse statistique.....	50
II. Résultats – Discussion.....	51
II.1. Détermination de la CMI.....	51
II.2. Évaluation de l'activité anti-adhérente des fractions et sous-fractions issues du jus de canneberge	51
II.2.1. Observations au microscope inversé des levures adhérentes après lavage au PBS et avant mesure de l'absorbance par spectrophotométrie.....	51
II.2.2. Mesure des absorbances.....	52
II.3. Évaluation de l'activité contre la phase de maturation du biofilm des extraits de lichens.....	53
II.3.1. Observations microscopiques des levures formant le biofilm après lavage par le PBS et avant mesure de l'absorbance par spectrophotométrie	53
II.3.2. Mesure des absorbances.....	54
III. Conclusion et perspectives.....	56
B. Étude menées sur Malassezia.....	57
I. Matériels et méthodes.....	57
I.1. Organismes utilisés.....	57
I.1.1. Espèces utilisées.....	57
I.1.2. Conditions de culture.....	57
I.2. Matériel végétal.....	57
I.3. Détermination de la CMI.....	58

I.3.1.Sélection du milieu de culture.....	58
I.3.2.Détermination des CMI des échantillons.....	58
I.4. Évaluation de l'activité anti-biofilm des fractions issues du jus de canneberge ainsi que des extraits commerciaux de fruits rouges.....	59
I.4.1.Préparation des suspensions de <i>Malassezia</i>	59
I.4.2.Test anti-biofilm.....	59
I.4.3.Test XTT.....	60
I.5.Étude cinétique du développement d'un biofilm de <i>Malassezia furfur</i>	60
I.5.1.Préparation de la suspension de <i>M. furfur</i>	60
I.5.2.Préparation des microplaques.....	61
I.5.3.Test XTT.....	61
I.6.Tests impliquant la sonication.....	62
I.6.1.Effet de la sonication sur l'hétérogénéité des suspensions de <i>Malassezia</i> ...	62
I.6.2.Évaluation de la viabilité de <i>M. pachydermatis</i> après sonication	63
II.Résultats - Discussion.....	64
II.1.Détermination de la CMI.....	64
II.1.1.Sélection du milieu de culture.....	64
II.1.2.Détermination des CMI des échantillons.....	64
II.2. Évaluation de l'activité anti-biofilm des fractions issues du jus de canneberge ainsi que des extraits commerciaux de fruits rouges.....	65
II.2.1.Observations microscopiques avant mesure de l'absorbance par spectrophotométrie.....	65
II.2.2.Test anti-biofilm.....	65
II.3.Étude cinétique du développement d'un biofilm de <i>Malassezia furfur</i>	66
II.4.Tests impliquant la sonication	68
II.4.1.Effet de la sonication sur l'hétérogénéité des suspensions de <i>Malassezia</i> ...	68
II.4.2.Évaluation de la viabilité de <i>M. pachydermatis</i> après sonication	68
III.Conclusion et perspectives.....	69
Conclusion.....	70
Annexe 1	72
Bibliographie.....	80
Résumé.....	85

Abréviations

5-FU : 5-Fluorouracile

ADN : Acide désoxyribonucléique

Als : Agglutinin like sequences

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

CHU : Centre hospitalier universitaire

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute

CMA : Concentration minimale anti-adhérente

CMB : Concentration minimale anti-biofilm

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DTT : Dithiothreitol

INRA : Institut national de la recherche agronomique

LCSN : Laboratoire de chimie des substances naturelles

MEC : Matrice extracellulaire

PACs : Proanthocyanidols

PBS : Phosphate buffered saline

PVC : Polychlorure de vinyle

RICM : Recherche et Innovation en Chimie Médicinale

RPM : Rotations par minute

Saps : Aspartyl protéases sécrétées

SIDA : Syndrome immunodéficient acquis

UFC : Unité formant colonie

UMR : Unité mixte de recherche

UVs : Ultra-violets

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

YNB-Glc : Yeast Nitrogen Base Medium – Glucose

Liste des figures

Figure 1 : Divers aspects morphologiques de *Candida*

Figure 2 : Candidose pseudomembraneuse aiguë ou muguet buccal

Figure 3 : Intertrigo interdigital candidosique

Figure 4 : Onychomycose candidosique

Figure 5 : Schéma des trois premières étapes de formation d'un biofilm de *Candida albicans* à la surface d'un cathéter en PVC

Figure 6 : Aspect de la paroi de *Malassezia furfur* (microscopie électronique à transmission)

Figure 7 : Pityriasis versicolor

Figure 8 : *Vaccinium macrocarpon* (feuilles et fruits)

Figure 9 : Structure d'un proanthocyanidol de type A

Figure 10 : *Vaccinium myrtillus* (feuilles et fruits)

Figure 11 : *Malpighia puniceifolia* (feuilles et fruits)

Figure 12 : *Rubus idaeus* (feuilles et fruits)

Figure 13 : Structure de l'acide usnique

Figure 14 : Photographie d'*Usnea* sp., de *Cladonia squamosa* et de *Ramalina* sp.

Figure 15 : Schéma récapitulatif de la méthode du test anti-adhérent

Figure 16 : Schéma récapitulatif de la méthode du test contre la phase de maturation du biofilm

Figure 17 : Schéma récapitulatif de la méthode du test anti-biofilm de *Malassezia*

Figure 18 : Représentation des microplaques préparées

Figure 19 : Activité métabolique des levures adhérentes *M. furfur* (absorbance) en fonction du temps

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes principales d'antifongiques actifs contre *Candida* : exemples de composés commercialisés, leurs mécanismes d'action, effets indésirables et indications

Tableau 2 : Compositions et masses des 6 sous-fractions issues du jus de canneberge

Tableau 3 : Concentrations minimales anti-adhérentes (CMA) des fractions et sous-fractions issues du jus de canneberge

Tableau 4 : Concentrations minimales anti-biofilms (CMB) des extraits de lichens

Glossaire

Asthénie : Fatigue

Astringent : Substance qui assèche et resserre les tissus

Axillaire : Point de jonction entre la queue d'une feuille et sa tige

Balanite : Inflammation aiguë du gland et du sillon situé entre le gland et le prépuce

Biofilm : Communauté microbienne adhérant à une surface organique ou non et englobée dans une matrice extracellulaire

Blastospores ou blastoconidies : Cellules arrondies formées après le bourgeonnement d'une levure

Candidose hépato-splénique : Forme particulière de candidose systémique évoluant de façon chronique

Chitine : Polysaccharide azoté synthétisé par de nombreuses espèces animales et végétales notamment les champignons

Commensal : Se nourrit de matières organiques sur son hôte sans le nuire

Cystite : Inflammation aiguë ou chronique de la muqueuse vésicale

Drupe : Fruit charnu dont l'endocarpe lignifié forme un noyau contenant l'amande

Dyspareunie : Douleurs survenant chez la femme lors des rapports sexuels

Dysphagie : Trouble de la déglutition lié à la difficulté du passage des aliments de la bouche vers l'estomac

Elliptique : Se dit d'une feuille élargie dans sa partie centrale et dont les deux extrémités sont effilées

Endocardite : Inflammation de l'endocarde, tunique interne du cœur

Hématurie : Présence de sang dans l'urine

Hyphes : Filaments allongés

Inflorescence : Disposition des fleurs d'une plante les unes par rapport aux autres

Leucorrhée : Écoulement vaginal non sanglant ou pertes blanches

Macule : Toute tache cutanée non saillante souvent de couleur rouge

Mésocarpe : Partie médiane des tissus du fruit

Miction : Émission naturelle d'urine par évacuation de la vessie

Mycélium : Ensemble de filaments ou hyphes plus ou moins ramifiés

Opportuniste : Se dit d'un micro-organisme qui ne devient pathogène que lors d'une diminution des défenses immunitaires

Ostéoarthrite : Arthrite compliquée de lésions osseuses des surfaces articulaires

Papule : Lésion cutanée sèche sans contenu liquidien plus ou moins saillante

Pédoncule : Ramification terminale de la tige portant la fleur

Pétéchie : Petite lésion rouge vif ou bleutée de la peau et des muqueuses

Planctonique : Non organisée en biofilm

Plis nasogéniens : « rides du sourire », rides se formant sur le côté du nez pour descendre au coin de la bouche

Polyphénol : Composé ayant plusieurs fonctions phénol et présentant des propriétés anti-oxydantes

Polysperme : Contenant une importante quantité de graines

Pustule : Lésion cutanée constituée par le soulèvement de l'épiderme contenant un liquide purulent

Saprophyte : Se nourrissant de matières organiques ou végétales en décomposition dans le milieu extérieur

Sessile : Organisée en biofilm

Tomenteuse : Couvert de poils fins et serrés

Vulvovaginite : Inflammation de la vulve et du vagin, d'origine infectieuse

Introduction

Les levures du genre *Candida* et *Malassezia* peuvent être responsables de pathologies le plus souvent bénignes touchant la peau, les phanères et les muqueuses mais aussi d'infections plus graves pouvant atteindre de nombreux organes engageant alors le pronostic vital notamment chez les immunodéprimés. De nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques favorisent l'apparition de ces infections fongiques; les levures passant alors de l'état commensal à l'état pathogène.

Concernant les traitements de ces pathologies, des résistances de la part de ces levures sont apparues, en particulier des résistances aux antifongiques azolés, molécules employées en traitement de première intention.

De plus, *Candida* spp. et *Malassezia* spp. sont capables de former des **biofilms**; structures complexes constituées de microorganismes associés à une surface et englobés dans une matrice extracellulaire. Cette organisation est connue pour diminuer l'efficacité des antifongiques actuels. Les infections associées aux biofilms sont en constante augmentation et les traitements efficaces sont alors en nombre limité conduisant à des échecs thérapeutiques [Lebeaux. D et al, 2014]. De nouvelles approches consistent à empêcher la formation des biofilms notamment en inhibant la première étape : l'étape d'adhérence [Lebeaux D. et al., 2012].

Actuellement, les substances naturelles tiennent une place importante. Retrouvées sous diverses formes : extraits secs, teintures, hydrolats,... elles regorgent de propriétés thérapeutiques et sont donc continuellement étudiées depuis des milliers d'années.

L'objectif de notre étude est alors d'explorer le potentiel de sources naturelles contre des biofilms de *Candida* et de *Malassezia*.

Cette étude a été réalisée au laboratoire de parasitologie et mycologie médicale du CHU de Poitiers du 5 septembre au 30 octobre 2013 dans le cadre d'un stage d'initiation à la recherche.

La sélection des sources naturelles s'est faite par une approche inductive. A partir de données expérimentales puisées dans la littérature, des sources présentant une analogie de composition chimique ou d'activité thérapeutique ont été choisies. Certains lichens et la canneberge ont donc été sélectionnés ayant précédemment démontrés des activités anti-biofilms bactériens, laissant ainsi supposer un intérêt contre les biofilms fongiques. D'autre part, des plantes riches en **polyphénols**, ces derniers ayant aussi présenté dans la littérature un

potentiel anti-biofilm bactérien, ont été retenues comme la framboise, la myrtille et l'acérola. Les échantillons testés dans cette étude proviennent soit de collaborations avec des laboratoires de phytochimie (Tours, Limoges) soit du commerce.

Une fois les sources sélectionnées, l'étude expérimentale a été scindée en deux parties. La première partie s'est focalisée sur l'évaluation des activités anti-adhérentes et anti-biofilms de ces extraits naturels contre des levures du genre *Candida*. La seconde partie a consisté en l'adaptation des protocoles d'évaluation des activités anti-adhérentes et anti-biofilms de *Candida* aux levures du genre *Malassezia*.

Ce manuscrit est donc divisé en deux parties : une première partie de synthèse bibliographique consacrée à la description des genres *Candida* et *Malassezia* (morphologie, infections associées, traitements, résistances...) ainsi qu'à la présentation des sources naturelles sélectionnées ; puis une seconde partie exposant les protocoles expérimentaux employés ainsi que les résultats obtenus sur les deux genres fongiques.

PARTIE I :

Synthèse bibliographique

A. Le genre *Candida*

I. Taxonomie

Le genre *Candida* appartient au règne des *Fungi*, phylum des Ascomycètes, classe des Saccharomycètes, ordre des Saccharomycétales et famille des Saccharomycétacées.

Aujourd'hui, environ 200 espèces de *Candida* sont recensées mais une dizaine seulement sont pathogènes de l'Homme comme par exemple : *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida parapsilosis* [Ripert et al., 2013].

II. Biotope

Les levures du genre *Candida* sont des organismes **saprophytes** du tractus digestif de l'Homme, des mammifères et des oiseaux. Chez l'Homme, elles sont retrouvées dans les voies aériennes supérieures, génito-urinaires ainsi que sur la peau et les phanères. Transmises par la mère lors de l'accouchement, ces levures sont présentes dès la naissance [Koenig H., 1995].

De plus, ces levures ubiquitaires sont également présentes dans le milieu extérieur (air, sol...) ainsi que dans/sur les aliments (fruits, viandes, céréales, produits laitiers...) [Ripert et al., 2013].

III. Morphologie

Les *Candida* sont des organismes unicellulaires eucaryotes, non capsulés, non pigmentés dont la reproduction se fait par simple bourgeonnement [Lassy E., 2001][Ripert et al., 2013].

Ce sont des espèces dimorphiques, c'est à dire pouvant se présenter sous plusieurs stades morphologiques :

- Les **blastospores** ou **blastoconidies** : ce sont des cellules arrondies de 3,5 à 6 µm sur 6 à 10 µm.
- Le **mycélium** vrai : la blastospore va former un tube allongé aussi appelé « tube germinatif » qui va se cloisonner et ensuite se ramifier pour former ainsi une structure nommée mycélium vrai ou **hyphes** (filaments allongés). Ce stade morphologique est particulièrement observé pour l'espèce *C. albicans*.

- Le pseudo-mycélium : lors de l'étape de reproduction, une cellule fille peut rester attachée à la cellule mère constituant alors un étranglement entre les deux cellules aboutissant à une structure filamenteuse plus ou moins longue. Ce stade intermédiaire entre la blastospore et l'hyphe est alors appelé pseudo-mycélium.
- Les chlamydospores : ce sont des cellules sphériques de 6 à 15 μm à paroi épaisse et caractéristiques de *C. albicans* et de *C. dubliniensis*.

[Ripert et al., 2013][Sudbery P. et al, 2004]

Sous l'influence de divers facteurs tels que la température, le pH ou la composition chimique du milieu, les levures peuvent donc changer progressivement de morphologie [Sudbery P. et al, 2004].

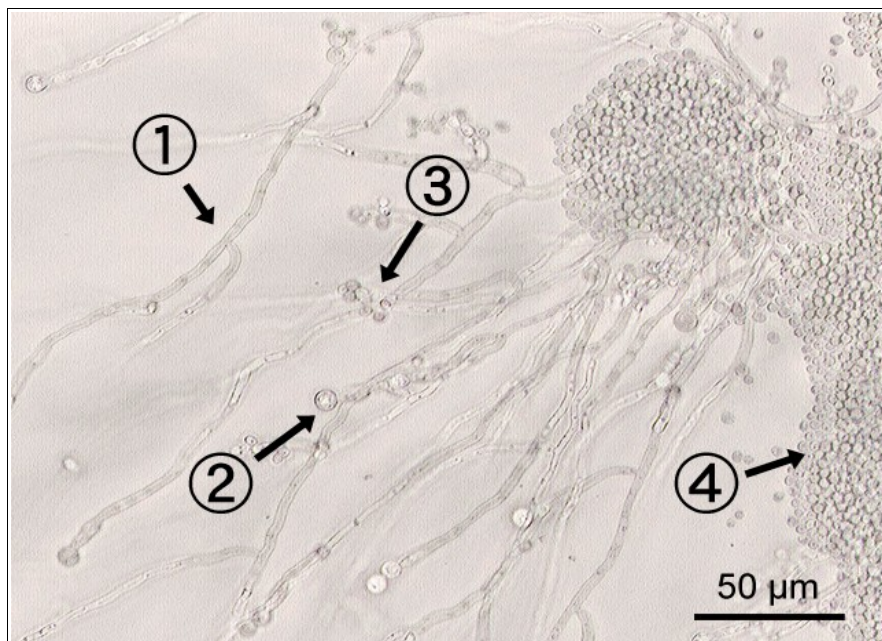


Figure 1 : Divers aspects morphologiques de *Candida* : 1 : pseudo-mycélium; 2 : chlamydospore; 3 : blastospore; 4 : levure [17]

Ces levures présentent une paroi qui entoure leur membrane plasmique et possède plusieurs fonctions en particulier celle d'assurer le maintien de l'intégrité de la levure. Cette paroi présente une grande plasticité permettant aux levures de prendre des formes variées. Elle est la cible de nombreux antifongiques.

Elle est constituée de trois couches :

- la couche externe représentant un réseau dense fibrillaire composé de protéines et glycoprotéines parmi lesquelles les mannanes.
- la couche centrale composée de **chitine**, de β -1,3 glucane et de β -1,6 glucane
- la couche interne représentant un réseau dense de mannoprotéines complété par de la chitine

On peut noter que certaines de ces protéines contribuent à la formation de biofilms comme les adhésines Als (Agglutinin like sequences) qui contribuent à la première étape d'adhérence.

Des enzymes présentes dans cette paroi comme les protéases Saps (secreted aspartyl proteinases), participent à la dégradation des tissus environnants augmentant ainsi la virulence des levures [Ripert et al., 2013][Poulain D., 2013].

Quant à la membrane plasmique de *Candida* sp., celle-ci est constituée d'une bicouche lipidique incrustée de protéines. L'ergostérol, son composant majeur, assure le maintien de la structure membranaire.

IV. Culture et aspect des colonies

Les levures du genre *Candida* peuvent croître sur des milieux de culture classiques (gélose ordinaire); le milieu gélosé de Sabouraud étant le plus utilisé.

Sur ces milieux, les colonies sont ovales et de couleur blanc-crème [Ripert et al., 2013].

V. Facteurs pathogéniques

Le genre *Candida* étant retrouvé chez l'Homme à l'état **commensal**, ce sont divers facteurs intrinsèques et extrinsèques qui contribuent à l'apparition d'une pathogénicité du genre.

En effet, les facteurs favorisant l'apparition de candidoses sont nombreux ; parmi eux, les facteurs intrinsèques liés :

- à la physiologie : les âges extrêmes de la vie, la grossesse
- au terrain : immunodépression (VIH,...), diabète, altération de l'état général
- à l'état de l'organe avant infection : par exemple pour la peau : présence de macération, humidité, brûlures...

et les facteurs extrinsèques comme :

- la prise de médicaments (antibiotiques, corticoïdes, immuno-suppresseurs...)
- les chirurgies invasives en particulier celles impliquant la pose de cathéters ou de prothèses

[Koenig H., 1995]

Sous l'influence de ces facteurs, les levures modifient leur morphologie pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ces différentes expressions phénotypiques augmentent leur virulence.

[Poulain D., 2013]

VI. Candidoses

Les candidoses se différencient en candidoses superficielles provoquant des atteintes de la peau, des phanères et des muqueuses et en candidoses profondes pouvant atteindre de nombreux organes [Ripert et al., 2013].

VI.1. Candidoses superficielles

On appelle candidoses superficielles les infections fongiques cutanéomuqueuses provoquées par des levures **opportunistes** du genre *Candida*. Le principal responsable de ces pathologies est *Candida albicans* suivi de *C. glabrata* et *C. dubliniensis* [Ripert et al., 2013].

VI.1.1. Candidoses des muqueuses

VI.1.1.1. Candidoses buccales

Un déséquilibre de la flore buccale normale peut être causé par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques précédemment cités entraînant une prolifération excessive des levures à *Candida* à l'origine de candidoses buccales.

Différentes formes cliniques sont décrites dont la plus commune est le muguet ou candidose pseudomembraneuse aiguë.

La muqueuse buccale érythémateuse est alors recouverte d'un enduit blanchâtre crémeux pouvant se détacher facilement. Au départ, seules les sensations de goût métallique et de sécheresse buccale sont décrites. Puis des brûlures et une **dysphagie** peuvent apparaître [Ripert et al., 2013][Dalenda El Euch et al., 2014].

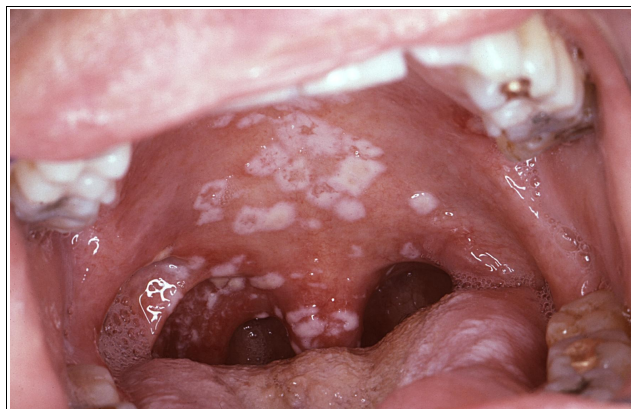


Figure 2 : Candidose pseudomembraneuse aiguë ou muguet buccal [6]

VI.1.1.2. Candidoses génitales

Chez la femme, elles se caractérisent par une **vulvovaginite**. On estime que 75% d'entre elles présenteront, au cours de leur vie, au moins un épisode de candidose vulvovaginale et particulièrement au cours de leur grossesse [Dalenda El Euch et al., 2014].

Les symptômes classiquement retrouvés sont un prurit intense accompagné de brûlures, de **dyspareunie** et de **leucorrhées** blanchâtres.

Chez l'homme, elles se caractérisent par une **balanite**. Le point de départ est le sillon balano-préputial puis s'étend au gland et au prépuce. La muqueuse est érythémateuse et présente des lésions vésiculeuses ou pustuleuses pouvant se rompre laissant apparaître un enduit blanchâtre. Un prurit y est associé. [Ripert et al., 2013]

VI.1.1.3. Candidoses digestives

La candidose œsophagienne est caractérisée par une dysphagie douloureuse, des brûlures rétrosternales accompagnées de hoquets et de nausées. Elle est souvent observée chez les patients sidéens. Cette candidose peut aboutir à une candidose gastrique définie par des sensations de brûlure gastrique associées ou non à des nausées et vomissements. Les candidoses intestinales sont rares [Ripert et al., 2013].

VI.1.1.4. Candidoses urinaires

La candidurie est souvent asymptomatique. Seuls 4 à 14% des patients ayant une candidurie développent des symptômes semblables à ceux d'une infection urinaire bactérienne (**mictions** fréquentes et impérieuses accompagnées de brûlures et parfois d'**hématurie**). Ces candidoses urinaires sont souvent retrouvées chez des patients hospitalisés porteurs de sondes urinaires [Fraisie T et al., 2011][Ripert et al., 2013].

VI.1.2. Candidoses cutanées

Elles se caractérisent par des intertrigos : infections localisées au niveau des plis de la peau.

VI.1.2.1. Intertrigo des grands plis

Cet intertrigo s'observe particulièrement chez les sujets obèses, favorisé par des phénomènes de macération. Il concerne principalement les plis inguinaux, sous-mammaires, axillaires ou interfessiers. Le fond des plis est alors recouvert d'un enduit blanchâtre puis des lésions s'étendent sous forme d'une nappe érythémateuse d'aspect vernissé [Ripert et al., 2013].

VI.1.2.2. Intertrigo des petits plis

Les lésions sont dans ce cas, localisées au niveau des plis interdigitaux, interorteils, ombilicaux et labiaux (désignées dans ce dernier cas par le terme perlèche). Les lésions sont rouges, fissurées, humides et à bords blanchâtres [Ripert et al., 2013][Dalenda El Euch et al., 2014].



Figure 3 : Intertrigo interdigital candidosique

[Dalenda El Euch et al., 2014]

VI.1.3. Candidoses unguéales

VI.1.3.1. Périonyxis

C'est une atteinte du pourtour de l'ongle qui siège souvent aux mains. Il apparaît un bourrelet rouge et douloureux laissant s'échapper du pus à la pression de la lésion. S'ensuit alors l'onxyxis.

VI.1.3.2. Onxyxis

L'ongle atteint devient rugueux et des stries vertes ou brunes apparaissent. En l'absence de traitement, l'ongle peut être totalement détruit.

[Ripert et al., 2013][Dalenda El Euch et al., 2014]



Figure 4 : Onychomycose candidosique

[Dalenda El Euch et al., 2014]

VI.2. Candidoses profondes

Elles correspondent à des atteintes des organes profonds par les levures disséminées par voie hématogène (candidémie). L'origine est soit endogène (à partir d'un foyer digestif) soit exogène (pose d'un cathéter, d'une sonde,...).

Elles sont fréquentes chez les patients à risque (polytraumatisés, hospitalisés en réanimation, atteints de déficit immunitaire, sur lesquels a été posé un dispositif médical (sonde, prothèse, cathéter,...), ayant une antibiothérapie à large spectre,...) et sont souvent associées à une mortalité élevée. Elles sont responsables de septicémies, d'**endocardites**, de **candidoses hépato-spléniques**, d'**ostéoarthrites**, d'atteintes oculaires, neuro-méningées...

[Ripert et al., 2013]

VII. Traitements

Actuellement, plusieurs grandes classes d'antifongiques actifs contre *Candida* sont disponibles sur le marché.

VII.1. Polyènes

Ces antifongiques naturels, issus de la culture du genre *Streptomyces*, se fixent à l'ergostérol de la membrane fongique, la fragilisant et augmentant sa perméabilité créant ainsi une fuite d'ions conduisant à la mort cellulaire.

Les polyènes utilisés en cas de candidoses sont l'amphotéricine B et la nystatine. Par voie locale, ils sont bien tolérés contrairement à la voie injectable où une toxicité est décrite

principalement au niveau rénal. Une formulation lipidique de l'amphotéricine B a été mise au point. Elle est beaucoup plus coûteuse mais présente une meilleure tolérance.

[Ripert et al., 2013][Vidal, 2015]

VII.2. Echinocandines

Ce sont des polypeptides issus de la fermentation de divers champignons notamment *Aspergillus* sp. Les échinocandines inhibent de façon non compétitive l'enzyme responsable de la synthèse et de la polymérisation des glucanes de la paroi des champignons, la β -1,3 glucane synthétase. Cette fragilisation de la paroi entraîne une instabilité osmotique provoquant la mort cellulaire. Les échinocandines utilisées en cas de candidoses invasives sont la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine. Elles sont utilisées uniquement par voie injectable et sont bien tolérées. Peu d'effets indésirables sont décrits. Sont à relever tout de même des réactions allergiques, des cas de phlébites au point d'injection, des leucopénies, des fièvres, des céphalées, des nausées et vomissements.

[Ripert et al., 2013][Vidal, 2015]

VII.3. Dérivés azolés

Ces molécules de synthèse sont nombreuses. Elles inhibent l'enzyme de la voie de synthèse de l'ergostérol, la 14 α -lanostérol déméthylase et interfèrent avec les enzymes mitochondriales entraînant l'asphyxie des levures. Les dérivés azolés utilisés par voie orale ou injectable dans les candidoses sont le kétoconazole, le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole et le posaconazole. Ces molécules sont bien tolérées excepté le kétoconazole qui présente une importante hépatotoxicité. Toutefois, leur utilisation nécessite une surveillance hépatique et rénale.

[Ripert et al., 2013][Vidal, 2015]

VII.4. Analogues de la pyrimidine

La 5-fluorocytosine est un analogue de la pyrimidine utilisé contre certaines candidoses. Elle est le précurseur du 5-fluorouracile (5-FU), inhibiteur de la thymidylate synthétase, enzyme impliquée dans la synthèse d'ADN. De plus, le 5-FU est incorporé dans l'ARN fongique à la place de l'uracile. La synthèse protéique est alors stoppée entraînant la mort des champignons. Elle est utilisée par voie orale ou injectable et peut générer parfois des troubles hématologiques et hépatiques. [Ripert et al., 2013][Vidal, 2015]

VII.5. Allylamines

Cette classe est représentée par la terbinafine. Cet antifongique d'origine synthétique à large spectre bloque la synthèse de l'ergostérol en inhibant l'enzyme squalène-époxydase. Il est indiqué par voie orale et locale dans les candidoses cutanées en particulier les onychomycoses et les intertrigos. Ses effets indésirables sont, après administration par voie orale, des troubles digestifs, hépatiques et hématologiques imposant l'arrêt du traitement et après administration par voie locale, des démangeaisons et eczémas de contact.

[Vidal, 2015]

VII.6. Dérivés synthétiques de la morpholine

L'amorolfine, un dérivé synthétique de la morpholine, agit en inhibant la synthèse des stérols de la membrane. L'accumulation de stérols atypiques entraîne des modifications morphologiques de la membrane conduisant à la mort des champignons. Cet antifongique à large spectre est principalement indiqué dans les onychomycoses notamment candidosiques. Quelques effets indésirables ont été décrits comme des anomalies de l'ongle et des sensations de brûlures cutanées.

[Vidal, 2015]

VII.7. Pyridones

Le ciclopirox, antifongique de synthèse appartenant aux pyridones, inhibe le métabolisme énergétique des champignons et s'accumule dans la cellule fongique se liant alors irréversiblement à des structures cellulaires comme la membrane, la mitochondrie,... Il est indiqué dans le traitement des candidoses cutanées et des onychomycoses sous diverses formes galéniques (vernis, crème, poudre, shampoing). Ses effets indésirables sont des réactions locales notamment des picotements, des irritations, des brûlures et des desquamations.

[Vidal, 2015]

Le tableau suivant présente les classes d'antifongiques actifs contre *Candida* : exemples de composés commercialisés, leurs mécanismes d'action, effets indésirables et indications.

	<i>Molécules</i>	<i>Mécanisme d'action</i>	<i>Effets indésirables</i>	<i>Indications</i>
Polyènes	Nystatine Amphotéricine B	Fixation à l'ergostérol membranaire	<u>Voie orale</u> : bien tolérés <u>Voie injectable</u> : Toxicité rénale et hématologique	Candidoses buccales et digestives Candidoses profondes (voie IV)
Echinocandines	Caspofungine Micafungine Anidulafungine	Inhibition de la β -1,3 glucane synthétase	<u>Voie injectable</u> : Rash cutané, réactions locales au point d'injection, leucopénie, céphalées, nausées	Candidoses profondes
Dérivés azolés	Fluconazole Itraconazole Kétoconazole Voriconazole Posaconazole	Inhibition de la 14 α -lanostérol déméthylase	<u>Voie locale</u> : bien tolérés <u>Voie générale</u> : Hépatotoxicité (kétoconazole)	Candidoses superficielles et profondes
Analogues de la pyrimidine	5-Fluorocytosine	Inhibition de la thymidylate synthétase	<u>Voie injectable</u> : Troubles hépatiques et hématologiques dose-dépendants	En association dans les candidoses profondes
Allylamines	Terbinafine	Inhibition de la squalène-époxydase	<u>Voie orale</u> : Troubles digestifs, hépatiques, hématologiques <u>Voie locale</u> : Prurit, eczémas de contact	Candidoses cutanées; onychomycoses, intertrigos
Dérivés synthétiques de la morpholine	Amorolfine	Inhibition de la synthèse des stérols	<u>Voie locale</u> : anomalies unguéales, sensations de brûlures cutanées	Onychomycoses
Pyridones	Ciclopirox	Inhibition du métabolisme énergétique	<u>Voie locale</u> : picotements, irritations...	Candidoses cutanées; onychomycoses

Tableau 1 : Classes principales d'antifongiques actifs contre *Candida* : exemples de composés commercialisés, leurs mécanismes d'action, effets indésirables et indications

VIII. Résistance aux traitements

VIII.1. Définition

La résistance est la faculté d'un micro-organisme à s'opposer à l'action d'un médicament. Deux types de résistance sont à distinguer : la résistance intrinsèque et la résistance acquise. La résistance intrinsèque ou naturelle est une caractéristique propre à l'espèce. La résistance acquise correspond au développement d'une résistance à un traitement d'une espèce habituellement sensible. Elle apparaît progressivement après exposition à ce traitement [Dannaoui E., 2013].

Au cours des dernières décennies, bien que le nombre de molécules antifongiques disponibles sur le marché s'accroît, le nombre d'isolats de *Candida* résistants prolifère [Pfaller M. A. et al., 2007]. En effet, une utilisation massive d'antifongiques en curatif ou préventif est notamment la cause d'une augmentation de la résistance de ces microorganismes conduisant à des échecs thérapeutiques [Ripert et al., 2013].

Les mécanismes souvent mis en jeu sont des mutations de gènes codant pour des enzymes ou codant pour les cibles d'antifongiques [Ripert et al., 2013].

VIII.2. Mécanismes de résistance décrits pour quelques molécules anti-*Candida*

VIII.2.1. Polyènes

Les résistances aux polyènes sont assez rares car ces composés n'ont pas besoin de pénétrer dans les cellules fongiques pour exercer leur effet. Le principal mécanisme de résistance observé est l'absence de la cible ergostérol. [Ripert et al., 2013]

VIII.2.2. Echinocandines

Les résistances aux échinocandines sont relativement rares. Quelques mutations ponctuelles sont décrites [Ripert et al., 2013].

VIII.2.3. Dérivés azolés

Les mécanismes de résistance fongique aux dérivés azolés sont les plus étudiés. En effet, de nombreux cas de résistance ont été décrits dès les années 1980 de part l'utilisation massive de ces molécules [Ripert et al., 2013].

Trois mécanismes de résistance sont donc décrits :

- Diminution de l'affinité des azolés pour leur cible : l'enzyme 14 α -lanostérol déméthylase
- Multiplication du nombre de copie de l'enzyme 14 α -lanostérol déméthylase
- Surexpression des protéines d'efflux entraînant une diminution des concentrations intracellulaires en antifongique

[Ripert et al., 2013]

VIII.2.4. Analogues de la pyrimidine

En raison de la survenue de résistance, la 5-fluorocytosine n'est pas utilisée en monothérapie mais toujours associée à l'amphotéricine B ou plus récemment aux dérivés azolés. La résistance est intrinsèque (*C. tropicalis*) ou acquise (concerne 7 à 8 % d'isolats résistants pour le genre *Candida*). Les mécanismes mis en jeu sont le plus souvent un excès de cible ou une mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme.

[Ripert et al., 2013]

VIII.3. Le biofilm : forme de résistance

VIII.3.1. Définition

Un biofilm se définit comme une communauté microbienne adhérente à une surface organique ou non et englobée dans une matrice extracellulaire (MEC) d'origine microbienne. Il peut être formé d'une seule ou le plus souvent de nombreuses espèces [Lebeaux D et al, 2014].

La formation d'un biofilm fongique est complexe. Son architecture peut être différente selon la surface d'adhérence et selon les espèces [Mukherjee P.K et al, 2004].

VIII.3.2. Les étapes de formation du biofilm

Sa formation se déroule en quatre étapes successives (Figure 5) :

VIII.3.2.1. Phase d'adhérence

Entre 0 et 11 h, les levures (blastospores) adhèrent au substrat et se multiplient en formant des microcolonies. Des interactions non spécifiques sont d'abord mises en œuvre (forces de Van der Waals,...) puis des interactions spécifiques s'établissent (interactions récepteurs-ligands).

Enfin, une adhérence irréversible est observée grâce à l'expression de molécules d'adhérence de type adhésines.

VIII.3.2.2. Phase intermédiaire

Entre 12 et 30 h, les microcolonies deviennent des macrocolonies donnant naissance à une monocouche confluente. De plus, des tubes germinatifs commencent à se différencier en filaments (hyphes) et la synthèse de la MEC s'initie.

VIII.3.2.3. Phase de maturation

Entre 31 et 72 h, le biofilm grandit et la synthèse de la MEC s'intensifie. Un biofilm mature est donc un enchevêtrement de cellules fongiques, blastospores et hyphes au sein de la matrice.

VIII.3.2.4. Phase de dispersion

Cette phase commence au-delà de 48 h. Des blastospores se dispersent de façon isolée ou en amas afin de coloniser d'autres sites environnants. Cette dispersion se réalise soit de façon passive (forces de cisaillement engendrées par un flux) soit de façon active (enzymes hydrolytiques sécrétées par les microorganismes).

[Imbert C., 2013]

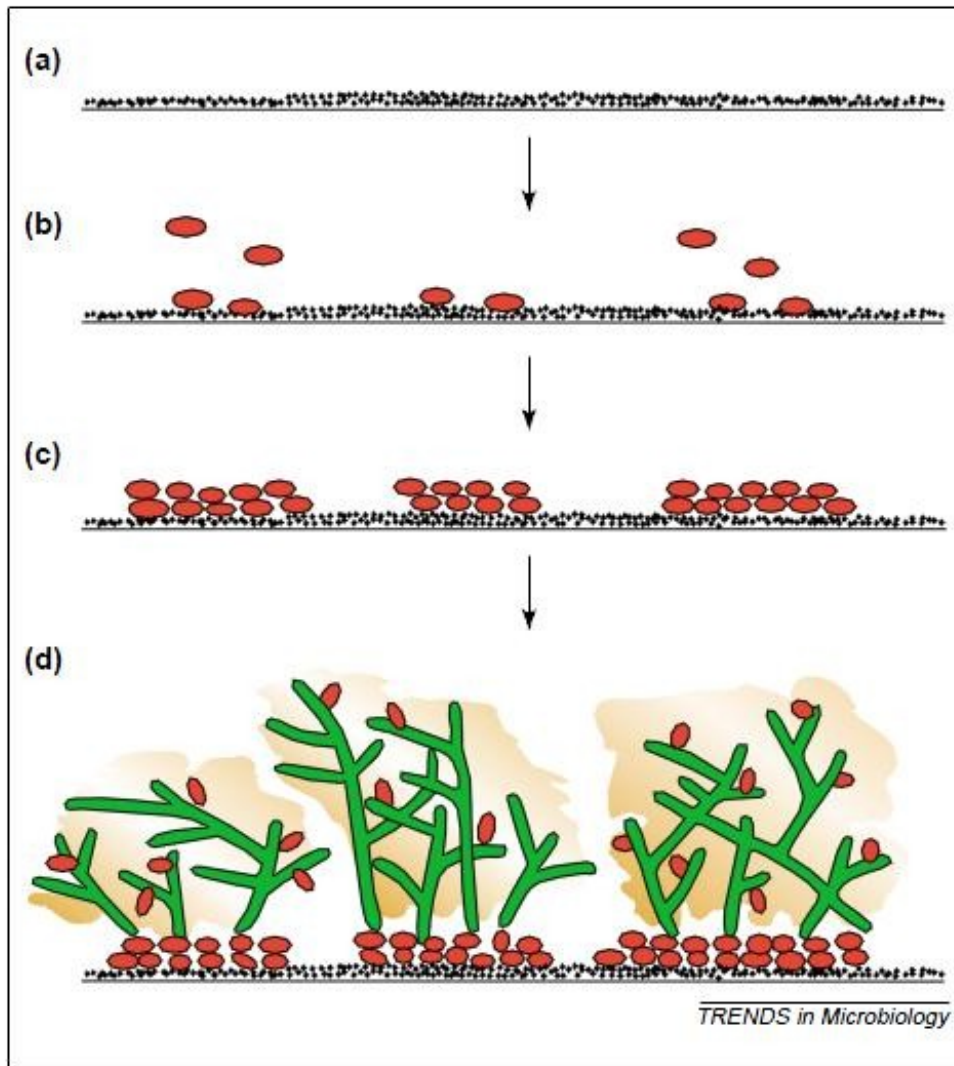


Figure 5 : Schéma des trois premières étapes de formation d'un biofilm de *Candida albicans* à la surface d'un cathéter en PVC. (a) : surface du cathéter recouvert de protéines (points noirs) ; (b) : étape d'adhérence des blastospores (points rouges) ; (c) : formation des microcolonies; (d) : phase de maturation (la MEC apparaît en orange, les hyphes en vert)

[Douglas L.J., 2003]

VIII.3.3. Forme de résistance

Cette organisation complexe favorise la résistance de ces microorganismes aux antifongiques actuels. Cette résistance à un biofilm fongique est connue depuis 1995. En effet, Stephen P. Hawser et L. Julia Douglas ont ainsi mis en évidence la résistance d'un biofilm de *Candida albicans* vis à vis de 5 molécules antifongiques. Les CI 50 (concentration minimale inhibant 50% des cellules) sont environ 6 fois plus élevées lors de l'évaluation de l'activité anti-biofilm que lors de tests contre des cellules planctoniques (non organisées en biofilm) [Hawser S.P et al, 1995].

Cette résistance augmente au fur et à mesure de la maturation du biofilm. En effet, il a été observé des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (concentration la plus faible d'une substance capable d'inhiber toute croissance de micro-organismes) de plusieurs antifongiques beaucoup plus élevées pendant la phase de maturation que pendant la phase initiale d'adhérence [Chandra J. et al., 2001].

Au sein de ce biofilm, plusieurs mécanismes de résistance entrent en jeu. Une diffusion altérée des antifongiques au sein du biofilm est mise en évidence notamment à cause de la surexpression des pompes à efflux. Cependant, ces pompes contribuent à la résistance seulement dans les premières phases de formation du biofilm. Par ailleurs, il a été observé une modification de la composition en stérols de la membrane des cellules fongiques impliquées dans le biofilm. Au cours des phases intermédiaires et matures du biofilm, les concentrations en ergostérol diminuent ce qui augmentent la résistance aux azolés, l'ergostérol étant leur cible [Mukherjee P.K et al, 2004]. Additionnés à ces mécanismes, une croissance plus lente des champignons au sein du biofilm, la capacité à produire des enzymes dégradant les antifongiques et la MEC jouant un rôle de barrière sont également décrites dans certaines études comme mécanismes de résistance [Hawser S.P et al, 1995].

VIII.3.4. Antifongiques actifs contre les biofilms de *Candida*

Cette structure de biofilm et les mécanismes de résistance associés induisent un nombre restreint d'antifongiques efficaces. Seules les échinocandines et les formulations lipidiques d'amphotéricine B (liposomale et sous forme de complexe lipidique) sont actifs. On peut remarquer que la forme lipidique de la nystatine n'a pas d'action, indiquant que l'ajout de lipides dans la formulation de l'amphotéricine B n'est pas la seule raison de son efficacité. [Mukherjee P.K et al, 2004]

B. Le genre *Malassezia*

I. Taxonomie

La classification de ce genre a été sujette à plusieurs controverses et de nombreuses fois, il s'est vu changer de taxonomie en raison notamment de la difficulté à le cultiver. Actuellement, le genre *Malassezia* appartient au règne des *Fungi*, phylum des basidiomycètes, sous-division des *Ustilaginomycotina*, classe des Exobasidiomycètes, ordre des Malasseziales et famille des Malasseziacées. [Ripert et al., 2013][Boekhout T. et al., 2010]

Quatorze espèces sont répertoriées dans ce genre comme par exemple : *Malassezia furfur* (connue autrefois sous le nom de *Pityrosporum ovale*) et *Malassezia pachydermatis* [Ripert et al., 2013].

II. Biotope

Le genre *Malassezia* est retrouvé à l'état commensal à la surface externe de la couche cornée de l'Homme et des animaux homéothermes principalement dans les zones riches en glandes sébacées. *Malassezia furfur* est détectée chez l'Homme, *Malassezia pachydermatis* principalement chez l'animal [Ripert et al., 2013]. Ces levures peuvent devenir pathogènes sous l'influence de divers facteurs, parmi lesquels l'humidité, la chaleur, l'hyperhidration, l'influence hormonale (grossesse, hypercorticisme,...), une modification de l'immunité cellulaire, ou encore une prédisposition génétique [Colomb G., 2011].

III. Morphologie et caractéristiques

Malassezia sp. se présente sous deux formes : blastospore qui est la forme prédominante et filamenteuse ou mycélienne, [Ashbee H. R et al., 2002] cette dernière étant associée à l'état pathogène de la levure [Ripert et al., 2013]. Les blastospores, mesurant de 2,5 à 6 µm de longueur, peuvent prendre une forme allongée, ovale, cylindrique ou sphérique [Ashbee H. R et al., 2002].

Sa reproduction asexuée s'effectue par bourgeonnement unipolaire [Ashbee H. R et al., 2002].

La paroi de *Malassezia* sp., présentant une structure multilamellaire, est très caractéristique de ce genre. Elle se divise en deux couches : une couche interne présentant des invaginations

spiralées adhérant à la membrane plasmique et une couche externe composée d'une capsule fibrillaire [Ben Salah I. et al., 2009]. L'épaisseur de cette paroi (0,12 μm) est supérieure à celle des autres levures. Elle représente 26 à 37 % du volume total de la cellule [Ashbee H. R et al., 2002].

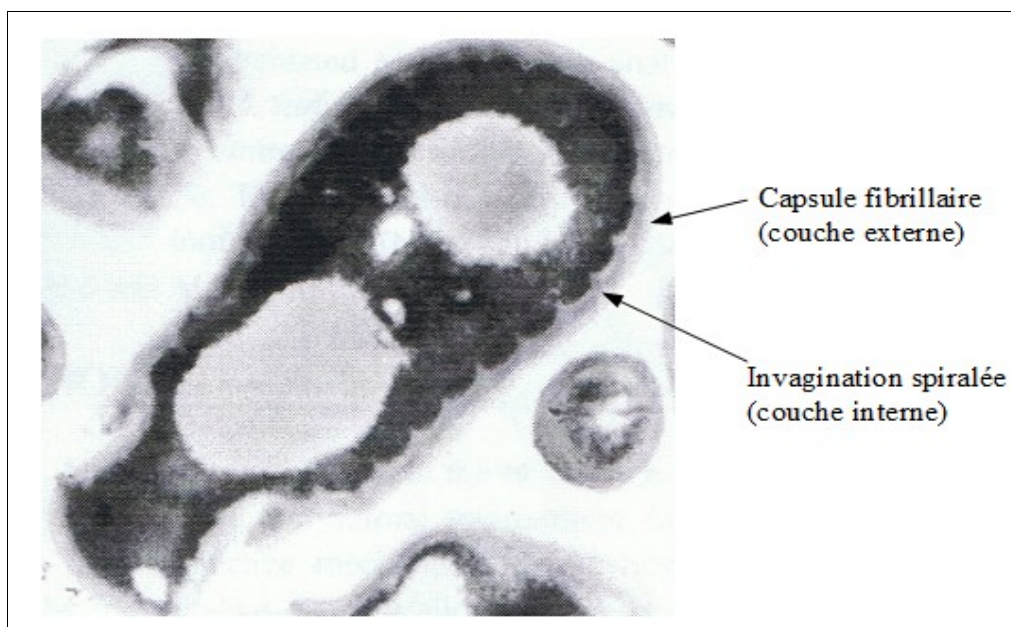


Figure 6 : Aspect de la paroi de *Malassezia furfur* (microscope électronique à transmission) [Su-Han Kim et al., 2009]

Les principaux constituants de cette paroi sont des sucres (70 %), des protéines (10 %), des lipides (15 à 20 %) ainsi que de petites quantités d'azote et de soufre [Ashbee H. R et al., 2002]. On peut noter que la teneur en lipides est élevée comparée à celle d'autres levures (*C. albicans* n'en contient que 1 à 2 %) [Su-Han Kim et al., 2009]. Ainsi, une autre caractéristique de *Malassezia* sp. est d'être lipodépendante, à l'exception de *M. pachydermatis*. *Malassezia* incorpore *in vivo* les triglycérides et les acides gras libres produits par les glandes sébacées [Ripert et al., 2013]. Étant incapable de fermenter les sucres, elle utilise les lipides comme seule source de carbone. *In vivo* et *in vitro*, une activité lipolytique est donc retrouvée et est nécessaire pour sa croissance cellulaire. Enfin, une dernière caractéristique du genre *Malassezia* est sa croissance lente : 3 à 4 jours *in vitro* (contre 1 à 2 jours pour *Candida* sp.), cultivé dans des conditions aérobies voire anaérobies [Ashbee H. R et al., 2002].

IV. Culture et aspect des colonies

Différents milieux de culture sont employés pour l'isolement des levures du genre *Malassezia*. Le milieu Sabouraud dextrose agar additionné d'huile d'olive permet l'isolement de quelques

espèces en particulier *M. furfur* et *M. pachydermatis*. Le milieu Dixon facilite l'identification et le comptage des colonies de part sa couleur foncée. Enfin, le milieu Leeming et Notman modifié est utilisé pour augmenter la biomasse des levures [Ben Salah I. et al., 2009].

Les colonies de *Malassezia* sp., sont habituellement convexes, lisses, douces, friables et de couleur crème [Ashbee H. R et al., 2002].

V. Infections impliquant *Malassezia*

Les Malassezioses ou pityrospores regroupent des infections superficielles souvent bénignes mais récidivantes et des infections profondes rares mais graves.

V.1. Pityriasis versicolor

Cette infection fongique superficielle de la peau est bénigne mais souvent récidivante. Elle atteint principalement les jeunes adultes notamment dans les pays chauds et humides avec une prévalence de 40 % [Dalenda El Euch et al., 2014]. L'espèce prédominante qui en est responsable est *M. globosa* mais des cas à *M. furfur* sont également répertoriés. Souvent asymptomatique, des lésions peuvent cependant apparaître ressemblant dans la plupart des cas, à des **macules** arrondies mesurant de quelques millimètres à quelques centimètres de diamètre. Ces lésions sont bien délimitées, squameuses, peu ou non prurigineuses, de couleur variable allant du beige clair au brun et sont localisées dans les zones les plus riches en glandes sébacées soit la partie supérieure du tronc, le dos, les épaules, les bras, le cou et plus rarement au visage [Ripert et al., 2013][Dalenda El Euch et al., 2014].

Des formes atypiques existent comme la forme achromiante caractérisée par des lésions peu squameuses et dépigmentées.



Figure 7 : Pityriasis versicolor [7]

V.2. Dermatite séborrhéique

Malassezia furfur, *M. globosa*, *M. sympodialis* et *M. slooffiae* sont responsables de dermatites séborrhéiques [Tragiannidis A. et al., 2009]. Cette affection fréquente touche les nourrissons, les adolescents et les adultes. Elle est caractérisée par des lésions érythémato-squameuses localisées au niveau des sourcils, cuir chevelu, **plis nasogéniens**, poitrine, dos, aisselles et organes génitaux [Gaitanis G. et al., 2012]. Elle peut atteindre parfois entièrement le thorax. Chez le nourrisson, l'atteinte du siège est fréquente avec un érythème important et peu de squames. En revanche, l'atteinte de son cuir chevelu est caractérisée par des squames grasses plus ou moins importantes appelées communément les « croûtes de lait » [Ripert et al., 2013].

Cette dermatite peut évoluer par poussées intermittentes, congestives et prurigineuses. Elle est favorisée par divers facteurs comme les peaux grasses, le stress, les facteurs hormonaux et les déficits immunitaires [Ripert et al., 2013].

V.3. Pityriasis capitis

Le pityriasis capitis est une forme particulière de la dermatite séborrhéique atteignant le cuir chevelu [Ripert et al., 2013]. *M. globosa* et *M. restricta* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées dans cette affection. Le pityriasis capitis est caractérisé par une desquamation fine, non inflammatoire et peu prurigineuse [Ben Salah I. et al., 2009]. Il est souvent générateur de pellicules (desquamations sèches ou grasses). Les pellicules sont associées à un déséquilibre de la proportion des bactéries majeures et des champignons du cuir chevelu (notamment *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* et *Malassezia restricta*) [Clavaud C. et al., 2013].

V.4. Dermatite atopique

Cette affection cutanée inflammatoire et chronique s'observe surtout chez le nourrisson et l'enfant. Des lésions eczématisques et prurigineuses surviennent par poussées inflammatoires récidivantes et entrecoupées de périodes de rémission. Ensuite, ces lésions deviennent croûteuses. C'est une affection génétique cependant la présence de levures du genre *Malassezia*, en particulier *M. sympodialis* et *M. furfur*, est un facteur déclenchant [Colomb G., 2011]. D'autres facteurs comme le stress, les savons irritants, la pollution, le tabagisme passif, une hygiène corporelle excessive, une alimentation inappropriée, le climat (sécheresse de l'air) peuvent aussi déclencher ces poussées [Ripert et al., 2013].

V.5. Folliculite à *Malassezia*

Il s'agit d'une inflammation des follicules pileux envahis par les levures du genre *Malassezia* en particulier *M. pachydermatis*, *M. globosa* et *M. furfur* [Tragiannidis A. et al., 2009]. Des **papules** et des **pustules** apparaissent ainsi qu'un prurit plus ou moins important. Cette affection est principalement localisée sur le tronc (dos et épaules) [Ripert et al., 2013].

V.6. Infections systémiques

Ces infections surviennent le plus souvent sur un terrain immunodéprimé (prématurés, patients atteints de cancer, SIDA, déficits immunitaires, ...) et souvent lors de nutrition parentérale avec apport lipidique. Plusieurs cas d'infections systémiques nosocomiales impliquant *M. furfur* et *M. pachydermatis* ont été décrits sur des prématurés ayant reçu par voie parentérale des émulsions lipidiques ou des antibiotiques à large spectre. [Ripert et al., 2013]

V.7. Psoriasis

La pathogénèse du psoriasis étant complexe, l'implication de *Malassezia* sp. n'a pas été encore réellement mise en évidence dans cette affection. Cette levure semble tout de même être un facteur exacerbant particulièrement au niveau du cuir chevelu [Gaitanis G. et al., 2012]. Le psoriasis, se traduisant alors par, des plaques inflammatoires rouges et prurigineuses où des squames blanchâtres et épaisses peuvent se détacher.

V.8. Otites externes chez le chien

M. pachydermatis, espèce zoophile, est retrouvé dans le conduit auditif des chiens, étant alors responsable d'otites externes [Gruson-Vescovali F.B., 2002].

VI. Traitements

Certaines molécules efficaces contre les infections impliquant *Malassezia* étant communes avec celles traitant les candidoses, une énumération succincte en sera faite ci-dessous. Néanmoins, ces traitements sont peu nombreux.

VI.1. Polyènes

Au sein de cette famille, seule l'amphotéricine B est employée sous forme injectable en cas d'infections systémiques à *Malassezia* [Ripert et al., 2013].

VI.2. Dérivés azolés

Ils sont très utilisés localement sous forme de sprays, lotions ou gels moussants en cas de pityriasis versicolor et capitis ainsi qu'en cas de dermatite séborrhéique. Les kétoconazole, bifonazole, éconazole et isoconazole sont par exemple utilisés [Ripert et al., 2013].

VI.3. Allylamines et pyridones

Terbinafine et ciclopirox sont indiqués localement sous forme de crèmes, vernis, poudres, solutions et shampoings en cas de pityriasis versicolor et capitis [Ripert et al., 2013].

VI.4. Autres traitements

VI.4.1. Sulfure de sélénium

Cet antifongique local à spectre étroit est indiqué en traitement du pityriasis versicolor. Ce composé possède des propriétés antiséborrhéiques et grâce à son excipient un effet détergent. [Dorosz Ph., 2011]

VI.4.2. Pyrithione de zinc

Ce composé est retrouvé dans de nombreux shampoings antipelliculaires. Il entraînerait une augmentation intracellulaire en zinc conduisant à inhiber la croissance microbienne. [Dorosz Ph., 2011]

VII. Résistance aux traitements

VII.1. Mécanismes de résistance décrits pour quelques molécules anti-*Malassezia*

Peu de cas de résistance sont répertoriés avec les dérivés azolés excepté avec le fluconazole. En effet, une étude rapporte que les CMI du fluconazole sont élevées pour 9,5 % des souches de *Malassezia* spp. planctoniques testées. Des traitements prophylactiques fréquents avec ce composé pourraient en être la cause. [Miranda K.C et al., 2006]

Une autre étude montre que 86 % des souches de *M. pachydermatis* testées sont résistantes au fluconazole avec une CMI élevée [Cafarchia C. et al., 2012].

VII.2. Biofilms : forme de résistance

VII.2.1. Les étapes de formation du biofilm

Les levures du genre *Malassezia* ont la capacité d'adhérer à différents types de surfaces (cellules, tissus, plastique,...) et de former un biofilm [Figueredo L.A et al., 2012]. Ses étapes de formation ont été très peu étudiées contrairement à celles du genre *Candida*. Cependant, les biofilms de *M. pachydermatis* sont connus pour être structurellement plus simples que ceux de *C. albicans* [Cannizzo F.T. et al., 2007]. Ils sont ainsi formés d'un réseau de levures bourgeonnantes unipolaires appelées **blastoconidies** organisé en une ou plusieurs couches enchevêtrées au sein d'une matrice extracellulaire [Cannizzo F.T. et al., 2007]. De plus, les phospholipases présentes chez *Malassezia* spp. jouent un rôle dans l'étape d'adhérence en stimulant les défenses immunitaires de l'hôte créant une réaction inflammatoire cutanée [Figueredo L.A et al., 2012] ce qui favorise le biofilm.

VII.2.2. Forme de résistance

Comme décrit pour *Candida* sp., l'organisation en biofilm est source de résistance.

En effet, d'après une étude récente de 2013, 93 à 98% des espèces de *Malassezia* sous forme **sessiles** (c'est-à-dire organisées en biofilm) testées étaient résistantes aux antifongiques (kétoconazole, fluconazole, itraconazole, terbinafine, posaconazole et voriconazole) alors que la plupart (92 à 100%) étaient sensibles à ces mêmes antifongiques sous forme planctonique. Plusieurs hypothèses sont émises quand aux mécanismes mis en jeu relativement peu décrits pour le genre *Malassezia*. L'architecture du biofilm lui-même ainsi que la présence de la MEC rendraient la pénétration des antifongiques plus difficile. De plus, la surexpression de pompes à efflux pourrait également contribuer à cette résistance [Figueredo L.A. et al., 2013].

VII.2.3. Antifongiques actifs contre les biofilms de *Malassezia*

In vitro, des études ont démontré que l'amphotéricine B et les agents antifongiques azolés seraient encore efficaces contre les biofilms de *Malassezia*. Cependant, il faut noter l'insuffisance de données cliniques, surtout qu'une étude démontre que seulement 10% des souches de *M. pachydermatis* testées sous forme de biofilm restent sensibles au fluconazole et au voriconazole.

[Figueredo L.A. et al., 2013][Tragiannidis A. et al., 2009]

C. Les sources naturelles étudiées

La Canneberge

I. Botanique

La Canneberge ou *Vaccinium macrocarpon* Aiton de la famille des Ericacées est un arbuste provenant d'Amérique du Nord. Il pousse naturellement dans les tourbières et les forêts d'altitude. Aujourd'hui, il est cultivé abondamment au Nord-Est des États-unis. Cet arbuste, pouvant atteindre 30 cm de hauteur, possède des feuilles persistantes ovales et des fleurs longuement



Figure 8 : *Vaccinium macrocarpon* (feuilles et fruits) [8]

pédunculées roses ou rouge, isolées à l'aisselle des feuilles ou en grappes **axillaires** ou terminales. Le fruit est une baie rouge vif acidulée. [Allais D, 2009][Iserin P. et al., 2007]

II. Composition chimique

Les baies de canneberge sont constituées d'eau (85 %), de sucres (3,7 %), d'acides organiques, de vitamine C (0,01 %), de minéraux et de composés phénoliques comprenant des flavonoïdes (0,05 %), des anthocyanosides (0,10 %, responsables de la coloration rouge), des proanthocyanidols de type A et de type B (0,12 %) et du catéchol [Allais D, 2009][Arnal B et al., 2008][Bruneton J, 2009].

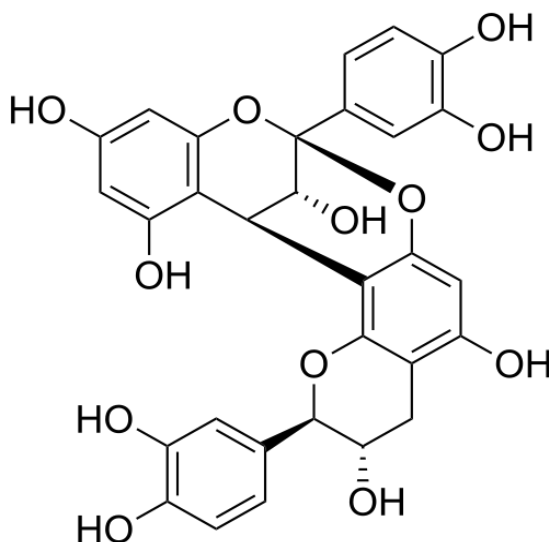


Figure 9 : Structure d'un proanthocyanidol de type A [9]

III. Propriétés pharmacologiques

I.1. Activité anti-adhérente

I.1.1. Bactérienne

La canneberge est réputée pour prévenir et traiter les infections urinaires grâce à son effet bactériostatique. D'une part, elle acidifie les urines diminuant ainsi la prolifération bactérienne. D'autre part, les proanthocyanidols de type A, contenus dans les baies, empêchent l'adhérence des bactéries aux épithéliums du tractus urinaire. Ils inhibent notamment les adhésines P-fimbriae d'*Escherichia coli*, la principale bactérie responsable de **cystite**. Les études réalisées montrent surtout un effet préventif, à défaut de curatif.

Elle empêche aussi l'adhérence de *Streptococcus mutans* à la surface des dents diminuant ainsi la formation de la plaque dentaire, et celle d'*Helicobacter pylori* à la muqueuse stomacale, prévenant la formation des ulcères de l'estomac. [Allais D, 2009]

I.1.2. Fongique

Des études récentes menées sur les infections nosocomiales du tractus urinaire montrent que la canneberge est douée d'une activité anti-adhérente à l'égard de *C. albicans in vitro* [Rane HS et al, 2014]. De plus, malgré l'absence d'effet diminuant la croissance des levures, les proanthocyanidols de type A de la canneberge sont capables *in vitro* de réduire l'adhérence de *C. albicans* à des cellules épithéliales buccales [Feldman M et al, 2012]. La canneberge pourrait donc être une nouvelle stratégie de prévention des infections urinaires à *Candida* et de prévention de candidoses buccales.

I.2. Activité anti-oxydante

De part les anthocyanosides présents dans les baies de canneberge, celles-ci démontrent une activité anti-oxydante. Une étude montre que ses polyphénols inhibent l'oxydation des lipides et des protéines et augmentent l'activité d'enzymes anti-oxydantes [Mathisona Bridget D. et al., 2014].

IV. Emplois

Les baies de canneberge sont employées soit à l'état frais, sec ou encore sous forme de jus de fruit déshydraté ou concentré.

A l'heure actuelle, aucun médicament ne contient d'extrait de canneberge. Une quarantaine de spécialités contenant de l'extrait de canneberge sont retrouvées soit sous forme de compléments alimentaires comme Urisanol® ou Cystiflash® soit, et depuis plus récemment, sous forme de dispositifs médicaux comme Cys-control® ou Monurelle Cranberry®. Ces spécialités possèdent depuis 2004 l'allégation santé suivante « contribue à diminuer la fixation de certaines bactéries *Escherichia coli* sur les parois des voies urinaires ». La dose considérée comme efficace est de 36 mg par jour de proanthocyanidols de type A ou équivalent en jus de fruit ou poudre concentrée de canneberge [Bruneton J, 2009].

Malgré cela, l'Anses reste prudente, faute de données cliniques suffisantes pour affirmer un effet préventif de la canneberge sur les cystites. [1]

La Myrtille

I. Botanique

La myrtille ou *Vaccinium myrtillus* L. de la famille des Ericacées est un sous-arbrisseau à feuilles coriaces. Il est retrouvé dans les sous-bois siliceux des régions montagneuses de l'hémisphère nord. Ses fleurs blanches ou roses sont seules ou groupées par deux à l'aisselle des feuilles. Le fruit est une baie bleu-noir **polysperme** globuleuse, à **mésocarpe** charnu et à sommet aplati. [Bruneton J, 2009]



Figure 10 : *Vaccinium myrtillus* (feuilles et fruits) [10]

II. Composition chimique

Les baies de myrtille contiennent essentiellement de l'eau (jusqu'à 90 %), des sucres (3 à 7 %) et des acides organiques. De plus, des acides-phénols, des flavonoïdes, des proanthocyanidols, des flavan-3-ols monomères ainsi que des anthocyanosides (0,5 %) ont été identifiés.

La feuille contient aussi des acides-phénols, des flavonoïdes, des proanthocyanidols et du catéchol (jusqu'à 10 %). [Bruneton J, 2009]

III. Propriétés pharmacologiques

Les anthocyanosides du fruit de la myrtille ont, *in vivo*, une action vasoprotectrice et anti-œdémateuse. Ils inhibent l'agrégation plaquettaire et présentent des propriétés anti-oxydantes. Ils facilitent également la régénération de la rhodopsine, pigment visuel de la rétine, améliorant ainsi la vision en lumière atténuée [Bruneton J, 2009].

Les baies auraient aussi des effets antibactériens, analgésiques [Dutot M. et al., 2008] et anti-diarrhéiques [Iserin P. et al., 2007]. Une étude récente sur l'espèce *Vaccinium virgatum*, proche de l'espèce *myrtillus*, a mis en évidence une activité anti-adhérente bactérienne de ses extraits notamment contre *Staphylococcus epidermidis*. Ces extraits de *Vaccinium* inhibent jusqu'à 80% la formation d'un biofilm à *S. epidermidis* à faibles concentrations. En revanche, ils n'empêchent pas sa croissance bactérienne. [Zimmer K.R. et al., 2013]

IV. Emplois

L'extrait enrichi en anthocyanosides de myrtille associé au bêta-carotène compose une spécialité nommée DIFRAREL®, indiquée dans les traitements d'appoint des manifestations fonctionnelles des insuffisances veinolymphatiques, des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire et des baisses d'acuité et troubles du champ visuel présumés d'origine vasculaire. Associé à la vitamine E, cet extrait est employé dans les troubles de la vision nocturne et la myopie. [Vidal, 2015] Cependant, d'autres indications thérapeutiques du fruit frais ou sec et de la feuille de myrtille peuvent être revendiquées d'après la note explicative de l'agence du médicament de 1998. En effet, le fruit frais ou sec peut être traditionnellement utilisé en traitement adjuvant de la composante douloureuse des troubles fonctionnels digestifs. Le fruit frais peut aussi être employé par voie orale ou locale dans le traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire comme les ecchymoses ou **pétéchies**. La feuille tout comme le fruit sec, peuvent être employés dans le traitement des diarrhées légères. Toutefois, il existerait un risque toxicologique à employer la partie feuille. [Bruneton J, 2009]

L'acérola

I. Botanique

L'acérola ou *Malpighia puniceifolia* L., de la famille des Malpighiacées, est un arbuste à feuillage persistant originaire d'Amérique centrale et du sud. Il est cultivé surtout au Brésil où le sol et le climat y sont appropriés. Les feuilles sont opposées, de forme **elliptique** et à pointe aiguë mesurant 3 à 8 cm de longueur. Les fleurs, de couleur rouge, se disposent en **inflorescence** axillaire. Ses **drupes** trilobées



Figure 11 : *Malpighia puniceifolia*
(feuilles et fruits) [11]

ressemblant à des cerises, l'acérola est souvent surnommé la cerise des Antilles ou des Barbades. [Vendramini Ana L. et al., 2000]

II. Composition chimique

Les drupes sont connues pour leur forte teneur en vitamine C (jusqu'à 2g/100g) [Vendramini Ana L. et al., 2000]. C'est au stade non mûr (fruit vert) que cette teneur est la plus élevée, diminuant de moitié par oxydation, au fur et à mesure de la maturation. Une fois mûr, le fruit se putréfie très rapidement à température ambiante [Vendramini Ana L. et al., 2000].

De plus, ces drupes renferment aussi de l'eau, d'autres vitamines (thiamine, riboflavine, niacine), des sels minéraux ainsi que des caroténoïdes et des polyphénols (en particulier des anthocyanes) [Mezadri T. et al., 2008].

III. Propriétés pharmacologiques

De part sa richesse en vitamine C et polyphénols, le fruit d'acérola serait doué de fortes actions anti-oxydante et immunostimulante [Vendramini Ana L. et al., 2000][Mezadri T. et al., 2008].

IV. Emplois

Aujourd'hui, le fruit d'acérola est commercialisé sous diverses formes notamment comme complément alimentaire anti-fatigue. En effet, due à sa richesse en vitamine C, il peut prétendre contribuer à réduire les **asthénies** fonctionnelles, à favoriser l'absorption digestive du fer, à veiller au fonctionnement normal des systèmes nerveux, inflammatoire, sanguin et osseux si et seulement s'il contient au minimum 12 mg de vitamine C pour 100g [2].

La framboise

I. Botanique

Le framboisier ou *Rubus idaeus* L., est un arbuste commun des régions tempérées à tiges hérissées et piquantes. Il appartient à la familles des Rosacées. Ses feuilles caduques sont composées de 3 à 7 folioles **tomenteuses** et blanches en dessous. Ses fleurs blanches sont regroupées en inflorescence [3]. Son fruit, la framboise, est une polydrupe rouge pâle ou jaune selon la variété [Iserin P. et al., 2007].



Figure 12 : *Rubus idaeus* (feuilles et fruits) [12]

II. Composition chimique

La framboise contient essentiellement de l'eau, des pectines, des sucres, des vitamines A, B1 et C ainsi que des polyphénols comme des anthocyanosides, des flavonoïdes et des tanins [Iserin P., 2007][Yu Fu et al., 2015].

III. Propriétés pharmacologiques

Les anthocyanosides et l'acide ellagique (polyphénols) lui confèrent des propriétés anti-oxydantes. Cet acide aurait également des propriétés anti-virales, anti-bactériennes et anti-tumorales [Shivraj Hariram Nile M.Sc et al., 2013]. Une étude réalisée sur l'espèce *Rubus ulmifolius* a permis de mettre en évidence l'activité anti-biofilm bactérien d'une fraction méthanolique contenant entre autres l'acide ellagique [Quave C.L., 2012]. D'autre part, le fruit ainsi que les feuilles ont un effet **astringent** [Iserin P., 2007].

IV. Emplois

Traditionnellement, le framboisier, et principalement ses feuilles, sont employés en cas d'infections buccales, lors de l'accouchement (augmentant l'amplitude des contractions donc facilitant le travail) mais aussi comme sédatif des règles douloureuses. En décoction, les feuilles permettent de traiter les diarrhées [Iserin P., 2007][Bruneton J, 2009].

Les Lichens

I. Définition

D'après Hawksworth (1988) : « *Un lichen est une association stable, indépendante entre un mycosymbiote (champignon) et un photosymbiote (algue ou cyanobactérie), dans laquelle le mycosymbiote est le partenaire englobant l'autre* » [Van Haluwyn et al., 1993].

Les lichens ne possèdent pas de règne propre; ils sont intégrés à la classification des champignons. La plupart des lichens appartiennent au phylum des Ascomycètes [4]. Les champignons composant les lichens sont pour la plupart des Ascomycètes et des Basidiomycètes. Quant aux algues, elles appartiennent le plus souvent aux Ulvophytes (algues vertes) [Branislav Rankovic, 2015].

La symbiose est une association bénéfique entre deux hôtes. Dans le cas des lichens, l'algue fournit, grâce à la photosynthèse, les nutriments nécessaires au développement du lichen. Le champignon, lui, assure un support à l'algue grâce à ses filaments et évite qu'elle se déshydrate.

Actuellement, environ 18 500 espèces de lichens sont recensées. [Branislav Rankovic, 2015]
Les lichens sont cosmopolites, retrouvés dans des habitats très diverses et notamment des milieux hostiles présentant des températures très basses, une obscurité, luminosité ou sécheresse prolongées. Tous ces facteurs peuvent faire varier la concentration des composés chimiques contenus dans les lichens. [Van Haluwyn et al., 1993][Pollyanna A. S. White et al., 2014]

II. Composition chimique

Les lichens sont essentiellement constitués d'eau (environ 50%), de substances minérales (1 à 2%), de polysaccharides (α -glucanes, β -glucanes, galactomannanes et hétéroglycanes), d'alcools (mannitol, sorbitol, ...), de protéines (2 à 10 % du poids sec), de lipides, de vitamines et d'enzymes appartenant au métabolisme primaire. Les métabolites secondaires des lichens sont des molécules complexes appelées auparavant substances lichéniques correspondant principalement à des acides organiques. Ces molécules appartiennent à diverses classes chimiques : les depsides, les depsidones, les dibenzofuranes et les terpènes.

[Mitrović T. et al., 2011][Souchon C., 1971]

Parmi ces acides organiques, le plus abondant est l'acide usnique (Figure 13). Il s'agit d'un pigment de structure dibenzofuranique retrouvé principalement chez certaines espèces de lichens du genre *Usnea*, *Cladonia* et *Ramalina* (Figure 14) [Bruneton J, 2009][Vertika Shukla et al., 2010].

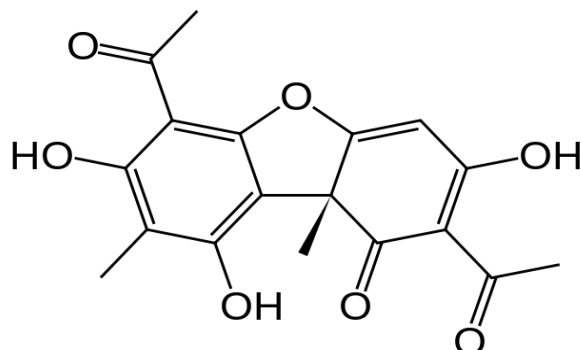


Figure 13 : Structure de l' (+)-acide usnique [13]



Figure 14 : Photographies d'*Usnea* sp. [14], de *Cladonia squamosa* [15] et de *Ramalina* sp. [16] (de gauche à droite)

III. Propriétés pharmacologiques

Les composés phénoliques présents dans les lichens auraient un rôle dans le maintien de la symbiose entre le champignon et l'algue et semblent lutter contre le stress oxydant. Ainsi, les depsidones ont précédemment démontré un effet anti-oxydant ainsi que des activités cytotoxiques [Pollyanna A. S. White et al., 2014].

Les acides organiques des lichens seraient de puissants inhibiteurs d'enzymes du métabolisme. Parmi ces acides, l'acide usnique semble présenter un intérêt en cas de maladies cardiovasculaires, respiratoires et gastriques. Il posséderait également des propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-fongique et anti-bactérienne [Pollyanna A. S. White et al., 2014][Vertika Shukla et al., 2010]. Il semble notamment empêcher la formation de biofilms bactériens à *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [Ingolfssdottir. K, 2002].

D'autre part, d'après plusieurs études réalisées au Japon, les polysaccharides présenteraient des propriétés anti-virales, anti-tumorales et immunomodulatrices associées à une faible toxicité [Olafsdottir ES et al., 2001].

IV. Emplois

Historiquement, les lichens ont été utilisés en médecine en se basant sur la théorie des signatures de Paracelse qui énonce que « les semblables soignent les semblables ». En effet, l'espèce *Lobaria pulmonaria* ressemblant à des lobules de poumons était utilisée pour traiter les affections respiratoires. Actuellement, cette espèce est toujours employée en homéopathie sous le nom de *Sticta pulmonaria* (synonyme de *Lobaria pulmonaria*). Une teinture mère est préparée à partir du thalle séché de ce lichen puis les dilutions qui en sont issues sont utilisées en cas de rhume, sinusite ou trachéite [5].

En parfumerie, des lichens, notamment ceux de pin (*Parmelia furfuracea*) et du chêne (*Evernia prunastri*), sont utilisés comme fixateur étant capable de contrôler l'évaporation de divers constituants de certains parfums et de leur donner une note boisée. Mais certains composés lichéniques sont connus pour être irritant et allergisant, étant à l'origine de dermatoses de contact. [Van Haluwyn et al., 1993][Souchon C., 1971]

Enfin, les lichens pourraient entrer dans la composition de filtres anti-UV puisqu'ils renferment des pigments photoprotecteurs dont la concentration augmente lors de fortes radiations aux UVs [Rossignol P, 2013].

PARTIE II :

Étude expérimentale

A. Étude menées sur *Candida*

La première partie du travail expérimental, développée dans les paragraphes suivants, s'est focalisée sur l'évaluation des activités anti-adhérentes et anti-biofilms d'extraits naturels sélectionnés contre des levures du genre *Candida*.

I. Matériels et méthodes

I.1. Organismes et conditions de culture

I.1.1. Espèces utilisées

Trois espèces de levures du genre *Candida*, provenant de l'American Type Culture Collection (Manassas, Etats-Unis) et de la Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussels, Belgique) ont été utilisées :

- *Candida albicans* ATCC 3153
- *Candida glabrata* IHEM 9556
- *Candida parapsilosis* ATCC 22 019

I.1.2. Conditions de culture

Ces levures sont ensemencées sur un milieu gélosé Sabouraud additionné de chloramphénicol (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) puis incubées 24 h à 37°C .

Pour obtenir un biofilm, des colonies sont prélevées de cette culture et transférées dans 30 mL de Yeast Nitrogen Base Médium (Difco, Detroit, MI) enrichi avec 50 mM de glucose (Sigma, St Louis, MO) (YNB-Glc). Cette suspension est mise à incuber une nuit à 37°C sans agitation.

I.2. Matériel végétal et lichénique

Trois catégories de matériel ont été testées :

I.2.1. Quatre extraits commerciaux de fruits rouges en poudre

- Canneberge (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericacées; réf 1079)
- Acérola (*Malpighia puniceifolia* L, Malpighiacées; réf 1087)
- Myrtille (*Vaccinium myrtillus* L, Ericacées; réf 1085)

- Framboise (*Rubus idaeus* L, Rosacées; réf 1084)

Ils ont été achetés aux laboratoires HYTECK Aroma-Zone de Clermont-Ferrand.

I.2.2. Fractions et sous-fractions issues d'un jus de canneberge commercial transformé

Le jus de canneberge commercial de départ est un jus pasteurisé et clarifié produit par l'entreprise Fruit d'Or (Notre-Dame-de-Lourdes, QC, Canada). Ce jus a été fractionné au sein de l'équipe Recherche et Innovation en Chimie Médicinale (RICM) UMR INRA 1282 Infectiologie et Santé Publique de l'Université de Tours (Dr L. Boudesocque et Pr C. Enguehard-Gueiffier). Une première séparation a été effectuée sur résine d'Amberlite XAD16 permettant l'obtention de deux fractions : une fraction aqueuse concentrant des sucres et des composés non phénoliques et une fraction méthanolique contenant des composés phénoliques, ceci déduit après étude des profils analytiques de ces fractions par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette fraction méthanolique a été ensuite fractionnée sur résine Séphadex LH 20® permettant l'obtention de 6 sous-fractions analysées par CLHP et récapitulées dans le tableau suivant :

Fractions	Masse (mg)	Composants
1	732,0	Acides phénoliques et sucres restants
2	150,0	Anthocyanes, flavonols
3	46,6	Proanthocyanidols (PACs) de faible poids moléculaire
4	36,6	PACs et flavonoïdes
5	57,0	
6	30,7	PACs de haut poids moléculaire

Tableau 2 : Compositions et masses des 6 sous-fractions issues d'un jus de canneberge

I.2.3. Vingt-cinq extraits acétoniques de lichens

Les récoltes et extractions par l'acétone de ces lichens ont été réalisées au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN, EA 1069) de l'Université de Limoges (Dr M. Millot et Pr L. Mambu). Il s'agit des extraits de *Bryoria fuscescens*, *Cetrelia olivetorum*, *Cladonia furcata*, *Cladonia glauca*, *Cladonia parasitica*, *Cladonia squamosa*, *Lasallia pustulata*, *Lepraria membranacea*, *Leprocaulon microscopium*, *Leproloma membranacea*,

Lobaria pulmonaria, *Lobaria scrobiculata*, *Nephroma laevigatum*, *Nephroma parile*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia serrana*, *Peltigera collina*, *Peltigera horizontalis*, *Platismatia glauca*, *Pleurosticta acetabulum*, *Ramalina* sp., *Usnea* sp., *Usnea florida*, *Flavoparmelia caperata* et *Cladonia incrassata*.

I.2.4. Préparation des échantillons à tester

Des solutions mères des extraits commerciaux de fruits rouges ont été préparées à 100 mg/mL. Ces solutions ont été agitées et centrifugées pendant 15 min à 3000g à 25°C (Cr3i centrifuge Jouan).

D'autre part, des solutions mères des 2 fractions (aqueuse et méthanolique) et 6 sous-fractions issues du jus de canneberge ainsi que des extraits de lichens ont été préparées à la concentration de 500, 50 et 10 mg/mL respectivement dans de l'eau distillée stérile ou du DMSO selon leur solubilité.

I.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice : CMI

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la concentration la plus faible d'une substance capable d'inhiber toute croissance du micro-organisme. Cette CMI est déterminée par la méthode des microdilutions en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits, méthode adaptée du protocole M27-A3 du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

A partir d'une culture de *Candida* sp. de 24 h obtenue sur milieu gélosé Sabouraud additionné de chloramphénicol, une préculture à 0,5 Mc Farland dans du sérum physiologique est préparée. Cette préculture est ensuite diluée au 1/1000^e dans du milieu de culture RPMI-MOPS. La concentration finale est de 10⁵ cellules/mL.

Dans une microplaque 96 puits, 200 µL de milieu RPMI-MOPS sont déposés dans la première colonne puis 100 µL dans les autres. Les échantillons à tester sont ajoutés à raison de 4 µL dans la première colonne puis une série de dilutions au ½ est réalisée de façon à obtenir des concentrations décroissantes d'échantillon. Enfin, 100 µL de suspension de levures à 10⁵ cellules/mL sont déposés dans tous les puits de la microplaque.

Les extraits de lichens et les six sous fractions issues du jus de canneberge sont donc évalués à des concentrations de 100 à 0,05 µg/mL et 500 à 0,2 µg/mL respectivement.

Les fractions aqueuse et méthanolique de canneberge ainsi que les extraits commerciaux de fruits rouges sont évalués à des concentrations plus élevées de 5000 à 2 µg/mL et de 1000 à

0,5 µg/mL respectivement. La concentration finale en DMSO n'excède pas 2 % du volume total de chaque puits.

Des puits sont réservés pour les contrôles négatifs (culture non traitée), positifs (amphotéricine B), et un contrôle DMSO à 1% (vérification de son innocuité).

Les plaques sont incubées à 37°C sans agitation. L'absence ou la présence de colonies est ensuite observée visuellement et au microscope optique à 24 h puis 48 h d'incubation.

Les échantillons sont testés en duplicat et le test est répété un autre jour (n=2).

I.4. Détermination de l'activité anti-biofilm

I.4.1. Préparation du fluide buccal à 2%

Du fluide buccal humain est prélevé chez 12 volontaires sains. Ce pool de fluide buccal est traité par du Dithiothreitol (DTT) (2,5 mmol/L), agité dans la glace pendant 10 min puis centrifugé 20 min à 3000g, à 4°C. Le surnageant est dilué avec trois volumes d'eau distillée puis l'ensemble est stérilisé par filtration sur filtre de 22 µm. Cette solution mère stérile de fluide buccal à 25 %, est conservée à -80°C. Une dilution de cette solution dans de l'eau stérile permet l'obtention d'une solution de fluide buccal à 2 %.

I.4.2. Préparation de la suspension de levures

Une préculture est effectuée la veille du test dans du milieu YNB-glucose. Après une nuit d'incubation à 37°C, cette préculture est centrifugée 10 min à 2000 rpm, à 25°C puis le culot est lavé avec du PBS. Le culot final est repris dans du milieu YNB-glucose et la culture est portée à une concentration finale de 4.10^7 cellules/mL suivant un dénombrement sur cellule de Kova.

I.4.3. Tests anti-biofilms

Les deux tests suivants ont en commun l'ajout de 200 µL de fluide buccal à 2 % dans tous les puits d'une microplaque. Celle-ci est mise à incuber 1 h à 37°C. Un dépôt protéique se forme alors au fond des puits favorisant par la suite l'adhérence des levures.

Le fluide buccal est ensuite aspiré.

I.4.3.1. Test anti-adhérent

Dans la microplaque prétraitée par le fluide buccal, 200 μL de milieu YNB-Glucose sont déposés dans les puits de la deuxième colonne puis 100 μL dans les autres puits (Figure 15).

4 μL des différents échantillons sont déposés dans les puits des deux premières colonnes.

Des dilutions au $\frac{1}{2}$ sont ensuite réalisées à partir de la deuxième colonne.

Enfin, 100 μL de suspension de levures à 4.10^7 cellules/mL sont ajoutés dans tous les puits. Des puits sont réservés pour le contrôle négatif (culture non traitée) et un contrôle DMSO à 2% (vérification de son innocuité).

Les 2 fractions (aqueuse et méthanolique) et les 6 sous-fractions issues du jus de canneberge sont donc évaluées à des concentrations de 10 mg/mL à 5 $\mu\text{g/mL}$ et de 1 mg/mL à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. La concentration finale en DMSO n'excède pas 2% du volume total.

La plaque est incubée 2 h à 37°C permettant une mise en contact des échantillons avec les levures en phase d'adhérence.

Le test a été réalisé deux fois ($n=2$) et chaque échantillon a été testé en duplicat.

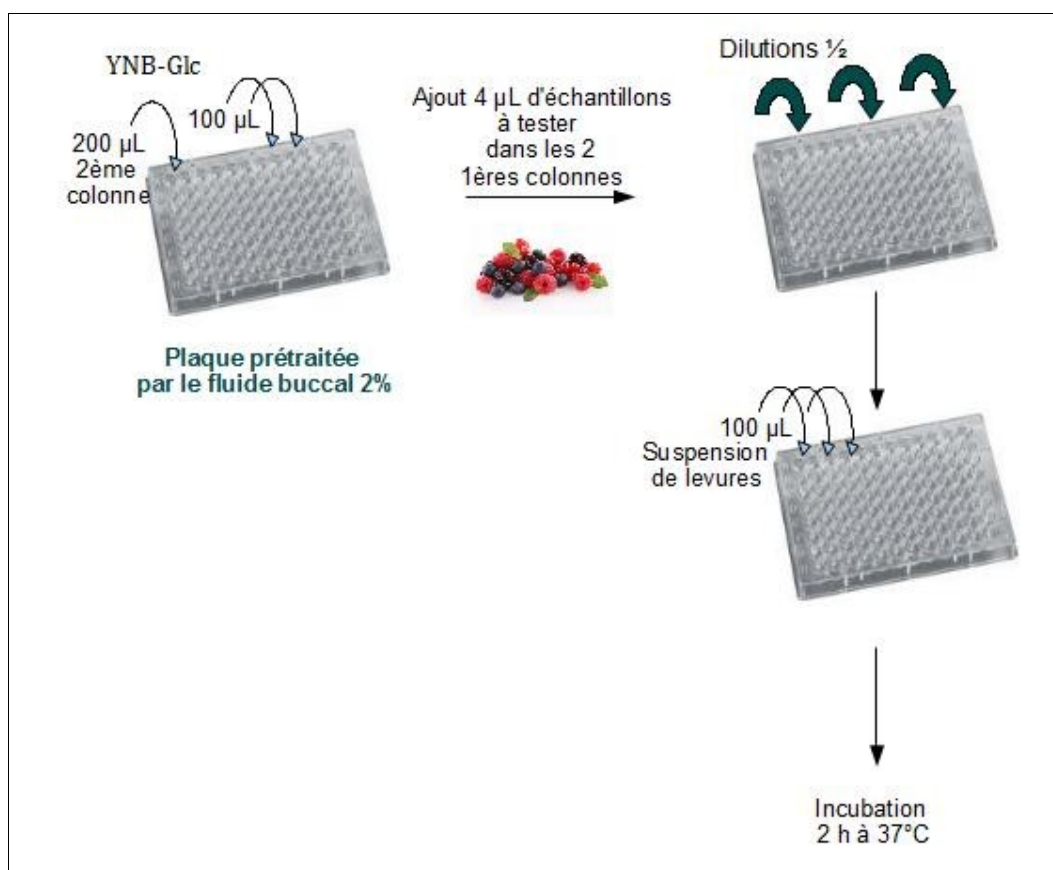


Figure 15 : Schéma récapitulatif de la méthode du test anti-adhérent

I.4.3.2. Test d'activité contre la phase de maturation du biofilm

Dans une microplaque 96 puits, 220 µL de milieu YNB-Glucose sont déposés dans les puits de la première colonne puis 110 µL dans les autres (Figure 16).

26,5 µL d'échantillons (extraits lichéniques) à tester sont ajoutés dans la première colonne puis des dilutions en série au ½ sont effectuées obtenant une gamme de concentrations de 1080 à 0,5 µg/mL. Des puits sont réservés pour le contrôle négatif (culture non traitée) et un contrôle DMSO à 2 % (vérification de son innocuité).

Chaque échantillon est testé en duplicat et le test a été réalisé deux fois (n=2).

200 µL de suspension de levures sont déposés dans chacun des puits de la plaque prétraitée par le fluide buccal. Cette plaque est à nouveau incubée 2 h à 37 °C sans agitation afin que la phase d'adhérence des levures s'initie.

A l'issue de cette incubation, une série de lavage au PBS est effectuée afin d'éliminer les levures non adhérentes.

Puis 250 µL de milieu YNB-glucose sont additionnés à tous les puits ainsi que 50 µL des échantillons précédemment préparés obtenant une gamme de concentrations finales de 180 à 0,09 µg/mL.

La plaque est alors incubée à 37°C pendant 24 et 48 h, le biofilm se développant en présence des produits à tester, ceci afin d'observer la rémanence de l'éventuel effet d'un traitement post-adhérence.

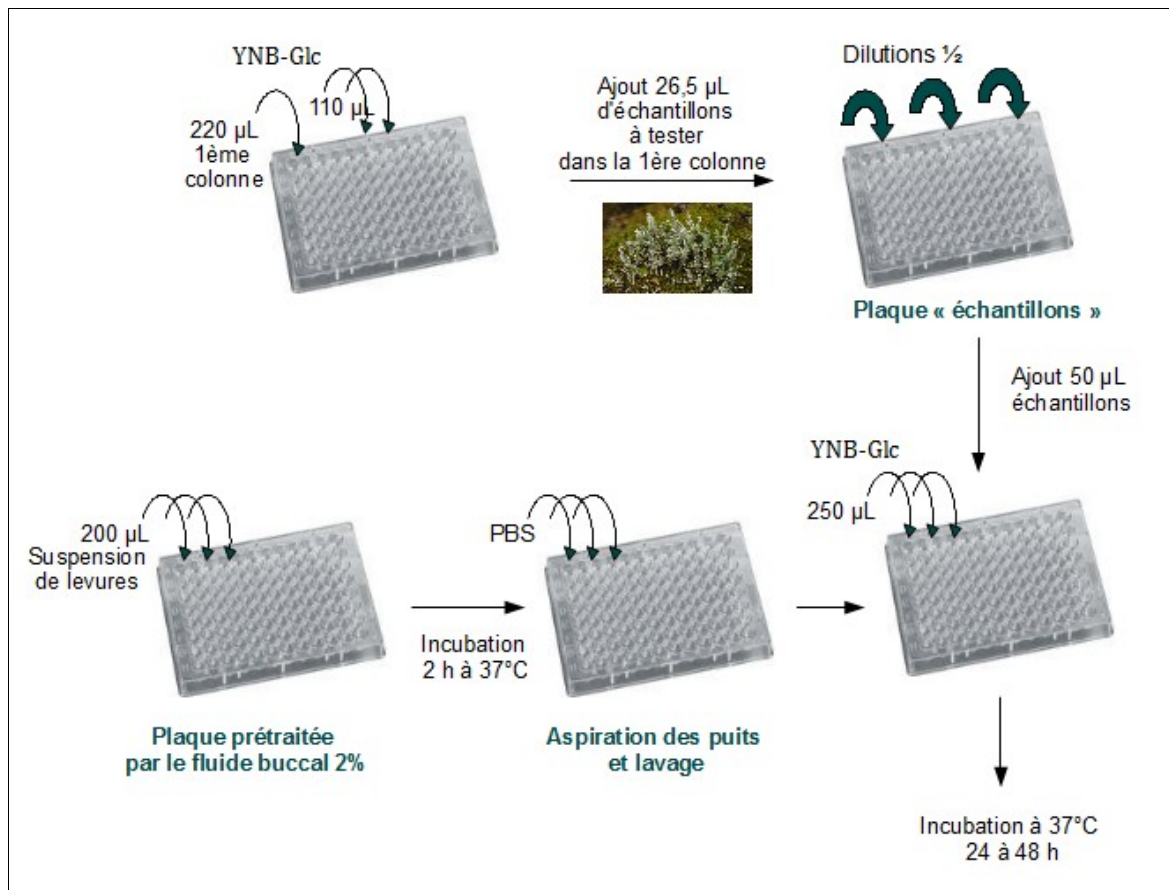


Figure 16 : Schéma récapitulatif de la méthode du test contre la phase de maturation du biofilm

I.4.4. Test XTT

Après récupération des plaques incubées pendant 2 h ou 24/48 h selon le test et après lavage de tous les puits avec du PBS afin d'éliminer les levures non adhérentes, 200 µL de PBS sont ajoutés à tous les puits et leur contenu est observé au microscope inversé. 50 µL de XTT-ménadione sont ensuite additionnés dans tous les puits.

Après 3 h d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 450 nm. En effet, le XTT qui est un sel de tétrazolium est réduit par les enzymes mitochondriales des levures en formazan (composé orangé) quantifié par spectrophotométrie. Ainsi, seules les levures ayant une activité métabolique sont indirectement mises en évidence. Ce XTT est couplé à la ménadione qui accélère la réaction et apporte ainsi une coloration orange plus intense du surnageant.

I.4.5. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus est réalisée grâce au logiciel Statview (version 5.0.0.0; SAS Institute Inc, Berkeley, CA). Les données sont soumises à une analyse de variance (ANOVA) ($p < 0.05$) et au test de Scheffé : pour chaque échantillon et chaque concentration, ces tests permettent de comparer la moyenne des absorbances des duplicats à la moyenne des absorbances du contrôle négatif (absence de traitement). L'échantillon sera dit « actif » si sa moyenne est significativement plus petite que celle du contrôle négatif.

II. Résultats – Discussion

II.1. Détermination de la CMI

Concernant les 25 extraits de lichens ainsi que les fractions et sous-fractions issues du jus de canneberge, une croissance des levures *C. albicans*, *C. glabrata* ou *C. parapsilosis* est observable sous forme de colonies dans chacun des puits. Les CMIs sont donc > 100 , 5000 ou $500 \mu\text{g/mL}$ respectivement.

De même, les extraits commerciaux de fruits rouges présentent des CMIs $> 1000 \mu\text{g/mL}$ contre les 3 espèces de *Candida* à l'exception des extraits de canneberge et de framboise dont les CMIs sont comprises entre 500 et $1000 \mu\text{g/mL}$ contre *C. parapsilosis*.

Ainsi, aucun effet antifongique n'est à signaler pour ces échantillons testés en comparaison au témoin amphotéricine B auquel toutes les espèces de *Candida* étudiées sont sensibles (CMI $< 2 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats corroborent ceux d'autres études récentes. En effet, Feldman *et al.* montrent que les PACs de la canneberge n'affectent pas la croissance de *C. albicans* [Feldman M *et al.*, 2012].

II.2. Évaluation de l'activité anti-adhérente des fractions et sous-fractions issues du jus de canneberge

Le test anti-adhérent n'a été effectué que sur les fractions et sous-fractions issues du jus de canneberge, les extraits lichéniques et commerciaux ayant été précédemment évalués.

II.2.1. Observations au microscope inversé des levures adhérentes après lavage au PBS et avant mesure de l'absorbance par spectrophotométrie

Les observations effectuées au microscope révèlent la présence de nombreuses levures adhérentes recouvrant le fond des puits contrôles négatifs (culture non traitée). Un aspect identique est observé dans les puits contenant les sous-fractions 1 et 2 ainsi que la fraction aqueuse. Ces trois échantillons n'empêcheraient donc pas l'adhérence des levures à la surface des puits. En revanche, la fraction méthanolique et les sous-fractions 3, 4 et 6 paraissent intéressantes car de nombreux puits les contenant semblent peu pourvues en levures. Elles présenteraient un intérêt anti-adhérent. Concernant la sous-fraction 5, l'analyse microscopique est rendue difficile par la présence de débris colorés dans les puits.

II.2.2. Mesure des absorbances

Pour chaque fraction et sous-fraction testées, les absorbances à 450 nm sont mesurées et leurs moyennes sont statistiquement comparées à celles du contrôle négatif. Les concentrations minimales anti-adhérentes (CMA), c'est-à-dire les plus faibles concentrations présentant une moyenne d'absorbance significativement plus faible que celle du contrôle négatif ($p < 0,05$), sont répertoriées dans le tableau 3.

Concentration minimale anti-adhérente (CMA) en mg/mL			
Fraction	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Aqueuse	10,5	10,5	10,5
Méthanolique	0,320	0,640	0,640
1	> 1	> 1	> 1
2	1	1	1
3	1	0,250	0,125
4	0,125	0,250	0,125
5	ND	ND	ND
6	0,062	0,250	0,125

ND : Non déterminée

Tableau 3 : Concentrations minimales anti-adhérentes (CMA) des fractions et sous-fractions issues du jus de canneberge

La fraction aqueuse de canneberge exerce une activité anti-adhérente à fortes concentrations (CMA = 10,5 mg/ml contre les 3 espèces de *Candida* testées). En revanche, la fraction méthanolique présente une activité anti-adhérente significative à faibles concentrations (0,320 ; 0,640 et 0,640 mg/mL sur *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis* respectivement).

Au vu de ces résultats, cette dernière fraction a été fractionnée au sein de l'équipe RICM UMR INRA 1282 de Tours, sur résine séphadex LH 20 et six sous-fractions ont été obtenues. Les sous-fractions 4 et 6 sont les plus actives avec des CMA comprises entre 0,062 et 0,250 mg/mL sur les 3 espèces de *Candida* testées.

La sous-fraction 3 est également intéressante avec une CMA de 0,250 mg/mL contre *C. glabrata* et 0,125 mg/mL contre *C. parapsilosis*.

Les sous-fractions 1 et 2 ne présentent pas d'activité anti-adhérente remarquable (CMA ≥ 1 mg/mL contre les 3 espèces). La CMA de la sous-fraction 5 n'a pu être déterminée due à la présence de débris colorés dans les puits, faussant ainsi la mesure des absorbances.

Les sous-fractions 3, 4 et 6 contiennent principalement des proanthocyanidols de faible et haut poids moléculaires accompagnés de flavonoïdes pour la sous-fraction 4 (Tableau 2). Ces molécules semblent être à l'origine des effets anti-adhérents observés sur les levures du genre *Candida*. Elles empêcheraient donc l'adhérence des levures à une surface, ceci corroborant les effets anti-adhérents bactériens connus des proanthocyanidols de canneberge [Lowe F.C et al., 2001][Feldman M et al., 2012].

II.3. Évaluation de l'activité contre la phase de maturation du biofilm des extraits de lichens

Ce test a été réalisé uniquement sur les 11 extraits lichéniques, manquant de temps pour l'évaluation de l'activité de la totalité des 25 extraits lichéniques, des extraits commerciaux, fractions et sous-fractions de canneberge.

II.3.1. Observations microscopiques des levures formant le biofilm après lavage par le PBS et avant mesure de l'absorbance par spectrophotométrie

Des différences sont observées selon l'espèce de levure considérée. En ce qui concerne *C. albicans*, de nombreuses levures formant le biofilm sont observées dans les puits contrôles négatifs (culture non traitée). Un aspect identique est observé dans les puits contenant les extraits de lichens. Des amas de levures rondes ainsi que des formes filamenteuses sont visibles.

Considérant *C. glabrata*, il apparaît dans tous les puits, à 24 et 48 h, des amas de levures ainsi que des levures isolées, en proportions similaires aux contrôles négatifs. On peut noter une absence de formes filamenteuses.

Pour *C. parapsilosis*, des amas de levures sous formes hyphes et blastospores, en proportions identiques aux puits contrôles négatifs sont observés, à l'exception des extraits issus de *Nephroma laevigatum* (7) et *Usnea florida* (11) où les amas sont en plus faible quantité.

II.3.2. Mesure des absorbances

Pour chaque extrait testé, les absorbances à 450 nm sont mesurées et leurs moyennes sont statistiquement comparées à celles du contrôle négatif. Les concentrations minimales anti-biofilm (CMB), correspondant aux plus faibles concentrations d'extraits présentant une moyenne des absorbances significativement inférieure à celle du contrôle négatif ($p < 0,05$), sont répertoriées dans le tableau 4.

Extraits de lichens		Concentration minimale anti-biofilm (CMB) en µg/mL					
		<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24h	48 h
1	<i>Cladonia furcata</i>	180	> 180	> 180	> 180	> 180	≥ 180
2	<i>Cladonia glauca</i>	180	> 180	> 180			
3	<i>Cladonia parasitica</i>	22,5	180	90			
4	<i>Cladonia squamosa</i>	22,5	11,2	180			
5	<i>Lasallia pustulata</i>	90	180	> 180			
6	<i>Lepraria membranacea</i>	180	180	90			
7	<i>Nephroma laevigatum</i>	39,5	20,8	> 180			
8	<i>Peltigera collina</i>	90	180				
9	<i>Pleurosticta acetabulum</i>	180	180				
10	<i>Ramalina sp.</i>	90	> 180	90			
11	<i>Usnea florida</i>	22,5	11,2	> 180			

Tableau 4 : Concentrations minimales anti-biofilms (CMB) d'extraits de lichens

L'activité anti-biofilm des 11 extraits de lichens testés est espèce-dépendante. En effet, aucune activité significative à des concentrations inférieures à 90 $\mu\text{g/mL}$ n'a été observée pour les espèces *C. glabrata* et *parapsilosis* ($\text{CMB} \geq 90 \mu\text{g/mL}$). A l'inverse les extraits 3, 4, 7 et 11 montrent un effet anti-biofilm à faibles concentrations contre *C. albicans* après 24h de contact (CMB à 24 h : 22,5 $\mu\text{g/mL}$ pour les extraits 3, 4 et 11 et 39,5 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait 7). Cet effet est rémanent pour les extraits 4, 7 et 11 avec des CMBs à 48h de l'ordre de 11, 2 $\mu\text{g/mL}$ pour les extraits 4 et 11 et 20,8 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait 7.

Les effets anti-biofilm remarquables des 4 lichens *Cladonia parasitica*, *Cladonia squamosa*, *Nephroma laevigatum* et *Usnea florida* ont ainsi été mis en évidence.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants que les données de la littérature ne semblent pas faire référence à une quelconque activité anti-biofilm de ces 4 lichens.

On peut noter une certaine discordance entre les résultats des observations microscopiques et ceux déduits des mesures d'absorbance. Il est en effet plus difficile d'apprécier au microscope inversé les proportions de levures formant un biofilm (versus levures adhérentes) comparativement aux puits contrôles.

III. Conclusion et perspectives

La détermination des CMI des différents extraits végétaux et lichéniques testés démontrent une absence d'activité contre les levures du genre *Candida* planctoniques. En revanche, des effets sont observés avec certains échantillons testés contre des levures du genre *Candida* formant un biofilm en particulier lors de leur phase d'adhérence ou lors de la phase de maturation. Ainsi, l'extrait méthanolique ainsi que 3 des 6 sous-fractions issues du jus de canneberge présentent des activités anti-adhérentes à faibles concentrations (CMA entre 1 et 0,062 µg/mL). Ces résultats ont fait l'objet d'un article scientifique publié en avril 2014 (cf annexe 1).

De plus, les extraits acétoniques des lichens *Cladonia parasitica*, *Cladonia squamosa*, *Nephroma laevigatum* et *Usnea florida* démontrent une activité anti-biofilm à faibles concentrations sélectivement contre *C. albicans* (CMB à 24 h comprise entre 39,5 et 22,5 µg/mL).

Compte tenu des résultats obtenus avec les sous-fractions issues du jus de canneberge, il serait intéressant de poursuivre la purification des sous-fractions 3, 4 et 6 afin d'isoler les composés responsables de l'activité anti-adhérente.

Une analyse des profils chimiques par chromatographie liquide haute performance des 4 extraits lichéniques ayant démontré une activité anti-biofilm remarquable donnerait un premier aperçu de leur composition et pourrait mettre en évidence des composés potentiellement responsables de l'activité. Par exemple, la présence d'acide usnique pourrait être à l'origine de cet effet anti-biofilm. En effet, d'après Francolini *et al.*, l'acide usnique n'inhiberait pas la phase d'adhérence mais empêcherait la maturation du biofilm de bactéries [Francolini I. et al, 2004]. L'étude phytochimique de ces 4 extraits pourrait aboutir à l'identification et l'isolement des composés actifs.

Pour compléter cette étude, d'autres espèces de *Candida* ainsi que d'autres genres de levures pourraient être testés afin d'élargir le panel de micro-organismes évalués.

Ces résultats sont donc intéressants et pourrions compléter les données actuellement disponibles concernant les nouvelles thérapeutiques d'origine naturelle anti-adhérentes et/ou anti-biofilm de *Candida*.

B. Étude menées sur *Malassezia*

La seconde partie du travail expérimental a consisté en l'adaptation des protocoles d'évaluation des activités anti-adhérentes et anti-biofilms de *Candida* aux levures du genre *Malassezia*, ces deux levures étant, sur de nombreux points, différentes. Des mises au point ont donc été explorées et vont être détaillées dans les paragraphes suivants.

I. Matériels et méthodes

I.1. Organismes utilisés

I.1.1. Espèces utilisées

Deux espèces de levures du genre *Malassezia* ont été utilisées, provenant de prélèvements effectués par le laboratoire de parasitologie et mycologie médicale du CHU de Poitiers, d'une part sur un dispositif implanté, d'autre part sur la peau d'un patient :

- *Malassezia furfur* 1591 (prélèvement de cathéter)
- *Malassezia pachydermatis* 1830 (prélèvement cutané)

I.1.2. Conditions de culture

Malassezia sp. est ensemencé sur un milieu gélosé adapté : Dixon pour *M. furfur* et Sabouraud pour *M. pachydermatis* (protocole de culture standard) puis incubé 4 jours à 32°C. Puis des colonies sont prélevées de cette culture et transférées dans 30 mL de milieu Dixon ou Sabouraud selon l'espèce.

I.2. Matériel végétal

Les extraits commerciaux de canneberge, myrtille, acérola et framboise ainsi que les fractions aqueuse et méthanolique issues du jus de canneberge ont été testés et préparés comme décrit précédemment (cf Partie II. A. I. 2. 4. Préparation des échantillons à tester).

I.3. Détermination de la CMI

Ne disposant pas de protocole adapté et au vu des différences entre *Candida* et *Malassezia*, des essais avec divers milieux de culture ont été menés afin de déterminer le milieu le plus adéquat à la réalisation des tests de détermination des CMI.

I.3.1. Sélection du milieu de culture

Ainsi à partir de levures incubées à 32°C pendant 4 jours sur milieu gélosé Sabouraud pour l'espèce *M. pachydermatis* ou Dixon pour l'espèce *M. furfur*, une préculture à 1.10^7 cellules/mL (comptage sur cellule de Kova) dans du sérum physiologique additionné de Tween 80 (1,3 et 4% pour *M. pachydermatis* et *M. furfur* respectivement) est préparée.

Le Tween 80 ou polysorbate 80 est un agent tensioactif non ionique synthétisé à partir de sorbitol, d'acide oléique et d'oxyde d'éthylène, permettant l'homogénéisation de la suspension de levures.

Trois milieux de cultures ont été sélectionnés pour les essais : le milieu RPMI-MOPS, milieu utilisé dans le protocole standard M27-A3 du CLSI de détermination des CMI de levures, ainsi que les milieux Dixon et Sabouraud dont la différence principale de composition réside dans la présence ou non de tween 40 et d'acide oléique. La préculture est ensuite diluée au $1/100^e$ dans l'un des 3 milieux de culture (concentration finale : 10^5 cellules/mL).

200 μ L de milieu de culture sont déposés dans les puits d'une microplaque puis 100 μ L de suspension de levures à 10^5 cellules/mL y sont ajoutés. Les plaques sont incubées à 32°C sans agitation et observées tous les jours en vision directe jusqu'à apparition de colonies.

I.3.2. Détermination des CMI des échantillons

Les solutions mères des extraits commerciaux de fruits rouges préparées à 100 mg/mL et celles des 2 fractions issues du jus de canneberge préparées à 500 mg/mL ont été testées. Les échantillons sont évalués en duplicat et le test est répété un autre jour (n=2).

Le protocole de préparation de la suspension de levures à 10^5 cellules/mL est identique à celui réalisé pour la sélection du milieu de culture.

Le test est ensuite identique à celui précédemment décrit pour *Candida* (cf Partie II. A. I. 3. Détermination de la CMI) excepté que les microplaques sont incubées à 32°C.

Les extraits commerciaux sont évalués à des concentrations de 1000 à 0,5 μ g/mL et les 2 fractions issues du jus de canneberge à des concentrations de 5000 à 2 μ g/mL.

I.4. Évaluation de l'activité anti-biofilm des fractions issues du jus de canneberge ainsi que des extraits commerciaux de fruits rouges

Les solutions mères des extraits commerciaux de fruits rouges préparées à 100 mg/mL et celles des 2 fractions issues du jus de canneberge préparées à 500 mg/mL ont été testées. Les échantillons sont évalués en duplicat mais le test n'a été réalisé qu'une fois (n=1).

I.4.1. Préparation des suspensions de *Malassezia*

Une préculture est effectuée 4 jours avant le test dans le milieu de culture adapté (Dixon pour *M. furfur* et Sabouraud pour *M. pachydermatis*). Après incubation de cette préculture 4 jours à 32°C sans agitation, elle est centrifugée 10 minutes à 2000 rpm à 25°C puis le culot est lavé avec du PBS. Le culot final est remis en suspension dans 30 mL de milieu Dixon ou Sabouraud. La concentration finale est portée à 1.10^7 cellules/mL après dénombrement sur cellule de Kova.

I.4.2. Test anti-biofilm

Dans une microplaque 96 puits, 110 µL de milieu de culture (Dixon ou Sabouraud selon la levure utilisée) sont déposés dans les puits de la première colonne et 55 µL dans les autres (Figure 17). Puis 13,3 µL de solution mère à tester sont ajoutés dans la première colonne. Enfin, des dilutions au ½ sont réalisées afin d'obtenir une gamme de concentrations de 54 à 0,026 mg/mL pour les fractions issues du jus de canneberge et 10,8 à 0,0052 mg/mL pour les extraits commerciaux de fruits rouges. Des puits sont réservés pour le contrôle négatif (culture non traitée) et le contrôle DMSO à 2 % (vérification de son innocuité).

La préculture préalablement préparée est déposée dans tous les puits d'une microplaque 96 puits. Après 24 h d'incubation (initiation de la formation d'un biofilm), un lavage au PBS est ensuite réalisé afin d'éliminer les levures non adhérentes. 250 µL de milieu de culture (Dixon ou Sabouraud selon la levure) sont ajoutés dans tous les puits. La plaque est de nouveau incubée à 32°C pendant 4 jours pour *M. furfur* uniquement (poursuite du développement du biofilm).

50 µL d'échantillons préalablement préparés sont déposés dans chacun des puits de la microplaque. Cette dernière est incubée 4 jours à 32°C pour *M. pachydermatis* et 3 jours à 32°C pour *M. furfur*, le biofilm étant en contact permanent avec les produits.

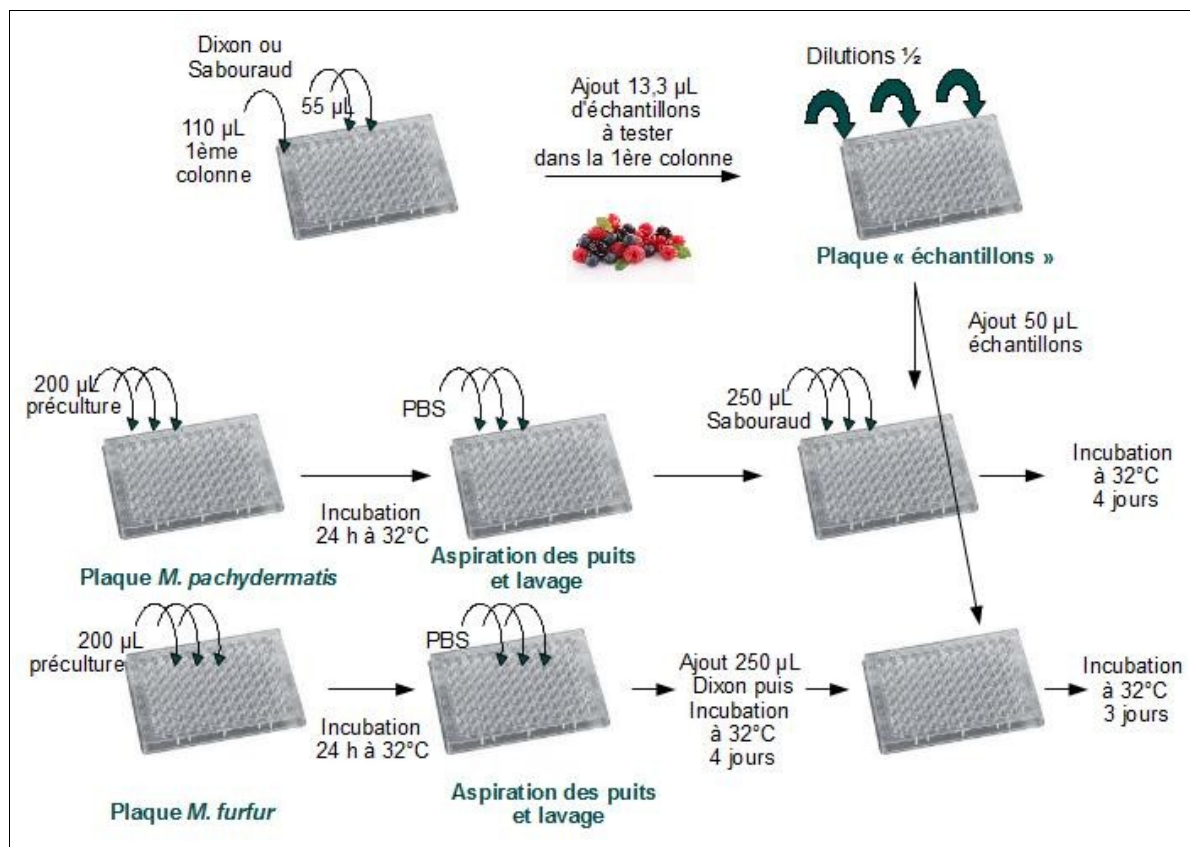


Figure 17 : Schéma récapitulatif de la méthode du test anti-biofilm de *Malassezia*

I.4.3. Test XTT

Après lavage de tous les puits avec du PBS afin d'éliminer les levures non adhérentes, leur contenu est observé au microscope inversé. 50 µL de XTT-ménadione sont ensuite additionnés dans tous les puits à 200 µL de PBS.

Après 3 h d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 450 nm.

I.5. Étude cinétique du développement d'un biofilm de *Malassezia furfur*

La mise au point du test anti-biofilm de *Malassezia* a nécessité l'étude de la cinétique du développement de cette levure sous forme de biofilm. Seule l'étude cinétique de *M. furfur* a été effectuée dans le temps imparti.

I.5.1. Préparation de la suspension de *M. furfur*

La suspension de *M. furfur* a été préparée comme précédemment décrit dans le paragraphe Partie II. B. I. 4. 1.

I.5.2. Préparation des microplaques

200 µL de cette préculture à 1.10^7 cellules/mL sont déposés dans l'ensemble des puits de microplaques puis ces dernières sont incubées à 32°C.

Trois temps d'incubation ont été retenus : 2 h, 7 h et 24 h (24 puits/temps).

A l'issue de ces temps d'incubation, un lavage avec du PBS de l'ensemble des puits concernés est réalisé afin d'éliminer les levures non adhérentes puis 200 µL de milieu Dixon sont ajoutés dans chacun des puits des microplaques. Celles-ci sont ensuite à nouveau incubées à 32°C pendant 9 jours (développement du biofilm).

I.5.3. Test XTT

L'absorbance des plaques est mesurée au spectrophotomètre après 5 temps d'incubation : 2 jours (J2), 3 jours (J3), 4 jours (J4), 7 jours (J7) et 9 jours (J9). Pour cela, au temps d'incubation donné, après lavage de tous les puits et ajout de 200 µL de PBS, 50 µL de XTT-ménadione y sont additionnés. Après 3 h d'incubation à 37°C, les absorbances sont mesurées à 450 nm.

I.6. Tests impliquant la sonication

I.6.1. Effet de la sonication sur l'hétérogénéité des suspensions de *Malassezia*

En parallèle de l'étude cinétique, des tests sur la sonication des suspensions de levures sont réalisés afin de diminuer leur hétérogénéité (observations d'amas au microscope optique).

Malassezia sp. est ensemencé sur un milieu gélosé adapté (Dixon pour *M. furfur* et Sabouraud pour *M. pachydermatis*) puis incubé 4 jours à 32°C. Puis, sans se soucier de la concentration, des colonies sont prélevées de cette culture et transférées dans du milieu liquide Dixon ou Sabouraud selon l'espèce. Trois conditions sont alors imposées à la suspension : une partie de la suspension est soniquée dans un bain à ultrason en continu pendant 1 minute, une autre partie pendant 5 minutes et aucun traitement de sonication n'est imposée à la dernière partie.

Ainsi deux microplaques 96 puits sont préparées en parallèle contenant dans les puits de 3 lignes 200 µL de suspension de levures non soniquée et dans les 3 dernières lignes 200 µL de la suspension de levures soniquée 1 minute ou 5 minutes selon la microplaque (Figure 18).

Les plaques sont ensuite observées au microscope optique inversé.



Figure 18 : Représentation des microplaques préparées

I.6.2. Évaluation de la viabilité de *M. pachydermatis* après sonication

En parallèle du test précédent, des essais de viabilité cellulaire après sonication ont été menés sur l'espèce *pachydermatis* par dénombrement. L'espèce *M. furfur* n'a pas été testée par manque de temps (croissance de la levure lente et difficile).

Pour cela, à partir de colonies âgées de 4 jours de *M. pachydermatis* obtenues sur gélose Sabouraud, deux suspensions de cette levure ont été préparées dans du milieu liquide Sabouraud à une concentration approximative de $1,6 \cdot 10^7$ cellules/mL (comptage sur Kova) pour être ensuite soniquées dans un bain à ultrason 1 ou 5 minutes respectivement. Des dilutions au 1/100, 1/1000 et 1/10 000 ème ont ensuite été effectuées à partir de ces suspensions et ont étéensemencées sur gélose Sabouraud à raison de 200 µL par boîte.

L'ensemble est incubé pendant 5 jours à 32°C. L'absence ou la présence de colonies est ensuite observée visuellement.

II. Résultats - Discussion

II.1. Détermination de la CMI

II.1.1. Sélection du milieu de culture

Le protocole standard du CLSI n'étant pas applicable pour le genre *Malassezia*, une recherche du milieu de culture le plus adapté a été effectuée. Les résultats montrent la présence de colonies de *M. furfur* uniquement dans le milieu Dixon. Aucune colonie n'est visible à l'oeil avec les deux autres milieux (même après 7 jours de culture). A l'inverse, seul le milieu Sabouraud permet de visualiser des colonies de *M. pachydermatis* dans les puits. Ces deux milieux, les plus adaptés à *Malassezia*, ont donc été retenus pour la suite : à savoir le milieu Dixon pour *M. furfur* et le milieu Sabouraud pour *M. pachydermatis*.

Il est à noter également la croissance lente de ces levures comparée à celle du genre *Candida*. Il faut en effet 48 h de croissance pour *M. furfur* et 72 h pour *M. pachydermatis* pour observer des colonies dénombrables (versus 24 h pour *Candida*).

II.1.2. Détermination des CMI des échantillons

Des tests de détermination de CMI, des extraits commerciaux de fruits rouges ainsi que les 2 fractions issues du jus de canneberge, ont ensuite été effectués dans les milieux de culture sélectionnés avec une lecture à 48 h pour *M. furfur* et 72 h pour *M. pachydermatis*. Après traitement, des colonies sont observables dans l'ensemble des puits. Aucune activité antifongique remarquable contre *Malassezia* n'est à signaler (CMI des extraits commerciaux et des 2 fractions issues du jus de canneberge respectivement $> 1\text{mg/mL}$ et $> 5\text{mg/mL}$).

II.2. Évaluation de l'activité anti-biofilm des fractions issues du jus de canneberge ainsi que des extraits commerciaux de fruits rouges

Un premier test anti-biofilm a été réalisé, une fois la sélection du milieu de culture effectuée pour chaque espèce de *Malassezia*.

II.2.1. Observations microscopiques avant mesure de l'absorbance par spectrophotométrie

Les observations faites pour de nombreux puits contenant les échantillons semblent proches de celles effectuées avec les puits contrôles négatifs (culture non traitée) présentant un « tapis » de levures au fond du puits. Ceci est observé pour les extraits d'acérola et de myrtille. D'autres parts, des amas de levures sont observés pour les cultures traitées par les extraits de canneberge, de framboise ainsi que par la fraction méthanolique. Un minimum de levures adhérentes (en quantité plus faible que dans les puits contrôles) est observé dans les puits traités par la fraction aqueuse de canneberge.

II.2.2. Test anti-biofilm

Les résultats sont difficilement interprétables du fait de l'hétérogénéité des absorbances mesurées pour les puits contrôles négatifs ainsi que pour les gammes de concentrations des produits testés, ceci démontré par des écart-types de valeurs très élevées.

Au vu de ces résultats insatisfaisants et inexploitable, il a alors été décidé d'une part de mieux appréhender le développement d'un biofilm de *Malassezia* grâce à une étude cinétique et d'autre part de réaliser en parallèle des tests sur la sonication, basée sur l'hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité des absorbances mesurées proviendrait de problèmes d'agrégation des levures (observées au microscope) lors de la préparation de la suspension ne permettant pas une bonne estimation de la concentration de départ ni une répartition homogène des levures dans les plaques.

II.3. Étude cinétique du développement d'un biofilm de *Malassezia furfur*

Au cours de ce test, deux paramètres varient : le temps d'adhérence des levures avant élimination des levures non adhérentes par lavage (ce temps est alors de 2 h, 7 h ou 24 h) et le temps de développement et maturation du biofilm qui varie entre 2 jours et 9 jours.

Le graphique suivant (Figure 19) présente les moyennes des absorbances reflétant les activités métaboliques des levures adhérentes, en fonction du temps de développement du biofilm pour chaque temps d'adhérence. Il est visible que les résultats obtenus, quelque soit le temps d'adhérence réalisé, sont similaires jusqu'au 4^{ème} jour. Après 7 et 9 jours de développement, la courbe des moyennes d'absorbances obtenues après 24 h d'adhérence s'éloigne, par abaissement, de celles des deux autres temps d'adhérence restées proches. Ainsi, d'après ces observations et recherchant des moyennes d'absorbances élevées, le temps d'incubation idéal avant élimination des levures non adhérentes par lavage se situerait entre 2 et 7 h ; à noter cependant l'observation d'écart-types élevés à J7 et J9.

D'autre part, la phase de croissance exponentielle des levures adhérentes est observable entre J4 et J9. Le plateau de croissance n'est pas visible sur les courbes. Lors d'un test anti-biofilm, le test XTT est effectué lorsque les valeurs d'absorbances sont significativement supérieures au bruit de fond donc exploitables, c'est à dire lors de la phase de croissance exponentielle ou au plateau. D'après ces courbes, ce test XTT devrait être réalisé après 7 ou 9 jours d'incubation.

Pour les tests anti-biofilm de *Malassezia furfur* une phase d'adhérence d'une durée de 2 et 7 heures et un test XTT à J7 ou J9 sont à retenir.

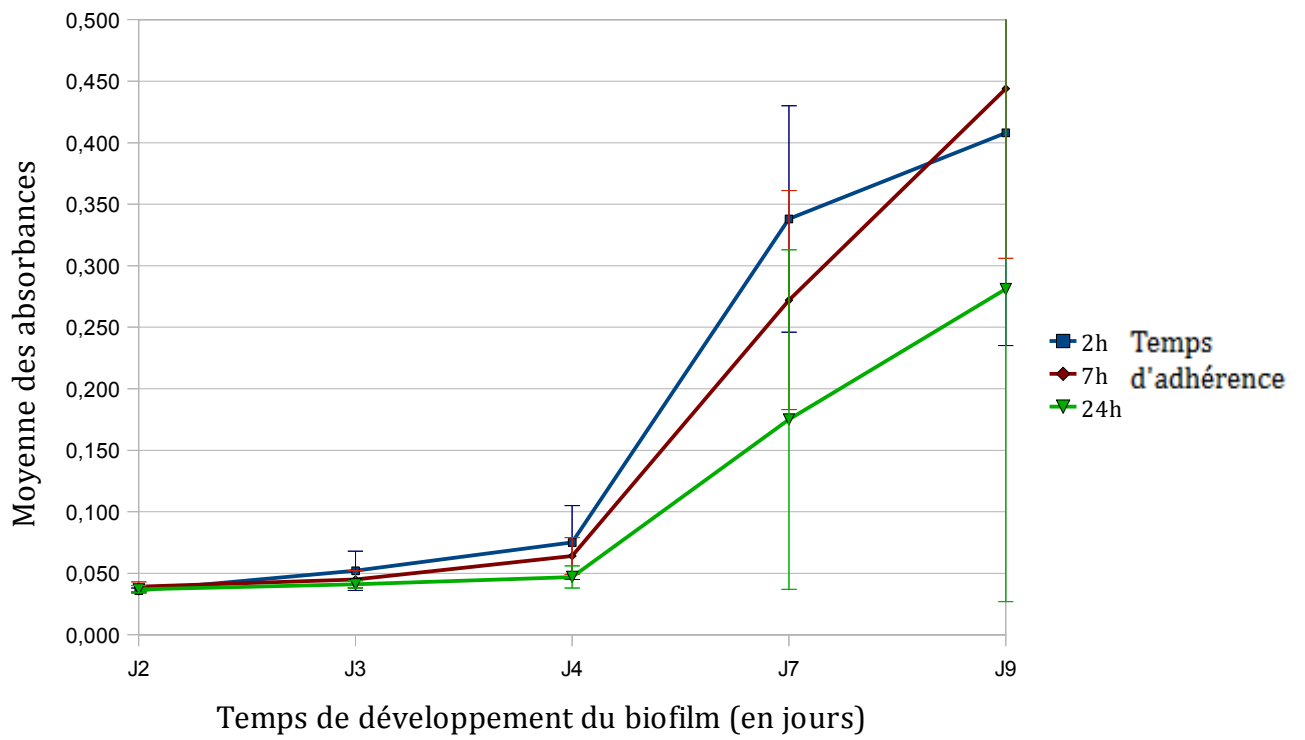


Figure 19 : Activité métabolique des levures adhérentes *M. furfur* (absorbance) en fonction du temps

II.4. Tests impliquant la sonication

II.4.1. Effet de la sonication sur l'hétérogénéité des suspensions de *Malassezia*

Les levures du genre *Malassezia* ont montré au cours de notre étude une capacité à former des agrégats en milieu liquide posant un problème d'hétérogénéité des suspensions préparées et des difficultés à obtenir une concentration précise des suspensions de levures. De plus, une répartition homogène de cette suspension dans les microplaques 96 puits est difficile. La littérature indique que la sonication semble être la solution à ce problème, étant capable de disloquer les agrégats formés [Murai T et al, 2002]. Ainsi pour vérifier cette observation, un test de sonication a été effectué.

A l'issue de la sonication, les puits sont observés au microscope inversé. Comparativement à la suspension de *M. furfur* avant sonication, il apparaît encore des agrégats de levures mais en quantité diminuée quelque soit la durée de sonication. Ces petits agrégats sont plus distincts. La suspension semble plus homogène au sein des puits.

Les suspensions de *M. pachydermatis* paraissent de même plus homogènes au sein des puits malgré des « grappes » de levures encore visibles au microscope optique, et ce quelque soit la durée de sonication. Le temps de sonication ne semble donc pas influencer sur l'homogénéisation de la suspension.

II.4.2. Évaluation de la viabilité de *M. pachydermatis* après sonication

Sachant qu'il a déjà été démontré dans la littérature que le temps de contact des ultrasons est à maîtriser [Murai T et al, 2002], des tests de viabilité après sonication sur *Malassezia* ont été réalisés.

Après 48 h d'incubation, des colonies blanchâtres à crèmes sont observées sur les géloses Sabouraud. Une croissance des levures est donc constatée quelque soit la durée de sonication. Les levures sont donc toujours viables.

III. Conclusion et perspectives

La mise au point des protocoles de détermination des CMI et test anti-biofilm de *Malassezia* a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques de *Malassezia* parmi lesquelles leur sélectivité vis à vis des milieux de culture et leur vitesse de croissance. En effet, *M. furfur* nécessite le milieu Dixon tandis que *M. pachydermatis* croît sur un milieu Sabouraud. Tout deux ont une croissance lente (48 h pour *M. furfur* et 72 h pour *M. pachydermatis*).

Les extraits commerciaux de fruits rouges ainsi que les 2 fractions (aqueuse et méthanolique) issues du jus de canneberge n'exercent aucun effet sur les levures planctoniques (CMI respectivement >1 et >5 mg/mL). Un premier test anti-biofilm a été réalisé mais il s'est révélé peu concluant de part l'hétérogénéité des résultats obtenus à priori dû à la présence d'agrégats dans la suspension de levures. Afin de mieux comprendre les étapes de développement d'un biofilm à *Malassezia*, une étude cinétique a alors été réalisée. Celle-ci a permis de définir pour le test anti-biofilm de *M. furfur*, le temps d'adhérence des levures avant lavage (élimination des levures non adhérentes) qui serait de 2 à 7 heures ainsi que le temps de développement et maturation du biofilm qui serait de 7 à 9 jours.

Face au problème d'hétérogénéité des suspensions de levures, la sonication semble la solution d'après la littérature [Murai T et al, 2002]. En effet quelque soit le temps de sonication (1 ou 5 minutes), l'hétérogénéité des suspensions de *M. furfur* et *M. pachydermatis* semble diminuée malgré la persistance de quelques agrégats de levures. D'autre part, la sonication (1 ou 5 minutes) ne semble pas altérer la viabilité des levures. Lors du test anti-biofilm, la suspension de levures pourrait être soniquée 1 minute avant répartition dans les microplaques.

L'étude de cinétique n'ayant été réalisée qu'une seule fois, une répétition est nécessaire. Il reste aussi à effectuer l'étude cinétique sur *M. pachydermatis*. Il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la sonication sur la capacité d'adhérence des levures (vérifier la conservation de cette capacité). Une fois ces études réalisées, les tests anti-biofilms pourront être effectués sur des échantillons de produits comme les extraits de lichens ou de fruits rouges.

Conclusion

Le pouvoir pathogène des levures du genre *Candida* et *Malassezia* est lié notamment à leur capacité à former des biofilms, structures favorisant les résistances aux antifongiques sur le marché et pouvant par conséquent entraîner des échecs thérapeutiques.

Des extraits naturels, déjà connus pour leurs activités anti-biofilms bactériens ou leur richesse en composés appartenant à des catégories chimiques dotées de ce type d'activité, pourraient représenter de nouvelles alternatives aux traitements antifongiques actuels.

Ainsi des expériences ont été menées sur des extraits et/ou fractions de lichens et de fruits rouges afin d'évaluer leur potentiel anti-biofilm de *Candida* et *Malassezia*.

Parmi les fruits rouges testés, les résultats de ces expériences montrent que la canneberge est le fruit au potentiel anti-adhérent le plus élevé avec des concentrations minimales anti-adhérentes comprises entre 1 et 0,062 µg/mL contre *C. albicans*.

Certains lichens sont également doués d'activité anti-biofilm de *Candida* comme *Cladonia parasitica*, *C. squamosa*, *Nephroma laevigatum* et *Usnea florida* avec des concentrations minimales anti-biofilms de 24 h comprises entre 39,5 et 22,5 µg/mL.

En revanche, ces extraits naturels n'ont aucun effet sur *Candida* sous forme planctonique.

Concernant le genre *Malassezia*, une absence de protocole standard a rendu difficile la détermination des effets antifongique et anti-biofilm des substances naturelles. Ainsi une mise au point de protocoles a été nécessaire. Une sélectivité vis à vis des milieux de culture et une croissance lente de *Malassezia* sp. ont été mises en évidence. Le test antifongique mis au point a démontré l'absence d'activité des extraits/fractions de fruits rouges vis à vis de *Malassezia* sous forme planctonique. Une étude cinétique a été réalisée afin de mieux appréhender la formation du biofilm. Celle-ci a permis de déduire le temps d'adhérence des levures lors de la réalisation du test anti-biofilm et la durée de développement du biofilm avant l'introduction du XTT. La sonication, procédé envisagé afin d'obtenir une meilleure homogénéisation des suspensions de levures, semble effectivement efficace pour diminuer leur hétérogénéité et ne semble pas influencer sur la viabilité des cellules fongiques.

Les sources naturelles étudiées ont donc un réel intérêt vis à vis des biofilms fongiques. A l'avenir, des fractions enrichies en proanthocyanidols de canneberge ou des extraits des 4 lichens identifiés comme actifs pourraient être employés en prévention

d'infections buccales, cutanées ou urinaires impliquant des biofilms à *Candida* notamment afin de limiter l'étape d'adhérence à une surface. De plus, pouvant être colonisés par ces levures et être par conséquent à l'origine d'infections, les dispositifs médicaux, pourraient être imprégnés de ces extraits/fractions naturels empêchant ou limitant ainsi l'adhérence des levures aux dispositifs.



RESEARCH ARTICLE

Promising results of cranberry in the prevention of oral *Candida* biofilms

Marion Girardot¹, Amandine Guérineau¹, Leslie Boudesocque², Damien Costa¹, Laurent Bazinet³, Cécile Enguehard-Gueffier² & Christine Imbert¹

¹ UMR CNRS 7267 Laboratory of Ecology and Biology of Interactions, Faculty of Medicine and Pharmacy, Poitiers, France

² UMR INRA 1282 Infectiology and Public Health, Faculty of Pharmacy Philippe Maupas, University François Rabelais, Tours, France

³ Department of Food Science and Nutrition, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Pavillon Comtois, Quebec, Canada

This study shows that in cranberry there are compounds, proanthocyanidins, that prevent biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Eating cranberry may prevent oral biofilm formation.

Keywords

oral yeasts; oral diseases; polyphenols; red berries; phytochemical study; functional food.

Correspondence

Marion Girardot, UMR CNRS 7267, Laboratory EBI, Faculty of Medicine and Pharmacy, 6 rue de la Miletie, Bât D1, TSA 51115, 86073 Poitiers, Cedex 9, France.
Tel.: 0 33 5 49 45 36 93
fax: 0 33 5 49 45 35 03
e-mail: marion.girardot@univ-poitiers.fr

Received 30 November 2013; revised 5 February 2014; accepted 6 March 2014. Final version published online April 2014.

doi:10.1111/2049-632X.12168

Editor: Patrick van Dijk

Abstract

In the context of dental caries prevention by natural foodstuff sources, antifungal and antibiofilm activities of dry commercial extracts of cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) and two other red fruits (*Vaccinium myrtillus* L. and *Malpighia punicifolia* L.) were assessed on *Candida albicans* and *Candida glabrata* yeasts. When added to the culture medium, the cranberry extract displayed a significant anti-adhesion activity against *Candida* spp. when used at low concentrations. In addition, the pretreatment of surfaces with this extract induced an anti-adhesion activity mainly against *C. glabrata* yeasts and an antibiofilm activity against *C. albicans*. This activity was dependent on concentration, species, and strain. A phytochemical investigation bioguided by anti-adhesion tests against the two *Candida* species was carried out on crude cranberry juice to determine the active fractions. Three subfractions enriched in proanthocyanidins showed an anti-adhesion activity at low concentrations. This study investigated for the first time the interest of crude extracts of cranberry and cranberry juice fractions to prevent biofilms of *C. glabrata*. It highlighted the potency of consuming this fruit and using it as a source of anti-adhesion agents.

Introduction

The foodstuff market of cranberry fruit is expanding throughout Europe. It is the fruit of a shrub of peatlands located in the colder regions of North America: *Vaccinium macrocarpon* Aiton belonging to *Ericaceae* family. Existing in a wide variety of products (sauce, jam, biscuits, syrup, etc), this berry is mainly consumed in juice or dried for its gustatory interest or as functional food. Indeed, due to its richness in polyphenols of high molecular weight, this berry has a demonstrated ability to inhibit the adhesion of bacteria responsible for urinary disorders (such as *Escherichia coli*) (Sobota, 1984), gastric ulcers (such as *Helicobacter pylori*) (Burger *et al.*, 2000; Shmueli *et al.*, 2012) or involved in the formation of dental caries or cavities and chronic periodontitis such as *Streptococcus mutans* (Labrecque *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013), *Streptococcus gordonii* (Babu *et al.*, 2012), or *Porphyromonas gingivalis* (Bonifait &

Grenier, 2010). However, its antifungal interest has been poorly documented up to now. Oral diseases may be caused by fungi belonging to *Candida* genus, which are usually commensal flora but can be involved in the formation of dental plaque and may be responsible for mucosal or systemic infections, thus acting as opportunistic pathogens. These fungi are able to colonize topical devices including dentures (Estivilla *et al.*, 2011) and grow on these substrates as a biofilm which makes them more resistant to antimicrobials than planktonic cells (Niimi *et al.*, 2010). Many existing antifungal agents exhibit reduced activity against adhesion and biofilm development of *Candida* species. Only two antifungal families (echinocandins and lipid formulations of amphotericin B) are active against *Candida* biofilms. Therefore, it is important to search for novel approaches to prevent adhesion and further biofilm development and to find new agents with other mechanisms of action to prevent resistance development.

First, to understand the impact of cranberry consumption on the oral and potentially pathogenic fungal flora, the activity of a dry extract of this fruit and two other edible red fruits rich in polyphenols (blueberry: *Vaccinium myrtillus* L. and acerola: *Malpighia punicifolia* L.) was investigated against *Candida* yeasts; the most common species isolated from human mouths were studied: *Candida albicans* and *Candida glabrata* (Niimi *et al.*, 2010). The anti-adherent activity of cranberry was then studied and its persistence was evaluated; the influence of cranberry on the growth of planktonic yeasts was also investigated to better characterize the anti-*Candida* interest of cranberry.

A phytochemical investigation bioguided by anti-adhesion tests against the two *Candida* species was then carried out on crude cranberry juice to determine the active fractions which could represent future therapeutic and/or prophylactic approaches against biofilm related to oral infections.

Materials and methods

Plant material

Three commercial fruit extracts cranberry (*V. macrocarpon* Aiton, *Ericaceae*) (Ref 1079), acerola (*M. punicifolia* L., *Malpighiaceae*) (Ref 1087), and blueberry (*V. myrtillus* L., *Ericaceae*) (Ref 1085) were purchased from HYTECK Laboratories – Aroma-Zone (Clermont-Ferrand, France).

The cranberry juice was a pasteurized and clarified cranberry juice produced by Fruit d'Or (Notre-Dame-de-Lourdes, QC, Canada). The juice was stored at -28°C and thawed out at 4°C .

Cranberry juice fractionation

Crude cranberry juice was first freeze-dried. The freeze-dried juice (20 g) was solubilized in 15 mL of water and then subjected to Amberlite XAD 16 column (diameter 6 cm, high 25 cm).

Amberlite XAD 16 resin (200 g) was soaked overnight in methanol. Then, the column was packed the day after and first washed with deionized water (2 L) before injection of the sample. First elution step was performed using deionized water (3 L) to eliminate sugars and nonphenolic compounds. Then, methanol (2 L) was used to elute phenolics from the column. Resulting fractions, aqueous one (18.9 g) and methanolic one (1.1 g), were concentrated under reduced pressure and then freeze-dried.

Methanolic fraction was fractionated using LH-20 resin column using a protocol derived from Prior *et al.* (2001). First elution steps were reproduced, and a last elution using acetone/water (70 : 30 v/v) was added to the protocol. Six fractions were obtained (noted F1 to F6). Elution solvent, weight, and composition are detailed in Table 1.

HPLC analysis

HPLC analysis were performed on a Dionex UHPLC U3000RS system equipped with a LPG-3400RS quaternary pump, a RSLC WPS-300T RS automated injector, a

Table 1 Weight, elution solvent, and composition of the six obtained fractions (F1 to F6)

Fraction	Weight (mg)	Solvent of elution	Components	Global PACs amount % (w/w) (DMAC assay)
1	732.0	MeOH/water (20 : 80, v/v)	Phenolic acids, remaining sugar	0.13
2	150.0	MeOH/water (60 : 40, v/v)	Anthocyanin, flavonol	1.94
3	46.6	MeOH/water (60 : 40, v/v)	Low molecular weight PACs	3.45
4	36.6	MeOH	PACs and flavonoids	3.90
5	57.0	MeOH	Flavonoids and PACs	2.69
6	30.7	Acetone/water (70 : 30, v/v)	High molecular weight PACs	3.15

PACs: proanthocyanidins; MeOH: methanol.

TCC-300SD column oven, and a UHPLC+ DAD-3000 diode array detector (Thermo Fisher SA, Voisins le Bretonneux, France). The system was fitted with an Accucore aQ (150 × 3 mm i.d., 2.6 µm particle size) column, itself protected by an Accucore aQ Unigard (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). The mobile phases were solvent A 0.01% TFA in water and solvent B acetonitrile. The gradient was set as follows: initial acetonitrile content was 0%, it was raised to 60% in 7.6 min, then raised to 100% in 0.31 min and maintained for 1 min. Oven temperature was set at 40°C , UV detection was monitored at λ 210, 254, 280, and 520 nm. Samples were injected at 5 mg mL⁻¹.

BL-DMAC assay

The DMAC protocol used was previously described by Prior *et al.* (2010). Samples were prepared at 10 or 5 mg mL⁻¹, in water or methanol, as convenient.

Organisms and growth conditions

Twelve *Candida* isolates were studied. *Candida albicans* ATCC 66396 and ATCC 3153 strains were purchased from the American Type Culture Collection. One strain of *C. glabrata* was obtained from Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussels, Belgium): IHM 9556. The other strains were isolated from patients at the laboratory of parasitology and medical mycology of the hospital of Poitiers (France): *C. albicans* Apu1 (pulmonary origin), 1202-081485 (mouth origin), 1202 120598 1021 (throat origin), 1202 210920 (tongue origin), and *C. glabrata* Gpu1 (pulmonary origin), 788, 924, 767, and Gsep1 (septicemia origin).

Yeasts were first grown for 48 h at 37°C on Sabouraud agar slants (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France). To obtain a biofilm, four loopfuls of this culture were carefully transferred to 30 mL of Yeast Nitrogen Base medium (Difco, Detroit, MI), supplemented with 50 mM glucose (Sigma, St Louis, MO) (YNB-Glc) and incubated overnight at 37°C without shaking.

Minimum inhibitory concentrations of fruit extracts and cranberry fractions

Stock solutions of tested commercial extracts were prepared in sterile distilled water or DMSO (depending on their solubility) at 100 mg mL⁻¹. These solutions were shaken and centrifuged for 15 min at 2647 g, at 25 °C (Cr3i centrifuge Jouan). On the other hand, stock solutions of cranberry juice fractions were prepared at 500 or 50 mg mL⁻¹ (depending on the available quantity of fractions) in sterile distilled water or DMSO (depending on their solubility) and shaken. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of commercial extracts and cranberry fractions were determined by a broth microdilution method in order to comparatively study their antifungal and antibiofilm activities (CLSI reference M27-A3 microdilution adapted protocol). Briefly, yeasts were first grown for 24 h on Sabouraud agar slants, and *Candida* sp. inocula were prepared by suspending yeasts in RPMI-MOPS and adjusting to a final concentration of 10⁵ colony-forming units mL⁻¹. Serial twofold dilutions of each supernatant of commercial extract or cranberry juice fraction were prepared in RPMI-MOPS. They were made in 96-well microtiter plates over the range 10 µg mL⁻¹ to 100 mg mL⁻¹ or 0.2–5 mg mL⁻¹, respectively (final DMSO concentrations did not exceed 2% of the overall volume in wells). The same volume per well of yeast culture was added. Different controls were included in each experiment: non-treated yeasts; yeasts treated by DMSO 2% or distilled water; yeasts treated by amphotericin B (positive control). The MICs were determined after incubation for 24 and 48 h at 37 °C without shaking. All tests were performed in triplicate in at least two separate experiments. Fruit extracts with a MIC less than 100 µg mL⁻¹ were regarded as potentially useful.

Saliva preparation

Non-stimulated saliva collected from 12 healthy volunteers was pooled, altered with dithiothreitol (2.5 mmol L⁻¹), shaken in the ice for 10 min, centrifuged for 20 min at 3000 g and 4 °C (Cr3i centrifuge Jouan), diluted in three volumes of distilled water (25%), and filtrated through a 0.45 µm membrane. This stock solution was stored at -80 °C.

Anti-adhesion activity of experimental medium supplemented with fruit extracts or cranberry fractions

A stock solution of each commercial fruit extracts was prepared at 120 mg mL⁻¹ in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). It was shaken, sonicated, and centrifuged for 15 min at 2647 g, at 25 °C (Cr3i centrifuge Jouan). Concerning cranberry juice fractions, stock solutions prepared for MIC assays were used. In both cases, a serial twofold dilution was carried out in YNB-Glc (final DMSO concentrations did not exceed 2% of the overall volume in wells).

Untreated 96-well tissue culture plates were pretreated with 200 µL of human saliva at 2%, obtained by dilution of

the stock solution in distilled water, incubated for 2 h at 37 °C, and then completely aspirated prior biofilms production; this pretreatment allowed to mimic the natural coating of oral surfaces in the mouth. One hundred microliters of a serial twofold dilution in YNB-Glc of each fruit extract or cranberry juice fraction was added over the range 20 µg mL⁻¹ to 40 mg mL⁻¹ or 0.4 µg mL⁻¹ to 10 mg mL⁻¹, respectively. Each well then received 100 µL of the yeast suspension (2.10⁷ cells mL⁻¹). Some wells were reserved for PBS, distilled water, or DMSO 2% controls. After 2 h of incubation at 37 °C, spent media and free-floating microorganisms were removed by aspiration. The wells were washed twice with PBS, then observed under inverted optical microscope (IX51[®] inverted microscope, Olympus) prior to biofilm quantification using a previously described metabolic assay based on the reduction of a tetrazolium salt (XTT) (Cocquaud *et al.*, 2005; Dalleau *et al.*, 2008). Briefly, 300 mg L⁻¹ XTT (Sigma) and 0.13 mM menadione (Sigma) were added in 200 µL of PBS in each well. Plates were incubated for 3 h at 37 °C without shaking, then gently agitated and XTT formazan was measured colorimetrically at 450 nm (microplate reader LP400; Sanofi Diagnostics Pasteur). Background formazan values were determined with plates containing PBS only or containing PBS, XTT, and menadione; these values did not exceed 0.005 absorbance units and therefore were not significant. All tests were performed in triplicate in at least two separate experiments.

Anti-adhesion and antibiofilm activities resulting from pretreatment of surfaces with cranberry extract

The supernatant of centrifuged stock solution at 120 mg mL⁻¹ of commercial cranberry extract was diluted at 30 and 7.5 mg mL⁻¹ using PBS.

Experiments were performed in untreated 96-well tissue culture plates pretreated for 2 h at 37 °C with 200 µL of saliva 2% and 100 µL of extract or PBS (control). They were then emptied by aspiration. Two hundred microliters of the yeast suspension (2.10⁷ cells mL⁻¹) was added to the wells, and the plates were incubated at 37 °C for 2 or 22 h to allow adhesion and biofilm formation, respectively. Then, half of the wells were washed twice with PBS to evaluate the metabolic activity of adherent population, whereas the second half permitted to assess the metabolic activity of the overall population, including planktonic yeasts. Cells were then observed under inverted optical microscope (IX51[®] inverted microscope, Olympus), and the metabolic activity was assessed using the XTT assay (Cocquaud *et al.*, 2005; Dalleau *et al.*, 2008). All tests were performed in triplicate in at least two separate experiments.

Statistical analysis

The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) ($P < 0.05$), and Scheffe's tests were conducted to determine differences among the test groups (Statview, version 5.0.0.0; SAS Institute Inc, Berkeley, CA).

Results

Antifungal activity

The antifungal activity of the three commercial red berries extracts and all fractions obtained from cranberry juice was assessed on *C. albicans* ATCC 3153 and *C. glabrata* IHEM 9556. These extracts and fractions showed no relevant antifungal activity against the two species: all MICs were $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, reaching $> 100 \text{ mg mL}^{-1}$ in some cases (data not shown). All the studied strains were susceptible to amphotericin B (MIC $< 2 \mu\text{g mL}^{-1}$) as previously shown (Baissac et al., 2004).

Ability of yeasts to adhere to polystyrene surfaces in the presence of red fruit extracts

The tested fruit extracts ($\geq 10 \text{ mg mL}^{-1}$) had a higher influence on adhesion of *C. albicans* vs. *C. glabrata* (Fig. 1). Cranberry extract significantly inhibited *C. albicans* adhesion ($P < 0.05$), regardless of the tested concentrations (Fig. 1). *Candida glabrata* species was more resistant: cranberry extract at concentrations $\geq 20 \text{ mg mL}^{-1}$ was necessary to inhibit their metabolic activity ($P < 0.05$). The blueberry extract had no effect on *C. glabrata* adhesion and only slightly inhibited *C. albicans* adhesion phases when used at 40 mg mL^{-1} . Finally, the acerola extract was poorly active on *Candida* spp. adhesion: a weak activity was observed on *C. glabrata* at 40 mg mL^{-1} , whereas it had no anti-adhesion activity against *C. albicans* adhesion phase (Fig. 1).

Influence of surface pretreatment with cranberry extract on biofilm growth

Six strains of *C. albicans* and *C. glabrata* were studied. The metabolic activity of sessile yeasts was evaluated after a 2 h (influence on early phase biofilm) or a 22 h (on maturation

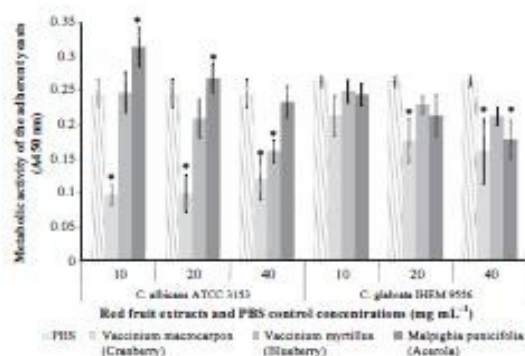


Fig. 1 Effect of the three fruit extracts at three concentrations on adherence phase of two *Candida* species without surface pretreatment. Results are expressed as metabolic activity values of the adherent yeasts ($A_{490 \text{ nm}}$) $\pm$ standard deviations. All experiments were carried out in triplicate. PBS was used as a control. *Significantly different from the control (PBS) (variance analysis and Scheffé's test $P < 0.05$).

phase biofilm) incubation time in polystyrene wells pretreated with cranberry extract.

When yeasts were incubated for 2 h, the surface pretreatment using the extract at 10 mg mL^{-1} or 40 mg mL^{-1} resulted in the decrease ($P < 0.05$) of sessile yeast inoculum for three (50%) or four (66.7%) strains of *C. glabrata*, respectively (Fig. 2a). Such an activity was observed only for one strain (16.7%) of *C. albicans* and only using cranberry extract at 40 mg mL^{-1} .

Considering 22-h-old biofilms, this pretreatment significantly decreased ($P < 0.05$) the biofilm of one (16.7%) of tested strains; extract at 2 mg mL^{-1} , two (33.3%; 10 mg mL^{-1}), or three (50%; 40 mg mL^{-1}) *C. albicans* strains, respectively (Fig. 2b). Such an inhibition was only observed for two strains (33.3%) of *C. glabrata* and only using cranberry extract at 40 mg mL^{-1} .

Influence of surface pretreatment with cranberry extract on total yeast inoculum

The metabolic activity of the whole microbial population, including both adherent and planktonic yeasts, was investigated 2 and 22 h after the addition of yeasts in the pretreated wells. In the case of a 2 h culture, the pretreatment of surfaces with cranberry extract caused a significant inhibition ($P < 0.05$) of the metabolic activity of three (50%) of strains; extract at 40 mg mL^{-1} or one (16.7%; 10 or 2 mg mL^{-1}) strains of *C. albicans* (Fig. 3a). Such an activity was observed for two (33.3%; 2 mg mL^{-1}), three (50%; 10 mg mL^{-1}), or four (66.7%; 40 mg mL^{-1}) strains, respectively, of *C. glabrata* (Fig. 3b).

Considering the influence on yeasts cultured for 22 h, this pretreatment resulted in the inhibition ($P < 0.05$) of the metabolic activity of two (33.3% of strains; 2 mg mL^{-1} or 10 mg mL^{-1}) or four (66.7%; 40 mg mL^{-1}) strains of *C. albicans* (Fig. 3b). At 40 mg mL^{-1} , it significantly inhibited the metabolic activity of all strains of *C. glabrata*, whereas the extract used at lower concentrations was able to inhibit the metabolic activity of only one (16.7% of strains; 2 mg mL^{-1}) or two (33.3%; 10 mg mL^{-1}) strains of *C. glabrata* (Fig. 3b).

Bioguided phytochemical investigation

A freeze-dried cranberry juice was fractionated on Amberlite XAD 16 resin. Two fractions were first obtained: aqueous and methanolic fractions (Table 2). Only the latter showed an anti-adhesion activity against *C. albicans* and *C. glabrata* at low concentrations (0.32 and 0.64 mg mL^{-1} respectively vs. 10.5 mg mL^{-1} for aqueous fraction). HPLC analysis of these two fractions confirmed the separation of sugars and nonphenolic compounds (aqueous fraction) from phenolic compounds (methanolic fraction) (Fig. S1). Then, the methanolic fraction was further fractionated on LH 20 resin column. Of the six subfractions obtained, three showed significant anti-adhesion activity at very low concentrations ($\leq 0.25 \text{ mg mL}^{-1}$). F4 and F6 were active against the two tested species using concentrations ranging between 0.062 and 0.25 mg mL^{-1} , whereas F3 dem-

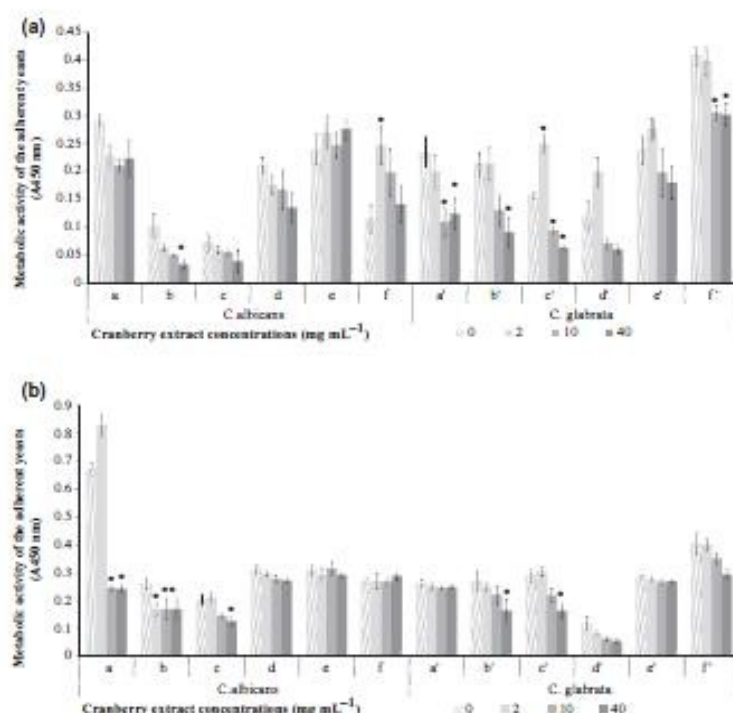


Fig. 2 Effect of the cranberry extract at three concentrations on adherent yeasts of two *Candida* species, with surface pretreatment. Effect on (a): early step (2 h) or (b): later step (22 h). The experiments were carried out on six strains of *C. albicans* and *C. glabrata*. Results are expressed as metabolic activity values of the adherent yeasts ($A_{450 \text{ nm}}$) $\pm$ standard deviations. All experiments were carried out in triplicate. PBS was used as a control. *Significantly different from the control (0 mg mL⁻¹; PBS) (variance analysis and Scheffé's test $P < 0.05$). Origin of the strains: *C. albicans*: a pulmonary isolate Apu1, b ATCC 3153, c ATCC 66396, d mouth isolate 1202-081485, e throat isolate 12021205981021, f tongue isolate 1202210920; *C. glabrata*: a' pulmonary isolate Gpu1, b' IHM 9556, c' septicemia isolate 788, d' septicemia isolate 924, e' septicemia isolate 787, f' septicemia isolate Gsep1.

onstrated a significant activity ($P < 0.05$) only against *C. glabrata* (0.25 mg mL⁻¹). HPLC analysis revealed that the three active subfractions were enriched in low molecular weight proanthocyanidins (PACs), flavonoids and PACs and high molecular weight PACs, respectively (Figs. S2–S7). Subfractions constituted by phenolic acids and remaining sugar (F1) and anthocyanins and flavonols (F2) (Figs. S2–S7) were not active at low concentrations. BL-DMAC assay, used to evaluate global PACs amount, confirmed that PACs are concentrated in fractions F3, F4, and F6 (Table 1).

Discussion

The evaluation of MICs demonstrated that tested commercial red berry extracts and cranberry juice fractions displayed no relevant activity against planktonic *Candida* spp. These results are consistent with available data obtained on *C. albicans* with the cranberry juice (Swartz & Medrek, 1968) or the A-type cranberry proanthocyanidins (Feldman et al., 2012). In that way, other studies reported no alteration in bacterial growth and viability in the presence of cranberry compounds (Labrecque et al., 2006; Koo et al., 2010; La et al., 2010; Maharshak et al., 2011).

Moreover, in this study, the activity of the fruit extracts and cranberry fractions was evaluated against *Candida* spp. biofilms, using a metabolic based method which is known to be simple, practical, and reproducible (Jin et al., 2004). However, results obtained with active extracts and fractions

were also confirmed based on colony-forming unit (CFU) counts to check the absence of interference between red fruit compounds and XTT; CFU results coincide with those obtained by XTT method (data not shown). Beside, inverted optical microscopy observations made before XTT addition clearly showed a decrease in the amount of adherent yeasts in the wells treated with active compounds compared with non-treated wells (Fig. S8).

First, the ability of yeasts to adhere to polystyrene surfaces and to subsequently grow as a biofilm in the presence of commercial fruit extracts was investigated. The cranberry extract was the most anti-adhesion, as shown using concentrations ranging between 0.02 and 40 mg mL⁻¹; results demonstrated the significant anti-adhesion activity of this extract on *C. albicans* ($P < 0.05$) when used at concentrations ≥ 1.25 mg mL⁻¹ (data not shown). Considering these results, the cranberry extract was selected for further investigations.

A second approach was to pretreat polystyrene surfaces with cranberry extract (2–40 mg mL⁻¹) to simulate a mouth-wash or to approach the foodstuff reality where the food or beverage is placed in the mouth and then swallowed; they are not present anymore in the oral sphere. First of all, some activities were observed which proved that the cranberry extract was not totally removed after supernatant aspiration. Some components from both cranberry extract and saliva would coat the surfaces. Besides, salivary proteins (especially proline-rich proteins) are known to bind polyphenols (Bennick, 2002).

Fig. 3 Effect of the cranberry extract at three concentrations on biofilm growth of two *Candida* species, with surface pretreatment. Effect on (a): early step (2 h) or (b): later step (22 h). The experiments were carried out on six strains of *C. albicans* and *C. glabrata*. Results are expressed as metabolic activity values of overall the population ($A_{490\text{ nm}}$) $\pm$ standard deviations. All experiments were carried out in triplicate. PBS was used as a control. *Significantly different from the control (0 mg mL⁻¹; PBS) (variance analysis and Scheffé's test $P < 0.05$). Origin of the strains: *C. albicans*: a pulmonary isolate Apu1, b ATCC 3153, c ATCC 66396, d mouth isolate 1202-081485, e throat isolate 12021205981021, f tongue isolate 1202210920; *C. glabrata*: a' pulmonary isolate Gpu1, b' IHEM 9556, c' septicemia isolate 788, d' septicemia isolate 924, e' septicemia isolate 767, f' septicemia isolate Gsep1.

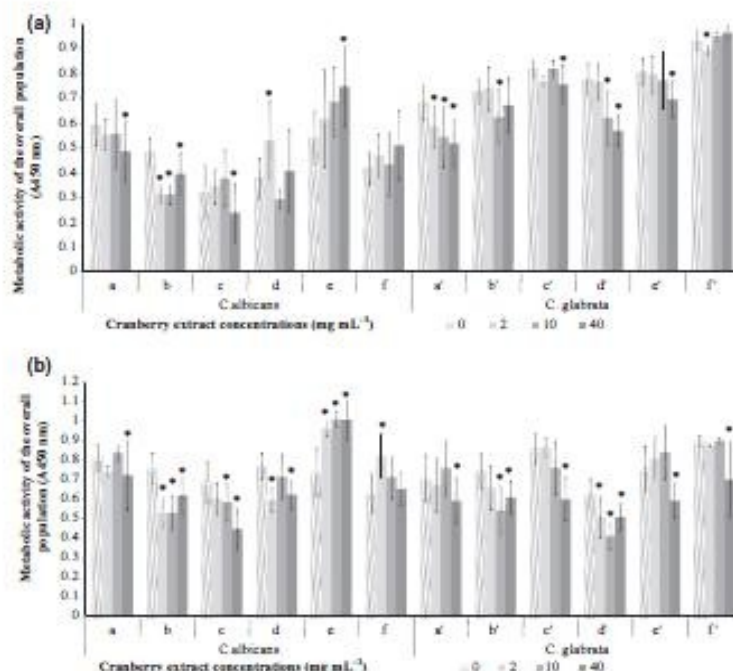


Table 2 Anti-adhesion activity of methanolic, aqueous, and F1 to F6 fractions against *Candida albicans* and *Candida glabrata*

Fraction	Minimum anti-adhesion concentration (mg mL ⁻¹)	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Methanolic	0.32	0.64
Aqueous	10.5	10.5
1	> 1	> 1
2	1	1
3	1	0.25
4	0.125	0.125
5	ND	> 1
6	0.062	0.25

Results are expressed as minimum anti-adhesion concentration ($P < 0.05$). All experiments were performed in triplicate in at least two separate experiments. ND: not determined.

The activity of cranberry extract against adherent yeasts (Fig. 2) and the overall yeast population, including both adherent and planktonic yeasts (Fig. 3), was investigated in order to study the anti-adherent interest of this fruit and to evaluate whether cranberry acted specifically on adherent cells or was also able to influence the metabolic activity of planktonic yeasts.

The pretreatment of surfaces with the cranberry extract had a higher influence against adhesion of *C. glabrata* yeasts compared with that of *C. albicans* (Fig. 2a). The cranberry extract would be poorly able to prevent *C. albicans*

adhesion contrary to those of *C. glabrata*, even if a strain-dependence was observed in this last case.

This pretreatment displayed a higher influence against *C. albicans* biofilm maturation compared with that of *C. glabrata*, unlike to what was observed on adherence phase (Fig. 2b). This observation suggested a delayed and persistent effect on this species. Here again, the influence was strain and species-dependent. So, the cranberry extract was able to prevent early and maturation phases of fungal biofilms; however, its activity depended on both *Candida* species and strains.

Concerning the effect on the overall population, regardless of its adhered or planktonic status after 2 h (Fig. 3a), surface pretreatment with the commercial cranberry extract reduced the metabolic activity ($P < 0.05$) for only 50% of *C. albicans* strains vs. 100% of *C. glabrata* strains; these results confirmed the species, strain, and concentration-dependant activity of this cranberry extract. After 22-h incubation, this pretreatment still displayed a higher influence on the metabolic activity of *C. glabrata* yeasts compared with that of *C. albicans* (Fig. 3b), showing, however, an antimetabolic activity on 66.7% of *C. albicans* strains; the activity of cranberry extract on this species could be delayed. It was able to influence the metabolic activity of yeasts growing as mixed adherent and planktonic status and showed a persistent effect.

The observed ability of cranberry extract to reduce the metabolism and literature data suggest a fungistatic activity (Swartz & Medrek, 1968). Concerning the mechanism of action, studies reported a decrease in hydrophobicity of some bacteria such as *E. coli* or cariogenic *S. mutans*, and

S. sobrinus due to the presence of cranberry extract or juice (Yamanaka et al., 2004; Wojnicz et al., 2012).

In parallel of these studies concerning the activity of a commercial cranberry extract, a crude cranberry juice was studied and a bioguided fractionation was made by anti-adhesion assays against the two reference species (*C. albicans* and *C. glabrata*) to determine the active fractions. The three subfractions enriched in low molecular weight PACs (F3), flavonoids and PACs (F4) and high molecular weight PACs (F6) showed an anti-adhesion activity at concentrations lower than those obtained for dry commercial extract and methanolic fraction, suggesting a real interest of cranberry juice and even more of fractions enriched in PACs (Table 2). Our results, concerning the improved activity of fractions, were in agreement with those of Shmueli et al. (2012) who demonstrated that the active ingredients were likely to be less than 3% of the dry solid. Our results were also in accordance with the marked inhibition of *C. albicans* adherence recently reported by Feldman et al. (2012) and Rane et al. (2014) in the presence of cranberry PACs. Results of Feldman et al. (2012) were obtained studying only one strain of *C. albicans*. Rane et al. (2014) studied several strains of *C. albicans* and reported active concentrations close to those observed in our study; however, they reported that cranberry reduced biofilm formation of all tested strains contrary to what we observed, suggesting a strain-dependence of cranberry activity. In addition, our results demonstrated that the anti-adhesion activity of cranberry extract and PACs fractions was not limited to *C. albicans* but was also observed with emerging fungal pathogen *C. glabrata*.

In addition to being empirically demonstrated, available data report that cranberry extract has no cytotoxicity toward human healthy cells, like human gingival HF-1 fibroblasts (Babich et al., 2012).

In conclusion, our results pointed out the *in vitro* anti-adhesion potential of three commercial edible red fruit extracts and cranberry juice fractions against two major species of *Candida* spp. and improved the knowledge regarding natural food and beverages, such as tea, coffee, milk, or wine that have previously demonstrated anti-adhesion properties in the oral cavity (Signoretto et al., 2012). These fruit extracts and fractions had no antifungal activity on *C. albicans* and *C. glabrata* as shown by MIC studies. The anti-adhesion property of the commercial cranberry extract was demonstrated when incubated together with *Candida* spp. yeasts but also when used to pretreat surfaces. This supports the potential oral health benefits associated with cranberry. However, the anti-adhesion and antibiofilm activities of this extract depended on the tested strains of *Candida* spp. This study investigated for the first time the interest of crude extracts of cranberry and cranberry juice fractions (methanolic and enriched in PACs) to prevent biofilms of different species of *Candida* spp. especially *C. glabrata*. These results encourage further fractionation of active fractions to improve the use of these foodstuff components, especially cranberry PACs and hopefully find new agents active against biofilm related to oral infections. In particular, the active

compounds derived from cranberries have promising cariostatic properties and may potentially be used in supplement to fluoride.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Mrs. Michelle Pillot (laboratory of parasitology and medical mycology of the hospital of Poitiers) for providing clinical strains. We also thank Dr Deborah Bell and Mrs. Florine Steinthal for revising the English text. All authors have no conflict of interest to declare.

References

- Babich H, Ickow IM, Weisburg JH, Zuckerbraun HL & Schuck AG (2012) Cranberry juice extract, a mild prooxidant with cytotoxic properties independent of reactive oxygen species. *Phytother Res* 26: 1358–1365.
- Babu J, Blair C, Jacob S & Itzhak O (2012) Inhibition of *Streptococcus gordonii* metabolic activity in biofilm by cranberry juice high-molecular-weight component. *J Biomed Biotechnol* 2012: 590384.
- Baïssac Y, Benoit-Vical F, Lavaud C & Imbert C (2004) Antifungal activity of a spirostanol tomatoside obtained from *Lycopersicon esculentum* mill against various yeast species. *J Mycol Med* 14: 59–63.
- Bennick A (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 184–196.
- Bonifati L & Grenier D (2010) Cranberry polyphenols: potential benefits for dental caries and periodontal disease. *J Can Dent Assoc* 76: a130.
- Burger O, Ofek I, Tabak M, Weiss EI, Sharon N & Neeman I (2000) A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 295–301.
- Cocquaud C, Rodier MH, Danilault G & Imbert C (2005) Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 56: 507–512.
- Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM & Imbert C (2008) *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 31: 572–576.
- Estivilla D, Arias A, Torres-Lanab A, Carrillo-Muñoz AJ & Arévalo MP (2011) Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods* 86: 238–242.
- Feldman M, Tanabe S, Howell A & Grenier D (2012) Cranberry proanthocyanidins inhibit the adherence properties of *Candida albicans* and cytokine secretion by oral epithelial cells. *BMC Complement Altern Med* 12: 6.
- Feng G, Klein MI, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N & Koo H (2013) The specific degree-of-polymerization of A-type proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms. *Biofouling* 29: 629–640.
- Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y & Yip HK (2004) Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* 49: 789–798.
- Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K & Gregoire S (2010) Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development *in vivo*. *Caries Res* 44: 116–126.

- La VD, Howell AB & Grenier D (2010) Anti-*Porphyromonas gingivalis* and anti-inflammatory activities of A-type cranberry proanthocyanidins. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1778–1784.
- Labrecque J, Bodel C, Chandan F & Grenier D (2006) Effects of a high-molecular weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Antimicrob Chemother* 58: 439–443.
- Maharshak RLI, Jacob EB, Ofek I & Kremer I (2011) The effect of nondialyzable material (NDM) cranberry extract on formation of contact lens biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 4929–4934.
- Niimi M, Firth NA & Cannon RD (2010) Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 98: 15–25.
- Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H & Hammerstone JF (2001) Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 49: 1270–1276.
- Prior RL, Fan E, Ji H, Howell A, Nio C, Payne MJ & Reed J (2010) Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *J Sci Food Agric* 90: 1473–1478.
- Rane HS, Bernardo SM, Howell AB & Lee SA (2014) Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 69: 428–436.
- Shmueli H, Ofek I, Weiss EI, Ronen Z & Hour-Haddad Y (2012) Cranberry components for the therapy of infectious disease. *Curr Opin Biotechnol* 23: 148–152.
- Signoretto C, Canepari P, Stauder M, Vezzulli L & Pruzzo C (2012) Functional foods and strategies contrasting bacterial adhesion. *Curr Opin Biotechnol* 23: 160–167.
- Sobota AE (1984) Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J Urol* 131: 1013–1016.
- Swartz JH & Medrek TF (1968) Antifungal properties of cranberry juice. *Appl Microbiol* 16: 1524–1527.
- Wojnicz D, Sycz Z, Walkowski S, Gabrielska J, Aleksandra W, Alicja K, Anna SL & Hendrich AB (2012) Study on the influence of cranberry extract Zuravit S-O-S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. *Phytomedicine* 19: 508–514.
- Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T & Okuda K (2004) Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* 19: 150–154.
- Yoo S, Murata RM & Duarte S (2011) Antimicrobial traits of tea- and cranberry-derived polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 45: 327–335.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. HPLC chromatogram of methanolic cranberry fraction at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S2. HPLC chromatogram of fraction F1 at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S3. HPLC chromatogram of fraction F2 at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S4. HPLC chromatogram of fraction F3 at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S5. HPLC chromatogram of fraction F4 at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S6. HPLC chromatogram of fraction F5 at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S7. HPLC chromatogram of fraction F6 at 210 nm (black), 280 nm (pink) and 520 nm (blue).

Fig. S8. Adherent *C. albicans* without treatment (a) or after treatment with F6 at 250 µg mL⁻¹ (b) (magnification × 100).

Bibliographie

Allais Daovy. (January 2009). La canneberge d'Amérique, Actualités pharmaceutiques, volume 48, issue 481. p-53-55

Arnal B, Bureau L, Le Jeune R. (2008). La canneberge d'Amérique, propriétés et indications. *Phytothérapie* ; 6:129-32

Ashbee H.R., Evans E. Glyn V. (2002). Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* Species. *Clinical Microbiology Reviews* p. 21–57. American Society for Microbiology

Ben Salah I., Makni F., Cheikhrouhou F., Neji S., Sellami H., Ayadi A. (2009). Les levures du genre *Malassezia* : pathologie, milieux d'isolement et identification. *Journal de Mycologie médicale* 20, p.53-60

Boekhout Teun, Guého Eveline, Mayser Peter, Velegraki Aristeia. (2010). *Malassezia* and the skin. Springer

Branislav Rankovic editor. (2015). Lichen secondary metabolites : Bioactive properties and pharmaceutical potential. Springer

Bruneton Jean. (2009 4ème édition). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier. p.477-479; 470; 431-434

Cafarchia C, Figueredo L.A., Favuzzi V., Surico M.R, Colao V., Iatta R., Montagna M.T., Otranto D. (2012). Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. *Vet Micro* 159. 536-540

Cannizzo F.T., Eraso E., Ezkurra P.A., Villar-Vida M., Bollo E., Castella G., Caban F.J., Vidotto V. & Quindo G. (2007). Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*, *Medical Mycology*, p. 357-361

Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee K. P., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum Mahmoud A. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans* : Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of bacteriology*. Vol. 183, No. 18. p. 5385–5394

Clavaud Cecile, Jourdain Roland, Bar-Hen Avner, Tichit Magali, Bouchier Christiane, Pouradier Florence, El Rawadi Charles, Guillot Jacques, Menard-Szczebara F., Breton Lionel, Latge J-P., Mouyna Isabelle. (2013). Dandruff Is Associated with Disequilibrium in the Proportion of the Major Bacterial and Fungal Populations Colonizing the Scalp. Volume 8 | Issue 3

Colomb Grégoire. (2011). *Malassezia* spp.

D. Lebeaux , J.-M. Ghigo, C. Beloin. (2014). Tolérance des biofilms aux antibiotiques :comprendre pour mieux traiter. Elsevier

Dalenda El Euch, Sondes Trojjet, Mourad Mokni, Martine Feuilhade de Chauvin. (2014). Mycoses superficielles, *Dermatologie infectieuse*. Pages 185-198

Dannaoui Eric. (2013). Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. Revue francophone des laboratoires - MARS 2013 – N°450. Elsevier

Dorosz Ph. (2011). Guide pratique des médicaments. Editions Maloine

Douglas L.Julia. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection, Trends in Microbiology Vol.11 No.1

Dutot M., Rambaux L., Warnet J-M., Rat P. (2008). Modulation du stress oxydant par la myrtille riche en polyphénols sur un modèle de cellules humaines de rétine, J Fr. Ophtalmol., 31, 10, 975-980. Elsevier Masson

Feldman M, Tanabe S, Howell A & Grenier D. (2012). Cranberry proanthocyanidins inhibit the adherence properties of *candida albicans* and cytokine secretion by oral epithelial cells. BMC Complement Altern Med 12:6

Figueredo L.A. , Cafarchia C., Otranto D. (2013). Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. Medical Mycology

Figueredo Luciana A., Cafarchia Claudia, Desantis Salvatore, Otranto Domenico. (2012). Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs; Veterinary Microbiology 160 126–131

Fraisse T., Lachaud L., Sotto A., Lavigne J-P., Cariou G., Boiteux J-P., Escaravage L., Coloby P., Bruyère F., CIAFU. (2011). Recommandations du comité d'infectiologie de l'AFU. Diagnostic, traitement et suivi des candiduries. Progrès en Urologie, Volume 21, Issue 5. Pages 314-321

Francolini I., Norris A., Donelli Piozzi G., Stoodley P. (2004). Usnic Acid, a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov. 2004, p. 4360–4365

Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. (2012). The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. Clin Microbiol Rev ; 25(1):106-41

Gruson-Vescovali Florent. (2002). *Malassezia pachydermatis* dans les oreilles des chiens et des chats. Étude de la prévalence dans un effectif de 250 chiens et 250 chats

Hawser S.P., Douglas L.Julia. (1995). Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept. 1995, p. 2128–2131. American Society for Microbiology.

Imbert Christine. (2013). Biofilms fongiques. ESKA Septembre 2013 – M.A.J. N° 3/2013

Ingolfssdottir K. (Aout 2002). Usnic acid. Phytochemistry 61; p. 729–736

Iserin P, Masson M, Restellini J-P. (2007 2ème édition). Larousse des plantes médicinales

Koenig Hélène (1995). Guide de mycologie médicale. Ellipses.

- Lassy Edith Solange. (2001). Effet du pré-traitement des surfaces plastiques par la chlorhexidine et par le chlorure de benzalkonium sur l'adhérence et le métabolisme mitochondrial de *Candida albicans* et de *Candida dubliniensis* *in vitro*
- Lebeaux D., Ghigo J-M., Beloin C. (2014). Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux* 16, 112—121. Elsevier
- Lebeaux David, Ghigo Jean-Marc. (2012). Infections associées aux biofilms, Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *médecine/sciences* 2012 ; 28 : 727-39
- Lowe Franklin C., Fagelman Elliot. (2001). Cranberry Juice and urinary tract infections: What is the evidence? *Urology*, 57. p. 407—413
- Mathisona Bridget D., Kimblea Lindsey L., Kasparb Kerrie L., Khoob Christina, Chewa Boon P. (2014). Consumption of cranberry beverage improved endogenous antioxidant status and protected against bacteria adhesion in healthy humans : a randomized controlled trial. *Nutrition research*. Volume 34, Issue 5. *Nutrition research*. Pages 420—427
- Mezadri T., Villaño D., Fernández-Pachón M.S, García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 21, Issue 4..Pages 282-290
- Miranda K.C, Rodrigues de araujo C, Rodrigues Costa C., Xisto Sena Passos, Orionalda de fatima lisboa fernandes, Maria do Rosario Rodrigues Silva. (2006). Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *Int. Jour. of Antimicro. Agents*. p. 281-284
- Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., Tošić S., Stanković M., Radojević I., Stefanović O., Čomić L., Dačić D., Čurčić M. et Marković S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 8, p. 5428-5448
- Mukherjee P.K., Chandra J. (2004). *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates* 7 301—309. Elsevier
- Murai Tea, Nakamura Yuka, Rano Rui, Shinichi Watanare and Atsuhiko Hasegawa. (2002). Homogeneous cell suspension of *Malassezia pachydermatis* obtained with an ultrasonic homogenize. *J.Vet.Med.Sci* 64 (4): 381-382
- Olafsdottir ES, Ingolfssdottir K. (2001). Polysaccharides from lichens : structural characteristics and biological activity. *Planta Med* 67:99—208
- Pfaller M.A and Diekema D.J. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis : a Persistent PublicHealth Problem. *CLIN. MICRO. REV.*, Jan. 2007, p. 133—163
- Pollyanna A. S. White , Rita C. M. Oliveira , Aldeidia P. Oliveira, Mairim R. Serafini ,Adriano A. S. Araújo , Daniel P. Gelain , Jose C. F. Moreira, Jackson R. G. S. Almeida,Jullyana S. S. Quintans, Lucindo J. Quintans-Junior and Marcio R. V. Santos. (2014). Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review

Poulain Daniel. (2013). *Candida albicans*, plasticité et pathogénie. Revue francophone des laboratoires- MARS 2013 – N°450. Elsevier

Quave C.L., Estevez-Carmona M., Compadre Cesar M., Hobby Gerren, Hendrickson H., Beenken K.E., Smeltzer M.S. (2012). Ellagic Acid Derivatives from *Rubus ulmifolius* Inhibit *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Improve Response to Antibiotics. January 2012 Volume 7 Issue 1

Rane HS, Bernardo SM, Howell AB & Lee SA. (2014). Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. J Antimicrob Chemother 69. p.428-436

Ripert Christian. (2013). Mycologie médicale. Lavoisier.

Rossignol Pauline. (Janvier 2013). Les lichens et les cosmétiques

Shivraj Hariram Nile M.Sc., Ph.D., Se Won Park M.Sc., Ph.D. (2013). Edible berries : Bioactive components and their effect on human health. Nutrition 30. 134–144. elsevier

Souchon Christian. (1971). Les lichens. Que sais-je ? 52-60; 117-120

Su-Han Kim, Hyun-Chang Ko, Moon-Bum Kim, Kyung-Sool Kwon and Chang-Keun Oh. (2009). The effect of detergents on the morphology and immunomodulatory activity of *Malassezia furfur*. Ann Dermatol Vol 21, N°2

Sudbery P., Gow Neil, Berman Judith (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends in Microbiology Vol.12 No.7. Elsevier

Tragiannidis A., Bisping G., Koehler G., Groll A.H. (2009). *Malassezia* infections in immunocompromised patients. Mycoses (53), 187-195

Van Haluwyn Chantal, Lerond Michel. (1993). Guide des lichens. éditions Lechevalier. p.60-113-146-147-148

Vendramini Ana L., Luiz C. Trugo. (November 2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. Food Chemistry, Volume 71, Issue 2 Pages 195-198

Vertika Shukla, Geeta Pant Joshi, M. S. M. Rawat. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds : a review. Phytochem Rev 9:303–314

VIDAL. (2015). 91ème édition

Yu Fu, Xiaozhou Zhou, Shiguo Chen, Yujing Sun, Yan Shen, Xingqian Ye. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of Chinese wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb.) LWT - Food Science and Technology, Volume 60, Issue 2, Part 2. Pages 1262-1268

Zimmer Karine Rigon, Blum-Silva Carlos H., Kulkamp Souza Andre Luiz, WulffSchuch Marica, Reginatto Flavio Henrique, Martin Claudio, P. Pereira, Macedo Alexandre Jose and Lencina Claiton Leonetti. (2013). The Antibiofilm Effect of Blueberry Fruit Cultivars Against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Food 17 (3) 324–331

Sites internet :

- 1: www.anses.fr/fr/content/canneberge-et-infections-urinaires ; consulté le 9 avril 2015
- 2: <http://www.eurekasante.fr/parapharmacie/complements-alimentaires/vitamine-c-acide-ascorbique.html> ; consulté le 20 avril 2015
- 3: www.telabotanica.org ; consulté le 20 avril 2015
- 4: <http://www.afl-lichenologie.fr> ; consulté le 12 avril 2015
- 5: http://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/acb15a6483102c72d763d8a790424e34.pdf ; consulté le 22 mai 2015
- 6: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/26/CandidiasisFromCDCinJPEG03-18-06.JPG> ; consulté le 24 avril 2015
- 7: <http://campus.cerimes.fr/media/campus/deploiement/parasitologie/enseignement/malassezia/site/html/images/figure1.jpg> ; consulté le 20 mai 2015
- 8: <http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:2006-10-22Vaccinium02-02.jpg> ; consulté le 30 mai 2015
- 9: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/30/Proanthocyanidin_A1.svg/512px-Proanthocyanidin_A1.svg.png ; consulté le 30 mai 2015
- 10: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/72/Vaccinium_myrtillus_Mustikka_IMG_1100_C.JPG ; consulté le 16 mars 2015
- 11: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Malpighia_glabra_blossom_and_fruit.jpg ; consulté le 16 mars 2015
- 12: <https://www.flickr.com/photos/karviainen/194675157/> ; consulté le 16 mars 2015
- 13: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/43/%28%2B%29-usnic_acid.svg/632px-%28%2B%29-usnic_acid.svg.png ; consulté le 2 avril 2015
- 14: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/27/Usnea_1_%282005_07_19%29.jpg/450px-USnea_1_%282005_07_19%29.jpg ; consulté le 2 avril 2015
- 15: <https://www.flickr.com/photos/7147684@N03/12807518645> ; consulté le 2 avril 2015
- 16: <https://www.flickr.com/photos/7147684@N03/4503847243/sizes/l> ; consulté le 22 mai 2015
- 17: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9c/C_albicans_labeled.jpg ; consulté le 24 avril 2015

Résumé

Les levures du genre *Candida* et *Malassezia* sont responsables d'infections cutanéomuqueuses et invasives. Elles sont capables de former un biofilm, structure complexe constituée d'une communauté microbienne adhérente à une surface et englobée dans une matrice extracellulaire. Cette faculté à former des biofilms augmente considérablement la résistance de ces levures aux antifongiques actuellement sur le marché.

Les sources végétales et lichéniques sont riches en composés d'intérêt et ont déjà démontrées des potentiels thérapeutiques notamment contre les biofilms.

C'est dans ce contexte que des tests expérimentaux ont été réalisés au laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale du CHU de Poitiers afin d'évaluer le potentiel antifongique et anti-biofilm fongique d'extraits ou fractions de fruits rouges (canneberge, framboise, myrtille et acérola) et lichens. Ces extraits ou fractions testés n'ont pas démontrés d'activité contre *Candida* spp. et *Malassezia* spp. en conditions planctoniques. Concernant *Candida*, la canneberge est le fruit au potentiel anti-adhérent le plus élevé avec des concentrations minimales anti-adhérentes comprises entre 1 et 0,062 µg/mL. Certains lichens sont également doués d'activité anti-biofilm de *C. albicans* comme *Cladonia parasitica*, *C. squamosa*, *Nephroma laevigatum* et *Usnea florida* avec des concentrations minimales anti-biofilms de 24 h comprises entre 39,5 et 22,5 µg/mL.

Actuellement, encore peu de données existent dans la littérature concernant le genre *Malassezia*. Les protocoles standards des tests utilisés chez *Candida* ont donc dûs être adaptés à *Malassezia* spp. Une étude cinétique a été effectuée afin de déterminer certaines caractéristiques de ce genre ainsi que les temps d'incubation à imposer lors du test anti-biofilm. La sonication permettrait de résoudre les problèmes d'hétérogénéité rencontrés lors de la préparation des suspensions de *Malassezia*.

Ainsi, les résultats obtenus sont prometteurs et confirment le potentiel thérapeutique des sources naturelles étudiées.

Mots-clés : *Candida*, *Malassezia*, biofilm, anti-adhérent, fruits rouges, lichens

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

**D'**honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**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 l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**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 d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.