

Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen, Algérie
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Université Libre de Bruxelles, Belgique
Faculté de Médecine



Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (UABBT)
Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie (ULB)

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Biologie (Université Aboubekr Belkaïd -Tlemcen)
En Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques (Université Libre de Bruxelles)

Présentée par

SEBAA Sarra

Thème

Inhibition des biofilms à *Candida albicans* : recherche de nouvelles approches thérapeutiques

Soutenue le :

Devant le Jury composé de :

Président	Pr. Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Témouchent
Directrice de thèse	Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen
Co-directeur de thèse	Pr. Philippe Courtois	Université Libre de Bruxelles
Examineurs	Pr. Hassaine Hafida	Université de Tlemcen
	Pr. Dominique Parent	Université Libre de Bruxelles
	Dr. Sari-Belkherroubi Lamia	Université de Tlemcen
	Pr. Astrid Vanden Abbeele	Université Libre de Bruxelles
	Pr. Jean-Pierre Van Nieuwenhuysen	Université Catholique de Louvain



Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen, Algérie
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Université Libre de Bruxelles, Belgique
Faculté de Médecine



Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (UABBT)
Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie (ULB)

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Biologie (Université Aboubekr Belkaïd -Tlemcen)
En Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques (Université Libre de Bruxelles)

Présentée par

SEBAA Sarra

Thème

Inhibition des biofilms à *Candida albicans* : recherche de nouvelles approches thérapeutiques

Soutenue le :

Devant le Jury composé de :

Président	Pr. Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Témouchent
Directrice de thèse	Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen
Co-directeur de thèse	Pr. Philippe Courtois	Université Libre de Bruxelles
Examineurs	Pr. Hassaine Hafida	Université de Tlemcen
	Pr. Dominique Parent	Université Libre de Bruxelles
	Dr. Sari-Belkherroubi Lamia	Université de Tlemcen
	Pr. Astrid Vanden Abbeele	Université Libre de Bruxelles
	Pr. Jean-Pierre Van Nieuwenhuysen	Université Catholique de Louvain

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé en cotutelle entre le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen, Algérie et le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie à la Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles, Belgique. J'adresse mes remerciements aux directrices des deux laboratoires, professeurs Zahia Boucherit-Otmani et Kathleen Mc Entee de m'avoir accueillie au sein de leurs équipes.

J'exprime mes remerciements à Madame Zahia Boucherit-Otmani, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je suis reconnaissante de son aide, de ses conseils pertinents et de ses qualités scientifiques. Je lui dois la thématique intéressante sur les biofilms à *Candida albicans* qu'elle m'a proposée et que j'ai eu beaucoup de plaisir à étudier. Je lui exprime aussi ma gratitude pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant de s'engager dans cette cotutelle.

Je tiens à exprimer mes remerciements également et ma gratitude au Professeur Philippe Courtois de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir encadré ce travail avec beaucoup de passion et d'enthousiasme. Je lui dois le thème sur la régulation des biofilms à *Candida* par les molécules du *quorum sensing* et sur l'utilisation des protéines salivaires en hygiène bucco-dentaire, des voies de recherche prometteuses contre les biofilms fongiques. Je suis très reconnaissante de sa disponibilité, de sa rigueur et de ses compétences scientifiques. Toutes ces qualités m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions. L'aboutissement de cette collaboration a nécessité une année de démarches administratives, merci pour votre soutien et votre efficacité tout au long du cheminement de ce projet très exigeant.

J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur Kebir Boucherit, Professeur, Directeur du Centre Universitaire Belhadj Bouchaib-Ain Témouchent d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit malgré ses multiples occupations et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le Jury de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Madame Hafida Hassaine, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen et Madame Lamia Sari-Belkherroubi, Maître de conférences classe A au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime ma gratitude au Professeurs Dominique Parent, Astrid Vanden Abbeele de l'Université Libre de Bruxelles et Jean-Pierre Van Nieuwenhuysen de l'Université Catholique de Louvain, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie la Commission de Classement des Crédits Internationaux (CCCI) de l'Université Libre de Bruxelles (anciennement Bureau des Relations Internationales et de la Coopération - BRIC - de l'ULB) de m'avoir accordée une bourse de doctorat du Fonds *Xénophilia* pour venir à Bruxelles six mois par an pendant 4 ans. Je remercie le fondateur du Fonds *Xénophilia*, Monsieur Thierry Lepage, qui a, de plus, manifesté beaucoup d'intérêt à la thématique des biofilms fongiques en nous rendant visite au laboratoire. Je remercie aussi l'ARES (Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur) qui m'a attribué une bourse pour soutenir la finalisation de cette thèse.

Je remercie le Docteur Zakia Oussadit, Chef de Service de Prothèses dentaires au CHU de Tlemcen, de m'avoir autorisée à effectuer les prélèvements de souches cliniques. Je remercie les étudiants en dentisterie et les patients qui ont participé à cette étude. Je remercie Monsieur Keyzer, Assistant au laboratoire de Prothèse à la Faculté de Médecine de l'ULB, pour la fabrication de languettes de résine qui ont permis à un étudiant en dentisterie de tester avec moi certaines hypothèses sur la décontamination des prothèses amovibles. Je remercie la firme belge TaradonTM de nous avoir fourni de la lactoperoxydase adsorbée sur un support inerte, un système original pour l'utilisation des peroxydases.

Je remercie les étudiantes de la Haute Ecole Francisco Ferrer à Bruxelles, Assia Hamouda, Ilham Dardour, Charlotte Hauet, et Lina Malashkina, pour leur aide dans le cadre de leur travail de fin d'études. Leur compagnie m'a été très enrichissante. Je remercie aussi les étudiants en dentisterie à l'ULB, Nicolas Hizette et Maxime Faltot, qui m'ont permis dans le cadre de leur travail de fin d'études de passer de l'expérimentation *in vitro* à l'expérimentation *ex vivo* sur des prothèses dentaires.

Je remercie tous les membres du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique ainsi que tous les membres du laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, plus particulièrement Monsieur Grégory Vegh pour son aide dans les mises au point des microscopes et dans la résolution des soucis informatiques.

Je remercie les membres de mon Comité d'accompagnement de l'ULB, les Professeurs Laurence Ladrière, Carine Truyens et Olivier Vandenberg de m'avoir accompagnée durant ma thèse ainsi que d'avoir formulé des remarques et des conseils très précieux.

Je remercie très chaleureusement Madame Courtois pour les relectures de mes travaux. Je tiens également à la remercier, ainsi que Claire Courtois, d'avoir facilité mon adaptation à Bruxelles et aussi de m'avoir fait découvrir la Belgique. Grâce à elles, je garde de très bons souvenirs. Qu'elles soient assurées de ma sincère et profonde reconnaissance.

DEDICACE

Je dédie cette thèse

*à mes très chers parents,
avec tous mes remerciements et ma gratitude pour leur amour et leur soutien,*

*à mes chers frères Mohammed, Nadhir et Yassine,
avec mes remerciements pour leur complicité et leur affection,*

*à ma chère belle-sœur Fadja,
en la remerciant pour ses encouragements,*

à ma grand-mère paternelle,

à toute ma famille.

Enfin, j'adresse une pensée à la mémoire de ma grand-mère maternelle.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	i
GLOSSAIRE	ii
RESUME	v
CONTEXTE GENERAL	
INTRODUCTION	
I. <i>Candida albicans</i>	3
I.1. Morphologie	3
I.2. Facteurs de virulence	4
I.2.1. Dimorphisme	4
I.2.2. Adhésion	6
I.2.3. Formation du biofilm	6
I.2.4. Sécrétion des aspartyl-protéinases (SAP)	8
II. Les biofilms dans la cavité buccale	9
II.1. Généralités	9
II.2. Biofilms prothétiques à <i>C. albicans</i>	10
III. Biofilms à <i>C. albicans</i> et <i>quorum sensing</i>	13
III.1. Définition du <i>quorum sensing</i>	13
III.2. Molécules du <i>quorum sensing</i> chez <i>C. albicans</i>	14
III.2.1. Tyrosol	15
III.2.2. Farnésol	16
IV. Biofilms à <i>C. albicans</i> et protéines exocrines salivaires	18
IV.1. Lysozyme	18
IV.2. Système peroxydase	20
OBJECTIFS DE LA THESE	
MATERIEL ET METHODES	
I. Matériel	26
I.1. Matériel biologique : <i>Candida albicans</i>	26
I.1.1. Cultures de <i>Candida</i>	26
I.1.2. Souches de levures	26
I.1.3. Comptage des levures	28
I.1.4. Caractéristiques des patients appareillés	31
I.1.5. Données mycologiques	33
I.2. Analyses microscopiques	34
I.3. Molécules du <i>quorum sensing</i>	35
I.3.1. Tyrosol	35
I.3.2. Farnésol	36
I.4. Molécules exocrines salivaires	37
I.4.1. Lysozyme	37
I.4.2. Système peroxydase	38
I.4.3. Préparation d'une solution d'oxydants OSCN ⁻ /OI ⁻	38
I.5. Matériaux	45
II. Méthodes	45
II.1. Evaluation de la croissance dans des plaques 96-puits	46
II.2. Evaluation des biofilms par coloration au cristal violet	47
II.3. Effet des molécules du <i>quorum sensing</i>	48
II.4. Effet du lysozyme	48
II.5. Effet de la solution d'oxydants OSCN ⁻ /OI ⁻	51

II.6. Effet antibiofilm d'un surnageant de culture de <i>C. albicans</i>	52
II.7. Dosage de H ₂ O ₂	52
II.8. Evaluation de l'effet candidacide des oxydants OSCN ⁻ /OI ⁻	54
II.9. Analyse de la toxicité cellulaire	55
III. Etude clinique <i>ex vivo</i>	56
IV. Analyses statistiques	57
RESULTATS	
I. Etudes <i>in vitro</i>	58
I.1. Molécules du <i>quorum sensing</i>	59
I.1.1. Effet du tyrosol sur la formation du biofilm	59
I.1.2. Effet du farnésol sur la formation du biofilm	65
I.1.3. Effet des QSM sur un biofilm déjà formé	69
I.1.4. Production de facteurs anti-biofilms par <i>C. albicans</i>	70
I.2. Protéines exocrines salivaires	73
I.2.1. Effet du lysozyme sur la formation du biofilm	73
I.2.2. Effet du lysozyme sur des biofilms formés sur résine	80
I.2.3. Effet des hypohalogéneux sur la formation du biofilm	83
II. Etude <i>ex vivo</i>	97
II.1. Caractéristiques de l'essai clinique	97
II.2. Données socio-anthropométriques	97
II.3. Données cliniques	97
II.4. Données mycologiques	99
II.5. Effet candidacide de la solution d'oxydants	100
III. Toxicité sur les cellules épithéliales buccales	102
DISCUSSION	
I. Former des biofilms <i>in vitro</i>	104
II. Réguler les biofilms à <i>C. albicans</i>	108
II.1. Effet antibiofilm du tyrosol	109
II.2. Effet probiofilm du tyrosol	109
II.3. Effet antibiofilm du farnésol	110
II.4. Effet probiofilm du farnésol	110
III. Contrôler les biofilms à <i>C. albicans</i>	111
III.1. Effet antibiofilm du lysozyme	112
III.2. Effet probiofilm du lysozyme	115
III.3. Effet antibiofilm de la lactoperoxydase	116
IV. Mimer les mécanismes biologiques anti- <i>Candida</i>	119
V. Prévenir ou traiter ?	123
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

ABREVIATIONS

% :	pourcent	MARS :	<i>morphogenic autoregulatory substance</i>
Δ :	différence entre deux mesures	MCE :	mercaptoéthanol
°C :	degrés <i>Celsius</i>	McF :	<i>MacFarland</i>
μl :	microlitre	mg :	milligramme
μM :	micromole par litre	min :	minute
μm :	micromètre	ml :	millilitre
Amp B :	amphotéricine B	mm :	millimètre
ANOVA :	<i>analyse of variance</i>	mM :	millimolaire
ATCC :	<i>American Type Culture Collection</i>	MPO :	myéloperoxydase
bl :	blastoconidie	N :	nombre de cas
BSA :	<i>bovine serum albumin</i>	nm :	nanomètre
C. albicans :	<i>Candida albicans</i>	NS :	non significatif
C :	contrôle	p :	probabilité
CE :	coefficient d'exactitude	PBS :	<i>phosphate buffer saline</i>
CEB :	cellules épithéliales buccales	PEA :	pellicule exogène acquise
CFU :	<i>colony forming unit</i>	pH :	potentiel d'hydrogène
CMI :	concentration minimale inhibitrice	PM :	poids moléculaire
CML :	concentration minimale létale	PMMA :	<i>poly(methyl methacrylate)</i>
CN :	contrôle négatif	psi :	<i>pound per square inch</i>
CP :	contrôle positif	QS :	<i>quorum sensing</i>
CV :	coefficient de variation	QSM :	<i>quorum sensing molecule</i>
DMSO :	diméthylsulfoxyde	R :	rugueux (<i>rough</i>)
DO :	densité optique	r :	coefficient de corrélation
DTNB :	acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque	r² :	coefficient de dispersion
FPP :	farnésyl pyrophosphate	R_n :	énième repiquage
F_{sol} :	farnésol	rpm :	rotation par minute
g :	force attraction terrestre	S :	lisse (<i>smooth</i>)
G :	glucose	Sap :	<i>secreted aspartyl proteinase</i>
GlcNAc :	acétylglucosamine	SCMI :	concentration minimale inhibitrice des cellules sessiles
GOD :	glucose-oxydase	SD :	<i>standard deviation</i>
h :	heure	SEM :	<i>standard erreur of mean</i>
IUPAC :	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	sp. :	<i>species</i>
J :	jour de l'expérience	SPO :	sialoperoxydase
kDa :	kiloDalton	t :	temps
Lf :	lactoferrine	TG :	tube germinatif
ln :	logarithme népérien	TMB :	tétraméthylbenzidine
LPO :	lactoperoxydase	TNB :	acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
Lz :	lysozyme	T_{sol} :	tyrosol
M :	molaire		

GLOSSAIRE

Adhérence :	force nécessaire pour séparer deux surfaces attachées.
Adhésion :	ensemble des mécanismes menant à l'adhérence.
Biofilm :	agrégats de micro-organismes adhérant sur un support immergé dans un liquide.
Blastoconidie :	cellule fongique de la reproduction asexuée formée par bourgeonnement d'une autre blastoconidie ou d'un filament.
Bourgeonnement :	mécanisme de reproduction asexuée de certains mycètes, notamment les levures.
Catalase :	enzyme transformant le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène.
CFU :	colonie microbienne visible macroscopiquement issue d'un seul micro-organisme étalé sur milieu solide (<i>Colony Forming Unit</i> en anglais ou <i>Unité Formatrice de Colonie</i> en français).
Commensal :	micro-organisme vivant attaché sur les surfaces externes d'un organisme sans lui causer de dommage.
Défensine	peptide cationique antimicrobien présent dans la salive.
Dimorphisme :	propriété des mycètes de se présenter sous deux morphologies différentes, tantôt des petites cellules (rondes, ovales), tantôt des filaments.
Farnésol :	molécule du <i>quorum sensing</i> , qui empêche la transition de <i>C. albicans</i> de la forme levure à la forme filament dans certaines conditions environnementales.
Filamentation :	production de filaments par des cellules mycétales.
Formulation galénique :	liste des constituants d'une préparation pharmaceutique.
Glucose-oxydase :	enzyme qui transforme le glucose en gluconate avec production de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).
Histatine :	protéine antimicrobienne salivaire riche en histidine.
Lactoferrine :	protéine chélatrice de Fe ³⁺ .
Lactoperoxydase :	enzyme catalysant l'oxydation du thiocyanate / iodure en présence de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) pour donner de l'hypothiocyanite / hypoiodite.

Levure :	champignon unicellulaire se reproduisant par bourgeonnement.
Lysosome :	organite intracellulaire renfermant des enzymes qui sont responsables de la lyse cellulaire et qui interviennent dans la digestion des bactéries phagocytées par les neutrophiles.
Lysozyme :	protéine, sécrétée par les glandes exocrines et les phagocytes, qui présente une action muramidase connue pour inhiber les bactéries à Gram positif et un effet inhibiteur non encore élucidé sur les levures du genre <i>Candida</i> .
Normaliser :	transformer une série de valeurs pour les rendre comparables avec un point de référence spécifique.
Peptone :	extrait préparé par protéolyse de lait bovin ou de viandes animales.
Pseudohalogénure :	molécule réagissant de la même façon que les halogénures lors de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase.
Quorum sensing :	modification de l'expression phénotypique des micro-organismes en fonction de leur nombre dans l'environnement, permettant ainsi une adaptation à un environnement favorable ou défavorable.
Résine :	ou <i>poly(methyl methacrylate)</i> , matériau utilisé dans la confection de prothèses dentaires, obtenu par polymérisation de composés organiques.
Sabouraud :	nom d'un milieu de culture - en l'honneur de Raymond Sabouraud - qui permet la croissance des levures et des moisissures.
Saprophyte :	micro-organisme capable de se nourrir de matière organique non vivante.
Sessile :	fixé à un support, s'oppose à planctonique (dans le cadre des biofilms).
Subculture :	repiquage d'une culture microbienne dans / sur un milieu frais.
Test ANOVA :	test statistique pour comparer plus de deux groupes de données qui présentent une distribution gaussienne.
Test de Bonferroni :	test complémentaire à un test ANOVA pour analyser la différence statistique entre deux groupes de données (quels qu'ils soient) lors de comparaisons multiples.
Test de Dunnett :	test complémentaire à un test ANOVA pour analyser la différence statistique entre un groupe de données et le groupe contrôle lors de comparaisons multiples.

- Tube germinatif :** ébauche de filament à partir d'une blastoconidie de *C. albicans* dans certaines conditions expérimentales.
- Tyrosol :** molécule du *quorum sensing*, dérivée de la tyrosine avec une fonction alcool ; cette molécule favorise la transition de *C. albicans* de la forme levure à la forme filament dans certaines conditions environnementales.
- Unités McFarland :** unités de turbidité à partir d'étalons de concentration croissante en sulfate de baryum, permettant une comparaison visuelle avec une suspension microbienne.

RESUME

Les biomatériaux insérés dans la cavité orale, tout particulièrement les prothèses dentaires amovibles en résine, constituent des surfaces propices à la formation de biofilms incorporant des levures du genre *Candida*, à l'origine de candidose. Les levures, comme d'autres micro-organismes, adaptent leur prolifération à l'environnement par des molécules dites du *quorum sensing*. D'autre part, la contamination du milieu oral est contrôlée par de nombreuses protéines sécrétées par les glandes salivaires, mais leur utilisation en hygiène est peu documentée. Le but de ce travail est d'étudier l'effet anti-biofilm de molécules du *quorum sensing* et de protéines exocrines, le lysozyme et la lactoperoxydase, dans la perspective de réduire la colonisation des surfaces de prothèses dentaires par des levures du genre *Candida* et par conséquent de prévenir une stomatite prothétique. A cette fin, des biofilms à *Candida* ont été produits dans des plaques multi-puits à fond plat en polystyrène et quantifiés par coloration au cristal violet. L'effet de deux molécules du *quorum sensing* - tyrosol et farnésol - sur la formation des biofilms à *Candida* a été investigué *in vitro* sur la souche de référence ATCC 10231 et sur des souches cliniques isolées à partir de prothèses dentaires. Le tyrosol et le farnésol à hautes concentrations (> 6 mM et > 1 mM respectivement) entraînent une limitation de la formation de biofilms sans altérer la croissance fongique tandis que des concentrations plus faibles (~ 1 mM et ~ 1 µM respectivement) favorisent la formation de biofilms. Le lysozyme présente aussi un effet dépendant de la dose sur la formation de biofilms par *Candida*: promoteur de la formation de biofilms à une concentration de 1000 µg/ml et inhibiteur de la formation de biofilms à des concentrations plus faibles (3 et 10 µg/ml). Les composés hypohalogéneux (> 500 µM) produits par un système peroxydase limitent la croissance des levures et par conséquent leur capacité à former des biofilms *in vitro*. Un seul trempage *ex vivo* de prothèses amovibles pendant 5 minutes dans une solution d'ions hypohalogéneux (2000 µM) entraîne une diminution d'au moins 1 unité logarithmique du nombre de *Candida* dans 58,3 % des cas (N = 23) alors qu'un trempage dans de l'eau n'a aucun effet sur la colonisation de la prothèse : cet effet est statistiquement significatif (Chi carré, p = 0,0006, test de Fisher, p = 0,0009).

المواد الحيوية (biomaterials) المدخلة في تجويف الفم، خاصة أطقم الأسنان الاصطناعية المتحركة من مادة الراتنج، تشكل مساحات تسهل تشكيل أغشية حيوية (biofilms) تندمج فيها الخمائر من نوع 'كانديدا' (*Candida*) التي تتسبب في فطار (candidiasis)، ذلك أن الخمائر، مثلها مثل بقية الكائنات المجهرية، تلائم عملية تكاثرها مع المحيط بواسطة جزيئات تسمى 'جزيئات نصاب الاستشعار' (*quorum sensing molecules*). كما أن تلوث وسط الفم تتم مراقبته بالعديد من البروتينات التي تفرزها الغدد اللعابية، إلا أن استعمالها في النظافة قليل التوثيق. إن الغرض من هذا العمل هو دراسة التأثير المضاد للأغشية الحيوية (*anti-biofilm*) لجزيئات نصاب الاستشعار و البروتينات الخارجية (*exocrine*)، الليسوزيم (*lysozyme*) و اللاكتوبيروكسيداز (*lactoperoxydase*)، باتجاه تقليص استيطان الخمائر من نوع 'كانديدا' لمساحات أطقم الأسنان الاصطناعية، وبالتالي منع حصول التهاب غشاء الفم. لهذا الغرض، تم إنتاج أغشية حيوية من نوع 'كانديدا' في صفائح متعددة التجاويف على قاعدة سطحية من لدائن البوليستيران وتحديد كميتها بواسطة تلوينها بالبنفسجي البلوري (*crystal violet*). وقد جرى فحص تأثير جزئيين من نصاب الاستشعار (التيروسول والفارنيسول-

tyrosol and farnesol) على تشكيل الأغشية الحيوية من نوع 'كانديدا' في بيئة مصنعة (*in vitro*)، على سلالة مرجعية (ATCC 10231) وعلى سلالات سريرية (اكلينيكية) معزولة، انطلاقاً من أطقم أسنان اصطناعية. وقد تبين بأن التيروسول والفارنيسول ذوي التركيز العالي ($> 6 \text{ mM}$ و $> 1 \text{ mM}$) على التوالي، يتسببان في تقليص تشكل الأغشية الحيوية من دون الإضرار بنمو الفطر. بينما التركيز الأقل ($\sim 1 \text{ mM}$ و $\sim 1 \mu\text{M}$) على التوالي، يسهل تشكل الأغشية الحيوية. كما أن لليسوزيم تأثير بحسب مقدار الجرعة على تشكيل الأغشية الحيوية من فئة 'كانديدا': يؤدي إلى تشكيل هذه الأغشية الحيوية بتركيز يساوي $1000 \mu\text{g/ml}$ و كبح لتشكل الأغشية الحيوية على تركيز أقل (3 و $10 \mu\text{g/ml}$). المركبات hypohalous ($> 500 \mu\text{M}$) التي ينتجها نظام البيروكسيداز (*peroxidase system*) تحد من نمو الخمائر وبالتالي من قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية في بيئة مصنعة. ويكفي وضع أطقم الأسنان المصنعة خارج البيئة الحيوية (*ex vivo*) لمدة 5 دقائق في محلول من أيونات hypohalous ($2000 \mu\text{M}$) لتقليص عدد خمائر 'كانديدا' بنسبة وحدة لوغاريتمية على الأقل في 58,3 حالات في % (N = 23)، بينما وضعها في الماء لا يؤدي إلى أي تأثير على استيطان الطاقم الاصطناعي: ما يعني أن هذا التأثير معتبر من الناحية الإحصائية: (Chi square, $p = 0.0006$, Fisher's exact test, $p = 0.0009$).

ABSTRACT

Biomaterials inserted into the oral cavity, especially removable dentures in resin, are surfaces leading to the formation of biofilms incorporating *Candida* yeasts, source of candidiasis. Yeasts, like other microorganisms, adapt their proliferation to the environment through molecules called *quorum sensing molecules*. On the other hand, contamination of the oral environment is controlled by numerous proteins secreted by salivary glands, but their use in hygiene is poorly documented. The aim of this work is to study the anti-biofilm effect of *quorum sensing molecules* and exocrine proteins, lysozyme and lactoperoxidase, with a view to reduce the colonization of denture surfaces by *Candida* yeasts and consequently to prevent denture stomatitis. To this end, *Candida* biofilms were produced in multi-well polystyrene plates with a flat bottom and quantified by staining with crystal violet. The effect of two *quorum sensing molecules* - tyrosol and farnesol - on the formation of biofilms in *Candida* was investigated *in vitro* on the reference strain ATCC 10231 and isolated clinical strains from dentures. Tyrosol and farnesol at high concentrations (> 6 mM and > 1 mM respectively) result in a decrease of the biofilm formation without affecting fungal growth while lower concentrations (~ 1 mM and ~ 1 µM respectively) promote biofilm formation. Lysozyme also provided a dose-dependent effect on biofilm formation by *Candida*: biofilm promotor at a concentration of 1000 µg/ml and biofilm inhibitor at lower concentrations (3 and 10 µg/ml). Hypohalous compounds (> 500 µM) produced by a peroxidase system limit yeast growth and therefore the ability to form biofilms *in vitro*. *Ex vivo* denture immersion for 5 minutes in a hypohalous compounds solution (2000 µM) causes a decrease of at least 1 log unit in the *Candida* count in 58.3% of cases (N = 23) and immersion in water has no effect on the colonization of the prosthesis : this effect is statistically significant (Chi square, p = 0.0006, Fisher's exact test, p = 0.0009).

CONTEXTE GENERAL

Les candidoses (*Dignani et al.*, 2009) sont des infections de la peau, des muqueuses ou des tissus profonds, provoquées par la prolifération de levures du genre *Candida*, la plus fréquemment isolée étant *Candida albicans*. Les candidoses sont fréquentes chez les individus médicalement- ou immuno-compromis. D'après la littérature (*Cannon & Chaffin*, 1999), *C. albicans* a la capacité d'adhérer à différentes surfaces qu'elles soient biologiques (par exemple les muqueuses de la cavité orale) ou inertes (biomatériaux utilisés pour les tubulures de cathéters, biomatériaux pour la fabrication des implants ou des prothèses dentaires) et de former sur ces surfaces avec d'autres espèces microbiennes des communautés appelées "biofilms". Les mécanismes d'adhésion diffèrent selon la nature de la surface : l'adhésion aux surfaces biologiques dépend de liaisons ligands / récepteurs (*Olsen*, 1990), l'adhésion aux surfaces inertes est sous le contrôle d'interactions hydrophobes versus électrostatiques (*Klotz*, 1994 ; *Yoshijima et al.*, 2010). De nombreux rapports (*Boucherit-Atmani et al.*, 2011) ont montré la capacité de souches de *C. albicans* isolées de dispositifs médicaux d'accès veineux à former des biofilms. Des études *in vivo* et *in vitro* (*Courtois*, 2011) ont aussi montré l'intégration des *Candida* dans des biofilms couvrant différents biomatériaux utilisés dans la cavité buccale pour la fabrication des prothèses dentaires, des appareils orthodontiques et autres dispositifs placés en bouche. Les *Candida* agrégés en biofilms sont plus résistants aux traitements antifongiques que leurs homologues planctoniques en suspension (*Chandra et al.*, 2001b). *C. albicans* (*Odds*, 1988) est une levure polymorphe tantôt sous forme de cellules bourgeonnantes (blastoconidies), tantôt sous forme de cellules filamenteuses (hyphes ou pseudohyphes). Cette capacité d'adapter la morphologie à l'habitat, y compris dans des biofilms, constitue un mécanisme qui module la survie ainsi que la virulence de la levure dans divers environnements. La prolifération de *C. albicans* et son passage d'une forme

à l'autre est sous le contrôle de molécules (farnésol, tyrosol, ...) dites du *quorum sensing* (Kruppa, 2009) : on appelle *quorum sensing* un ensemble de mécanismes biochimiques qui modifient le comportement des micro-organismes en fonction de leur nombre. *In vivo*, *C. albicans* est une levure commensale présente sur les muqueuses de la cavité orale et du tube digestif (Cannon & Chaffin, 1999 ; Powderly, 2009 ; Neville et al., 2015). Les biomatériaux insérés dans la cavité orale, tout particulièrement les prothèses dentaires amovibles en résine, constituent des surfaces propices à l'adsorption de *Candida*. Les micro-organismes ne se fixent jamais directement sur les surfaces orales, étant donné que ces surfaces sont toujours recouvertes d'une pellicule salivaire (Hannig & Joiner, 2006). L'invasion pathogène des muqueuses s'accompagne d'un passage de la forme bourgeonnante à la forme filamenteuse. Dans la cavité buccale, la prolifération de la levure et le passage au parasitisme sont sous le contrôle des sécrétions exocrines salivaires qui contiennent des facteurs antimicrobiens tels le lysozyme, les peroxydases, les histatines et les défensines, ... (Salvatori et al., 2016).

INTRODUCTION

I. *Candida albicans*

I.1. Morphologie

Candida albicans est un mycète qui présente différentes formes morphologiques (Figure 1). La forme unicellulaire bourgeonnante appelée blastoconidie (Figure 1a) peut se transformer en filament ou hyphe septé c'est-à-dire une forme enrubannée avec des parois parallèles et composée de logettes (Figure 1b). Des cellules, parfois allongées, reliées les unes aux autres en une constriction forment des pseudohyphes (Figure 1c) : elles sont considérées comme une modification de la forme bourgeonnante (Sudbery *et al.*, 2004). La majorité des souches de *C. albicans* peuvent former des tubes sans cloisonnement entre la levure et le filament quand on les place dans du sérum de mammifères pendant au moins 1 heure à 37°C : ceux-ci sont appelés tubes germinatifs (Figure 1d) et seraient représentatifs de la capacité invasive de *C. albicans* ; les autres levures ne le font pas. Dans des milieux pauvres, *C. albicans* forme, sur les extrémités des hyphes et des pseudohyphes, des chlamydoconidies (Whiteway & Bachewich, 2007) : ce sont des cellules larges, à paroi épaisse et biréfringente dont la fonction est inconnue.

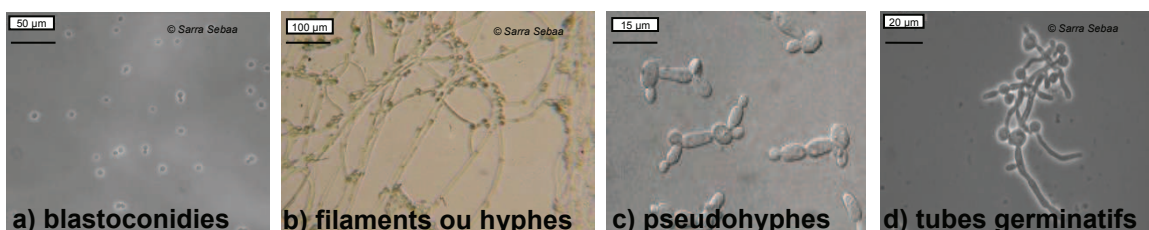


Figure 1. Différentes morphologies de *C. albicans* (Photographie 1-C reprise de Sudbery *et al.*, 2004).

I.2. Facteurs de virulence

C. albicans est une espèce fongique commensale qui colonise couramment les surfaces des muqueuses humaines telle que les muqueuses de la cavité buccale (Cannon & Chaffin, 1999) où elle coexiste avec diverses espèces microbiennes (Morales & Hogan, 2010). Chez les individus sains, *C. albicans* est généralement une espèce mineure de la flore microbienne orale. Toutefois, dans des conditions de dysfonctionnement immunitaire (Samaranayake, 1992) ou en cas des facteurs prédisposant locaux tels qu'une mauvaise hygiène buccale ou le port de prothèses dentaires (Vanden Abbeele et al., 2008), *C. albicans* peut devenir un pathogène opportuniste. Chez ces patients, *C. albicans* prolifère et peut envahir les muqueuses, provoquant des infections superficielles, comme la stomatite prothétique, parfois des infections plus graves invasives, disséminées, voire généralisées (Shepherd et al., 1985). Bien que le passage du commensalisme au parasitisme exige un affaiblissement de l'hôte, il est également la conséquence d'un processus actif régulé par une expression génétique du pathogène lui-même (Hube, 2014). Plusieurs facteurs ont été identifiés comme pouvant contribuer à la pathogénicité de *C. albicans*. Parmi ceux-ci, la capacité de dimorphisme, d'adhésion et de formation de biofilms ainsi que la sécrétion d'aspartyl-protéinases (Cutler, 1991 ; Calderone & Fonzi, 2001 ; Mayer et al., 2013).

I.2.1. Dimorphisme

Le dimorphisme est la capacité de *C. albicans* à passer (« switcher ») de la forme dite levure en blastoconidies à la forme filamenteuse en hyphes. Ces deux

formes se trouvent dans les sites d'infection, de sorte qu'il est raisonnable de penser qu'elles contribuent ensemble à la pathogenèse. Par contre, la forme commensale se présente comme des blastoconidies. La transition de la forme levure à la forme hyphe est déclenchée par divers signaux environnementaux, tels que le sérum, la N-acétylglucosamine (GlcNAc), un pH neutre, une élévation de la température à 37°C, un milieu pauvre en nutriment, la présence de CO₂ et l'adhésion (Ernst, 2000 ; Cottier & Mühlischegel, 2009). Trois observations ont mené à l'hypothèse que la filamentation est nécessaire pour la virulence. Tout d'abord, certaines conditions de formation du filament (stimulation par une température à 37°C, par du sérum, par un pH neutre) correspondent à l'environnement de l'hôte. Deuxièmement, les filaments nouvellement formés (appelés tubes germinatifs) sont plus adhérents aux cellules mammifères que ne le sont les blastoconidies (l'adhésion est un préliminaire à la pénétration tissulaire). Troisièmement, les blastoconidies phagocytées par les macrophages peuvent produire des filaments capables de lyser les macrophages, fournissant un mécanisme d'évasion à ce mécanisme de défense de l'hôte (Mitchell, 1998). Ainsi des souches de *C. albicans* mutantes non filamenteuses injectées dans la veine de la queue d'une souris n'étaient pas virulentes (Lo et al., 1997). Plusieurs chercheurs ont discuté la possibilité de viser le dimorphisme comme cible thérapeutique en utilisant des molécules qui modulent la transition levure – hyphe (Shareck & Belhumeur, 2011 ; Jacobsen et al., 2012), parmi ces molécules, le farnésol que nous avons testé dans cette thèse comme modulateur de la formation du biofilm par *C. albicans*.

I.2.2. Adhésion

Sur les surfaces biotiques. L'adhésion sur les muqueuses ou sur la peau nécessite l'interaction entre la paroi de *C. albicans* et la surface biotique. La nature précise de l'adhésion de *C. albicans* aux surfaces biotiques est un processus complexe et multifactoriel. Initialement cette interaction peut être non-spécifique (par exemple, liaisons de van der Waals, liaisons hydrophobes). Une fois que ces événements initiaux ont permis le contact cellule - cellule, des interactions seront impliquées entre des récepteurs cellulaires et des protéines appelées adhésines sur la paroi de *Candida* ; l'expression de ces adhésines varie en fonction de l'état morphologique du champignon (*Olsen*, 1990 ; *Naglik et al.*, 2011 ; *Moyes et al.*, 2015 ; *van der Wielen et al.*, 2015).

Sur les surfaces abiotiques. *C. albicans* peut s'attacher (*Derengowski et al.*, 2009 ; *ten Cate et al.*, 2009) aux différents dispositifs médicaux tels que les prothèses et les implants dentaires, les cathéters, les valves cardiaques, les pontages vasculaires, les lentilles oculaires, ... provoquant des infections liées au dispositif. Ces matériels implantés se recouvrent rapidement d'une pellicule de protéines provenant de l'environnement direct.

I.2.3. Formation du biofilm

Un biofilm est une communauté de micro-organismes attachée à une surface formant des structures tridimensionnelles. Les biofilms comprennent une matrice extracellulaire et des cellules qui présentent des propriétés phénotypiques distinctes de celles des cellules isolées. *C. albicans* peut croître sur des surfaces en formant des biofilms (*Kumamoto & Vines*, 2005). La pathogénicité des

biofilms à *C. albicans* n'est plus contestée (Douglas, 2003 ; Mayer et al., 2013) : ces biofilms se forment sur les dispositifs médicaux implantés (cathéters, prothèses dentaires,...) et entraînent des infections qui sont particulièrement réfractaires à la thérapie antimicrobienne obligeant le retrait du matériel implanté (Hawser & Douglas, 1994 ; Chandra et al., 2001b).

Des expériences *in vitro* ont montré qu'un biofilm à *C. albicans* se forme en plusieurs étapes (Figure 2). La formation du biofilm commence par l'adhésion des blastoconidies à une surface (étape d'adhésion : *cfr supra* 1.2.2). Les blastoconidies prolifèrent sur la surface ; parfois elles produisent des tubes germinatifs qui se développent en formes filamenteuses (hyphes ou pseudo-hyphes). L'accumulation d'une matrice extracellulaire et l'acquisition de la résistance aux médicaments sont révélateurs de la maturité du biofilm qui recouvre la surface disponible puis croît en épaisseur (étape de maturation). Enfin, des cellules fongiques se détachent du biofilm dans le milieu (étape de dispersion). Au cours de la formation d'un biofilm naturel, ces étapes se produisent simultanément plutôt que de façon séquentielle (Chandra et al., 2001a ; Douglas, 2003 ; Blankenship & Mitchell, 2006).

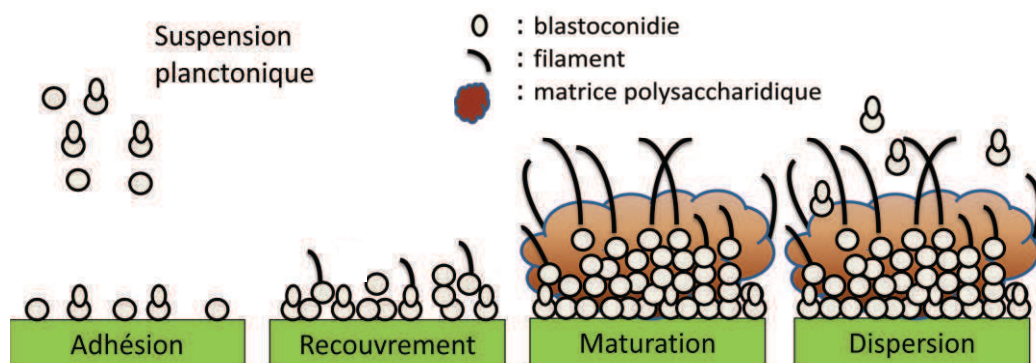


Figure 2. Etapes de formation *in vitro* d'un biofilm à *C. albicans* (inspiré de Finkel & Mitchell, 2011).

Le développement d'un biofilm à *C. albicans* est sous le contrôle de mécanismes moléculaires et cellulaires (*ten Cate et al.*, 2009 ; *Finkel & Mitchell*, 2011) : expression d'adhésines et dimorphisme. *C. albicans* en biofilms se caractérise par un phénotype distinct de celui exprimé en suspension et par une susceptibilité réduite aux antifongiques utilisés actuellement (polyènes, azoles, échinocandines,...) : les mécanismes de cette résistance sont encore mal compris (*Chandra et al.*, 2001b).

1.2.4. Sécrétion des aspartyl-protéinases (Sap)

Les aspartyl-protéinases constituent une famille de 10 enzymes protéolytiques (Sap1 à Sap10). Ces enzymes contribuent aux infections de la muqueuse et aux infections systémiques : elles sont impliquées dans l'adhésion, dans les dommages tissulaires et dans l'évasion à des réponses immunitaires de l'hôte. La protéine Sap2 est essentielle pour la croissance de *C. albicans* dans des milieux contenant des protéines. Les aspartyl-protéinases Sap1 et Sap3 sont exprimées lors de la transition morphologique, tandis que les protéines Sap4, Sap5 et Sap6 sont exprimées lors de la formation des hyphes. Sap1 à Sap6 ainsi que Sap9 et Sap10 sont impliquées dans le mécanisme d'adhésion aux cellules hôtes (*De Bernardis et al.*, 2001 ; *Naglik et al.*, 2003 ; *Naglik et al.*, 2004 ; *Schaller et al.*, 2005). Des études *in vivo* ont montré que *C. albicans* sécrète les Sap dans la salive (*Naglik et al.*, 1999) : ces enzymes pourraient jouer un rôle actif dans la progression des candidoses orales (*Wu & Samaranayake*, 1999). En effet, l'activité Sap observée dans des souches prélevées chez des personnes infectées était significativement plus élevée que celle observée dans des souches prélevées chez des personnes en bonne santé buccale (*Kuriyama et al.*,

2003). D'autre part, *C. albicans* en biofilms produit plus de Sap qu'en suspension planctonique (Mendes et al., 2007).

II. Les biofilms dans la cavité buccale

II.1. Généralités

La flore buccale humaine (Mouton & Robert, 1994; Marsh & Martin, 1999) est très complexe et diversifiée. Elle est constituée de plus de 500 espèces bactériennes, de levures, de mycoplasmes, de virus et très rarement de protozoaires. Les bactéries sont nombreuses et six milliards de nouvelles bactéries seraient produites en 1 ou 2 heures dans la bouche de chaque individu (Chardin et al., 2006). La coexistence d'un si grand nombre de micro-organismes dans un même habitat implique des relations entre eux faites d'antagonisme ou de mutualisme. La cavité buccale ne doit pas être limitée à un seul habitat au sens écologique du terme ; les surfaces muqueuses (jugales, gingivales, linguales), les surfaces dentaires supra-gingivales et sous-gingivales, les espaces interdentaires sont autant d'habitats différents dont les caractéristiques (récepteurs appropriés d'attachement, présence de nutriments, pH) permettent à certaines populations microbiennes d'être majoritaire sur un site et minoritaire sur un autre.

Dans la cavité buccale, les micro-organismes ne vivent pas isolés mais en biofilms, c'est-à-dire, comme défini plus haut, en communautés microbiennes structurées et complexes, souvent encapsulées dans une matrice extracellulaire polysaccharidique, attachées à des surfaces biotiques ou abiotiques.

L'organisation en biofilms permet aux micro-organismes de s'attacher pour ne pas être dégluti avec de la salive, de profiter ainsi d'échanges métaboliques, de résister aux défenses immunitaires de l'hôte et d'être moins sensibles aux antimicrobiens (*Chardin et al.*, 2006 ; *Mouton & Robert*, 1994). Les biofilms dentaires sont mieux connus sous le nom de « plaque dentaire ». Une surface dentaire nettoyée professionnellement par un dentiste se recouvre immédiatement par un film organique d'origine salivaire appelé : la pellicule exogène acquise (PEA) ou pellicule salivaire. La fixation des bactéries pionnières sur la PEA constitue l'étape initiale de la formation de la plaque dentaire. C'est un processus sélectif auquel participent des éléments de la surface bactérienne et des composants de la PEA (*Edgerton & Levine*, 1992 ; *Mouton & Robert*, 1994). *C. albicans* peut s'attacher : aux cellules épithéliales superficielles des muqueuses orales, aux dents, à des molécules salivaires qui forment la pellicule exogène acquise, à d'autres micro-organismes (co-adhérence) et aux biomatériaux placés en bouche tels que les prothèses dentaires (*Rotrosen*, 1986 ; *Cannon & Chaffin*, 1999).

II.2. Biofilms prothétiques à *C. albicans*

Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), connu en dentisterie sous le nom de résine acrylique, est un biomatériau qui sert à la fabrication des prothèses dentaires. *Candida* peut s'adhérer sur ce biomatériau (*Ahariz et al.*, 2010 ; *Courtois*, 2011). L'adhésion de *C. albicans* sur la prothèse dentaire est associée à la formation d'un biofilm prothétique. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* (*Radford et al.*, 1999 ; *Nett et al.*, 2010 ; *Susewind et al.*, 2015) ont révélées l'incorporation de *C. albicans* dans des biofilms aboutissant parfois à une

stomatite prothétique. Par définition, une stomatite prothétique (Figure 3) est une inflammation des muqueuses se marquant par de l'érythème, en particulier de la muqueuse palatine sous la prothèse supérieure : les patients peuvent se plaindre d'une sensation de brûlure, de malaise ou de mauvais goût, mais dans la majorité des cas, ils ne sont pas conscients du problème (*Webb et al.*, 1998 ; *Radford et al.*, 1999 ; *Ramage et al.*, 2004) . En plus, ces biofilms peuvent être un facteur de risque pour des candidoses invasives chez les personnes immuno-compromises. Toutefois, les données disponibles sont insuffisantes pour évaluer l'étiologie et de comprendre la pathogenèse de la stomatite prothétique associée à *Candida* (*Radford et al.*, 1999 ; *Budtz-Jørgensen*, 2000 ; *Ramage et al.*, 2004 ; *de Oliveira et al.*, 2010 ; *Gendreau & Loewy*, 2011).



Figure 3. Stomatite prothétique chez une patiente édentée porteuse d'une prothèse amovible supérieure. L'érythème correspond à l'intrados de la prothèse en résine.

Plusieurs auteurs ont suggéré que l'adhésion de *C. albicans* à la résine acrylique est en relation avec le caractère hydrophobe de la paroi du micro-organisme (*Samaranayake et al.*, 1995). D'autres insistent sur la rugosité de la résine

comme facteur favorisant l'adhésion (*Radford et al.*, 1999). Toutefois, d'autres études n'ont pas noté une augmentation du nombre de *C. albicans* adhérents sur une surface rugueuse de la résine (*Bürgers et al.*, 2009 ; *Koch et al.*, 2013). Les deux formes de *C. albicans* (levure et hyphe) ont été observées sur la résine (*Webb et al.*, 1998) ou sur de la poudre de titane (*Ahariz et al.*, 2010 : *cfr* Figure 4). Selon d'autres équipes, la rugosité de la surface augmente l'adhésion de *C. albicans* sous forme d'hyphe, tandis que, sous forme de levure, la rugosité de surface n'a pas d'effet lors de l'adhésion (*Mayahara et al.*, 2014 ; *Jackson et al.*, 2014). La modification des caractéristiques de surface de la résine acrylique par *coating* et photopolymérisation s'est avérée être une méthode efficace pour réduire l'adhésion de *C. albicans* (*Park et al.*, 2008 ; *Lazarin et al.*, 2014).

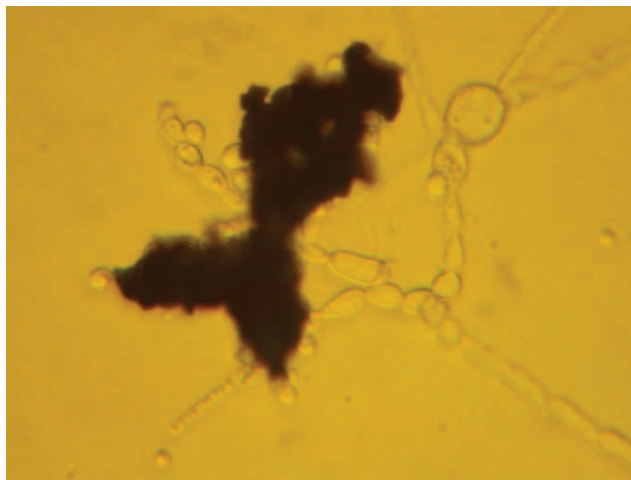


Figure 4. Dimorphisme de *C. albicans* sur poudre de titane (*Ahariz et al.*, 2010a).

In vivo, les micro-organismes ne se fixent pas nécessairement directement sur les surfaces de la prothèse, étant donné que ces surfaces sont toujours recouvertes de la pellicule salivaire à différents degrés de maturité (*Göcke et al.*,

2002). La caractérisation des interactions de *C. albicans* avec la résine et l'identification des composants salivaires qui jouent un rôle, sont complexes : les données de la littérature sont contradictoires (*Samaranayake et al.*, 1980 ; *Nikawa & Hamada*, 1990 ; *Edgerton & Levine*, 1992 ; *Holmes et al.*, 1995 ; *Radford et al.*, 1999 ; *Rodríguez Acosta et al.*, 2015). Ces observations contradictoires peuvent être dues aux origines (glandes parotides, sous-mandibulaires, sous-linguales ou accessoires) et aux méthodes de prélèvement variables des salives étudiées (*Edgerton et al.*, 1993 ; *Elguezabal et al.*, 2004).

La nature de la pellicule salivaire ou de sérum, la concentration et la source de carbone (sucres) dans l'environnement modulent probablement l'adhésion de *C. albicans* à la résine acrylique (*McCourtie & Douglas*, 1981 ; *Nikawa & Hamada*, 1990 ; *Nikawa et al.*, 1997 ; *Nikawa et al.*, 2000). Des biofilms à *C. albicans* formés sur le PMMA sont résistants aux agents antifongiques tels que le fluconazole, les nystatines, l'amphotéricine B et la chlorhexidine (*Chandra et al.*, 2001b). Un biofilm prothétique comprend un mélange mal défini de bactéries (telles que *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus aureus* et des bactéries à Gram négatif anaérobies) avec *Candida spp.* également apte à provoquer une inflammation de la muqueuse.

III. Biofilms à *C. albicans* et quorum sensing

III.1. Définition du quorum sensing

En biologie, on définit le *quorum sensing* (QS) comme la «perception du *quorum*», c'est-à-dire, l'ensemble des mécanismes qui permettent à des micro-organismes d'adapter leurs comportements en fonction de la densité de la

population grâce à des molécules de signalisation appelées auto-inducteurs ou molécules du *quorum sensing* (QSM). Ce phénomène permet la perception de la densité cellulaire dans une colonie de micro-organismes et l'adaptation de leurs comportements dans un environnement particulier par répression ou activation de différents gènes (Miller & Bassler, 2001 ; Hogan, 2006). *C. albicans* sécrète tout au long de sa croissance des QSM et, lorsque la densité cellulaire atteint un seuil critique, ces molécules en plus grande quantité dans l'environnement induisent des changements phénotypiques tels que des changements morphologiques (Cho *et al.*, 2010), la sécrétion de facteurs de virulence (Kruppa, 2009) et la formation de biofilms (Deveau & Hogan, 2011). Les molécules du *quorum sensing* de *C. albicans* modulent toutes les étapes des cycles de vie du biofilm (attachement, maturation et dispersion).

III.2. Molécules du *quorum sensing* chez *C. albicans*

Quatre types de molécules du *quorum sensing* ont été identifiées:

- le 2-phényléthanol et le tryptophol ont été décrits il y a plus de 40 ans : l'un est dérivé de la phénylalanine, l'autre du tryptophane. Ces molécules ont été appelées « auto-antibiotiques » (Lingappa *et al.*, 1969).
- la molécule MARS (*morphogenic autoregulatory substance*) citée en 1979 est toujours de structure inconnue (Hazen & Cutler, 1979).
- le farnésol (Hornby *et al.*, 2001) et son dérivé l'acide farnésique (Oh *et al.*, 2001) ont été détectés en 2001.
- le tyrosol présente un rôle dans le QS mis en évidence en 2004 (Chen *et al.*, 2004).

Le farnésol et le tyrosol sont les molécules les plus étudiées actuellement.

III.2.1. Tyrosol

Voie de biosynthèse du tyrosol. Le tyrosol (4-(2-hydroxyéthyl) phénol) est un dérivé de la tyrosine (Figure 5). Cette voie de synthèse du tyrosol comprend 3 étapes : 1) une désamination par une aminotransférase transforme la L-tyrosine en p-hydroxyphénylpyruvate, 2) ce produit est transformé en p-hydroxyphénylacétaldéhyde par intervention d'une décarboxylase, 3) puis réduit en tyrosol par une alcool déshydrogénase.

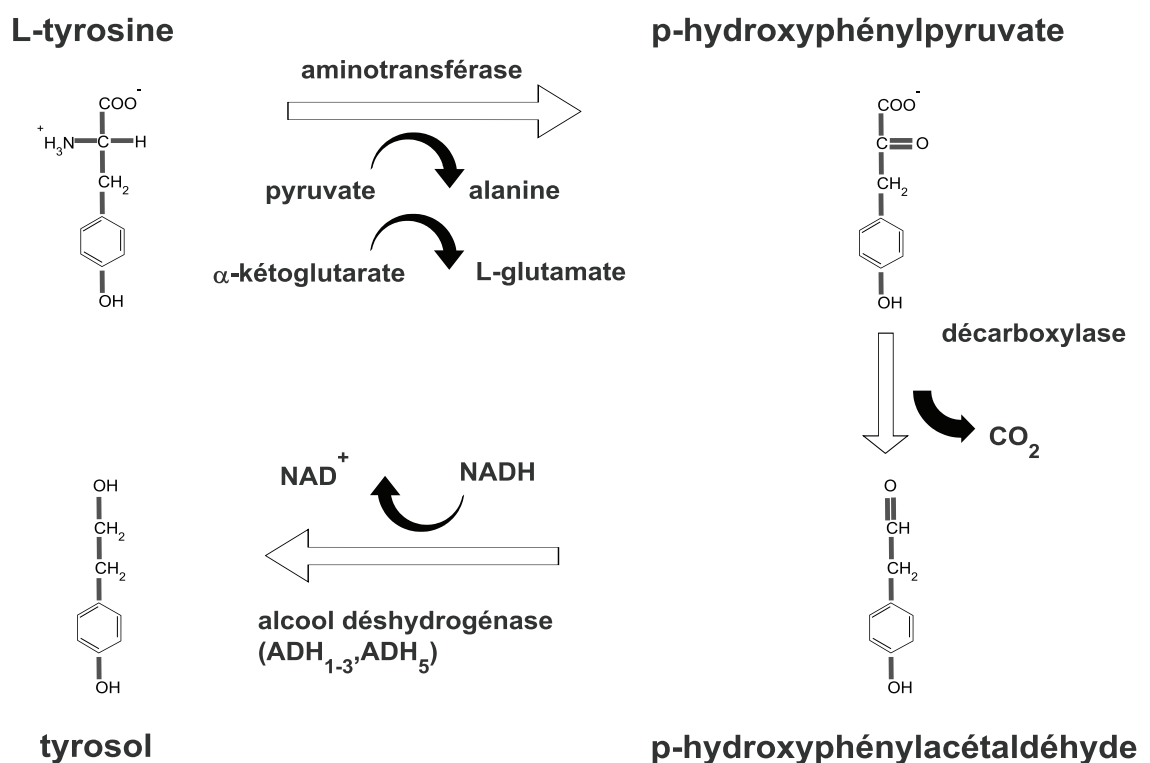


Figure 5. Biosynthèse du tyrosol (inspiré de <http://pathway.candidagenome.org>).

Rôle du tyrosol sur la prolifération de *C. albicans*. Un surnageant de culture de 24 heures est capable d'abolir la phase de latence d'une nouvelle culture de

C. albicans (Chen et al., 2004). Du tyrosol avait été alors mis en évidence dans le surnageant de la première culture : cependant, cette observation est insuffisante pour incriminer le tyrosol comme facteur de prolifération.

Rôle du tyrosol sur la filamentation. Le tyrosol accélère la formation des tubes germinatifs (Nickerson et al., 2006). Toutefois, la présence du tyrosol ne peut pas compenser l'effet du farnésol qui bloque la germination. Par conséquent, la régulation morphologique par le tyrosol est accessoire en comparaison de celle par le farnésol : cette molécule peut être considérée comme une QSM mineure dont l'influence n'est observée que lorsque la quantité du farnésol est faible ou absente dans l'environnement (Kruppa, 2009).

Rôle du tyrosol sur la formation du biofilm. Le tyrosol est rapporté inhiber la formation de biofilms à des concentrations supérieures à 4 mM (Alem et al., 2006).

III.2.2. Farnésol

Voie de biosynthèse du farnésol. Le farnésol (1-hydroxy- 3, 7, 11-triméthyl-2, 6, 10-dodecatriène) est un produit métabolique de la voie de synthèse mévalonate/stérol chez les eucaryotes. *C. albicans* synthétise (Figure 6) cette molécule à partir de la farnésyl pyrophosphate (Hornby et al., 2001 ; Hornby et al., 2003).

Rôle du farnésol vis-à-vis de *C. albicans*. En suspension, le farnésol est produit par les blastoconidies pour atteindre une concentration maximale (entre 10 et 50 μ M) lors de la phase stationnaire (Hornby et al., 2001). Cette augmentation progressive est corrélée avec un accroissement de la résistance au stress oxydatif par expression de superoxyde dismutase et de catalase

(Westwater *et al.*, 2005). Le farnésol empêche la formation du biofilm à *C. albicans* (Ramage *et al.*, 2002) : toutefois, le mécanisme reste inconnu.

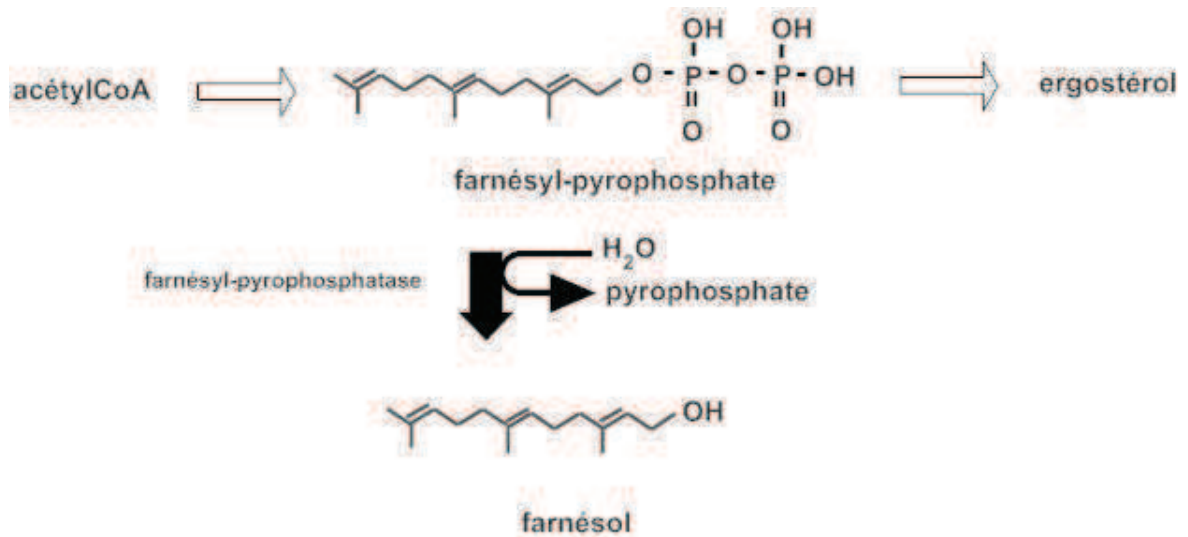


Figure 6. Biosynthèse du farnésol (inspiré de <http://pathway.candidagenome.org>).

Rôle du farnésol sur la filamentation. L'accumulation du farnésol bloque la transition levure – hyphes de *C. albicans* à fortes densités cellulaires sans influencer les taux de croissance cellulaire. Ceci a été confirmé par des études *in vitro* qui ont montré que le farnésol exogène inhibe la formation des tubes germinatifs qui est normalement déclenchée par le sérum, la proline ou la N-acétylglucosamine (Hornby *et al.*, 2001). Récemment, une étude suggère que le farnésol exogène (testé sur une souche *C. albicans* qui ne produit pas le farnésol de manière endogène) réprime la formation des hyphes par des changements morphologiques au niveau de la paroi de cette levure et par une répression de l'expression des aspartyl-protéinases (Décanis *et al.*, 2011). Bien que le farnésol bloque la formation des hyphes, il ne bloque pas l'élongation des hyphes préexistants (Mosel *et al.*, 2005).

Rôle du farnésol sur la formation du biofilm. De nombreux stades de développement du biofilm sont influencés par le farnésol : l'adhérence des cellules au substrat, l'architecture du biofilm mature et la dispersion des cellules du biofilm. Pour ces raisons, la compréhension des mécanismes d'action du farnésol pourrait conduire à la mise au point de nouveaux composés antifongiques qui ciblent les *C. albicans* organisés en biofilm. En raison de l'impact du farnésol sur la morphologie et de l'importance de la morphologie pour la formation du biofilm, il a été suggéré que le farnésol exogène affecte le développement du biofilm en réprimant la formation d'hyphes et l'expression de gènes spécifiques de la filamentation (Deveau & Hogan, 2011).

IV. Biofilms à *C. albicans* et protéines exocrines salivaires

La résistance des levures en biofilms aux antifongiques classiques a encouragé des scientifiques à explorer d'autres moyens pour inhiber *Candida* et de limiter leurs effets délétères liés à leurs biofilms. De très nombreux facteurs antimicrobiens sont présents dans l'environnement oral. Deux d'entre eux ont été particulièrement étudiés dans le cadre de cette thèse : le lysozyme et le système peroxydase.

IV.1. Lysozyme

Le lysozyme est une protéine non immunitaire innée présente dans toutes les sécrétions exocrines (sauf dans la sueur) et dans les phagocytes (Fleming, 1922 ; Fleming, 1932). Les urines et le liquide cérébro-spinal chez un individu en bonne santé n'en contiennent pas. Découverte en 1922 par Sir Alexander

Flemming, cette protéine contribue avec d'autres facteurs non immunitaires innés dans la salive au contrôle de la microflore buccale, préservant ainsi la santé de la muqueuse et des surfaces dentaires (*Epstein et al.*, 1984 ; *Vukosavljevic et al.*, 2011 ; *Fábián et al.*, 2012). Dans la cavité buccale, le lysozyme provient des glandes salivaires, essentiellement les glandes sous-maxillaires et sublinguales (*MacKay*, 1984 ; *Noble*, 2000), et des neutrophiles qui arrivent dans l'environnement buccal par le fluide gingival (*Brandtzaeg & Mann*, 1964) ou le liquide créviculaire dans le cas d'une parodontite (*Eisenberg et al.*, 1977 ; *Sakalauskiene et al.*, 2005). Les concentrations physiologiques du lysozyme dans la salive varient de 1 à 57 µg/ml (*Stuchell & Mandel*, 1983). Toutefois, il a été rapporté que le fluide de la plaque dentaire peut contenir jusqu'à 15 fois la quantité de lysozyme qui est présente dans la salive totale (*Samaranayake & MacFarlane*, 1988).

L'action antimicrobienne du lysozyme est médiée par son activité muramidase (*Phillips*, 1966) qui catalyse l'hydrolyse de la liaison N-acétyl-muramique / N-acétyl-glucosamine du peptidoglycane qui compose la paroi des bactéries à Gram positif (*Salton*, 1957 ; *Masschalck & Michiels*, 2003) et aussi par d'autres mécanismes non catalytiques encore mal décrits (*Ibrahim*, 2001).

Mode d'action du lysozyme vis-à-vis de *C. albicans*. Depuis plusieurs décennies, différentes études ont étudié l'effet du lysozyme sur les blastoconidies de *C. albicans*, mais les mécanismes d'action restent mal compris (*Kamaya*, 1969 ; *Kamaya*, 1970 ; *Marquis et al.*, 1982 ; *Samaranayake et al.*, 1993 ; *Nishiyama et al.*, 2001).

IV.2. Système peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation des (pseudo)halogénures en présence d'eau oxygénée pour former des ions hypo(pseudo)halogéneux. Un système peroxydase est une formulation galénique composée d'une peroxydase, d'un (pseudo)halogénure et de peroxyde d'hydrogène (ou d'un donneur de H_2O_2). *In vitro*, le peroxyde d'hydrogène est parfois remplacé par une séquence enzymatique (glucose / glucose oxydase) qui en présence d'oxygène produit H_2O_2 . Les peroxydases orales sont connues depuis plusieurs décennies comme facteurs innés non-immunitaires, qui sont sécrétés par les glandes salivaires (sialoperoxydase) ou libérés des neutrophiles (myéloperoxydase) ; les peroxydases sont aussi capables de contrôler la croissance du biofilm sur les surfaces buccales (*Ihalin et al.*, 2006 ; *Ahariz & Courtois*, 2010b). Les substrats de la peroxydase dans la cavité buccale sont le thiocyanate (SCN^-), sécrété dans la salive, et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit principalement par certains micro-organismes tels que les streptocoques. L'activité peroxydase dans la cavité buccale produit l'hypothiocyanite ($OSCN^-$), un oxydant puissant connu pour des effets antibactériens et antifongiques *in vitro* (*Carlsson*, 1987 ; *Thomas et al.*, 1994a,b). L'iodure est un autre substrat possible *in vitro* pour la production par la peroxydase orale de l'hypoiodite (OI^-), qui est caractérisé par une activité antimicrobienne à une concentration inférieure à celle de $OSCN^-$; cependant, la sécrétion d'iodure dans la salive se trouve être marginale par rapport à la sécrétion du thiocyanate (*Ferguson*, 1999). Différents auteurs ont proposé l'incorporation de systèmes peroxydasiques dans des produits d'hygiène buccale pour éviter des conséquences bucco-dentaires des germes cariogènes, des bactéries parodontopathogènes et la prolifération des

levures en biofilms buccaux. D'autres ont proposé d'utiliser les systèmes peroxydasiques chez les patients qui ont des problèmes d'halitose ou qui souffrent de sécheresse buccale (Städtler & Höller, 1992 ; Gil-Montoya *et al.*, 2008). Toutefois, leur efficacité *in vivo* n'a jamais été démontrée. Plusieurs critiques ont été émises ; 1°) le substrat H₂O₂ nécessaire à l'activité peroxydase peut être dégradé par les catalases microbiennes des biofilms oraux, 2°) les systèmes peroxydases contiennent des protéines potentiellement immunogènes (Tenovuo, 2002), 3°) les peroxydases sans substrats peuvent être des facteurs de croissance pour certaines espèces bactériennes anaérobies (Fadel & Courtois, 2001).

Les biofilms à *Candida* sont associés à des capacités anti-oxydantes importantes à cause d'une surexpression des protéines liées au stress oxydatif (Seneviratne *et al.*, 2008 ; Seneviratne *et al.*, 2010) . Toutefois, une étude *in vitro* a montré que le système iodure - peroxydase a un effet inhibiteur sur la formation du biofilm par *C. albicans*, à des concentrations inférieures du substrat H₂O₂ : ~ 200 fois moins que la quantité nécessaire en présence de SCN⁻ (Ahariz & Courtois, 2010b). D'autre part, le système iodure - peroxydase a un effet inhibiteur pendant des périodes plus longues que le système de thiocyanate - peroxydase lorsqu'on suit la formation de plaque dentaire après un seul bain de bouche (Vanden Abbeele *et al.*, 1996). Enfin, une autre étude a montré que la peroxydase conserve son effet anti-biofilm après son adsorption sur le titane, un biomatériau utilisé en implantologie (Ahariz & Courtois, 2010a).

OBJECTIFS DE LA THESE

HYPOTHESES

1. Vu l'observation que le farnésol empêche la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphes (*Hornby et al.*, 2001) ainsi que la formation du biofilm (*Ramage et al.*, 2002), l'intérêt de l'utilisation de cette molécule en thérapeutique a été évoqué (*Ramage et al.*, 2002 ; *Shchepin et al.*, 2003 ; *Shareck et al.*, 2011 ; *Albuquerque & Casadevall*, 2012). Une étude a montré que la combinaison du farnésol et du fluconazole réduit la concentration minimale inhibitrice de ce dernier et inhibe le développement de résistance chez des souches de *C. albicans* connues pour leur résistance vis-à-vis de cet antifongique (*Yu et al.*, 2012). Ce même effet a aussi été démontré sur *C. dubliniensis* (*Jabra-Rizk et al.*, 2006). D'autres auteurs ont montré que le farnésol réduit l'épaisseur du biofilm à *C. albicans* (*Yu et al.*, 2012). Très récemment, une étude *in vitro* a montré une synergie significative entre le farnésol et trois antifongiques différents : la micafungine, le fluconazole et l'amphotéricine B contre les biofilms à *C. albicans* (*Katragkou et al.*, 2015).

2. Le tyrosol à faible concentration stimule la production des hyphes durant les premiers stades de formation du biofilm à *C. albicans* (*Alem et al.*, 2006). A forte concentration, le tyrosol a réduit la formation du biofilm à *C. albicans* (*Cordeiro et al.*, 2015). La combinaison du tyrosol à d'autres antifongiques (amphotéricine B, l'itraconazole, et le fluconazole) a montré un effet synergique sur les biofilms à *C. albicans* et *C. tropicalis* (*Cordeiro et al.*, 2015).

3. Les antimycosiques doivent être réservés au traitement des patients infectés : ils sont moins actifs contre les biofilms à *Candida sp.* que sur les levures en suspension et ils pourraient provoquer l'apparition de souches résistantes s'ils sont appliqués tous les jours sur les prothèses dentaires pour prévenir la colonisation par les levures.

4. L'utilisation de molécules des sécrétions exocrines salivaires dont le lysozyme, est une voie de recherche prometteuse. Plusieurs études ont montré un rôle bénéfique du lysozyme en formulation galénique (*Tenovuo*, 2002 ; *Gil-Montoya et al.*, 2008 ; *Güneri et al.*, 2009). Ces molécules sont surtout proposées en prophylaxie plutôt qu'en curatif.

5. Des études *in vitro* ont montré que les systèmes peroxydases inhibent la croissance planctonique de *C. albicans* (*Majerus & Courtois*, 1992) et réduisent le développement de biofilms de cette levure (*Ahariz & Courtois*, 2010). Toutefois, la disponibilité de H₂O₂ (substrat de la peroxydase) est un facteur limitant de ce système.

OBJECTIFS

Une meilleure compréhension de la formation des biofilms à *Candida* en présence de molécules du *quorum sensing* et de leur contrôle par des facteurs antimicrobiens des sécrétions exocrines peut conduire au développement de nouvelles approches prophylactiques. Le projet développé conjointement à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen (Algérie) et à l'Université Libre de Bruxelles (Belgique) avait pour but : 1°) d'étudier le rôle des molécules du *quorum sensing* sur la formation des biofilms à *C. albicans*, 2°) d'étudier le développement de biofilms à *C. albicans* en présence de différents systèmes antimicrobiens présents dans les sécrétions exocrines comme la salive (lysozyme, peroxydases), 3°) de conclure avec une étude clinique pour tester l'effet anti-biofilm d'une molécule préalablement testée *in vitro* et jugée la plus prometteuse.

PLAN DE TRAVAIL

Le travail a comporté trois parties :

- une mise au point préalable de la production *in vitro* de biofilms à *C. albicans* sur différents matériaux (polystyrène, résine) avec quantification et analyse de leurs architectures,
- une évaluation *in vitro* de l'effet des molécules du *quorum sensing* et de protéines exocrites sur la formation de biofilms à *C. albicans*,
- une étude clinique pour évaluer *ex vivo* la décontamination de prothèses dentaires par la molécule jugée la plus prometteuse dans les tests *in vitro*.

Chaque partie est réalisée sur une souche de collection bien caractérisée *C. albicans* ATCC 10231 - souvent utilisée dans l'étude des antifongiques - et sur des souches cliniques isolées de prothèses dentaires.

COLLABORATION

Le laboratoire de Bruxelles avait une expérience de travaux en collaboration avec l'industrie, tout particulièrement concernant l'utilisation des peroxydases pour des applications bucco-dentaires et concernant la production de biofilms sur titane. Le laboratoire de Tlemcen avait une expérience dans l'isolement, l'identification et la détection de biofilms fongiques sur surfaces inertes dans des échantillons cliniques ; le laboratoire de Tlemcen avait aussi une expérience dans l'évaluation de la sensibilité des levures isolées (planctoniques et sessiles) aux antifongiques utilisés en milieu hospitalier. En effet, un projet national sur la détection de biofilms fongiques sur dispositifs médicaux dans différentes structures hospitalières de l'Ouest algérien était en cours au moment de la conception de ce projet de thèse. En parallèle, une

collaboration avait été entreprise avec le laboratoire des biofilms dirigé par Monsieur Djeribi Ryad de l'Université Badji Mokhtar de Annaba (Est algérien) pour répertorier les infections nosocomiales fongiques en Algérie.

REPARTITION DU TRAVAIL

Les mises au point sur la souche de collection ATCC 10231 ont été réalisées à Bruxelles. Les souches cliniques furent prélevées à Tlemcen pour les investigations *in vitro* et à Bruxelles pour une étude clinique *ex vivo*.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel biologique : *Candida albicans*

I.1.1. Cultures de *Candida*

Les levures ont été cultivées en aérobiose à 37°C en milieu liquide (bouillon de Sabouraud : OXOID™ CM147, Basingstoke, UK) ou sur milieu solide (gélose Sabouraud avec chloramphénicol et gentamicine : BD Diagnostics™, Erembodegem, Belgique). Toutes les investigations *in vitro* ont été réalisées sur un 3^{ème} repiquage. Le milieu liquide contient du glucose (20 g/l), des peptones provenant d'un hydrolysate tryptique de caséine (5 g/l) et d'un hydrolysate peptique de viande (5 g/l). Le milieu solide contient du glucose (40 g/l), des peptones (10 g/l) et de l'agar (15 g/l) additionné de chloramphénicol (0,4 g/l) et de gentamicine (0,04 g/l). Le pH de ces deux milieux à température ambiante est de $5,6 \pm 0,2$.

I.1.2. Souches de levures

Les investigations pour cette thèse ont été réalisées sur une souche de collection pour les mises au point et sur des souches cliniques prélevées sur l'intrados de prothèses dentaires amovibles.

Souche de référence. La souche de collection *Candida albicans* ATCC 10231 est commercialisée sous forme de Culti-loops™ (Thermo™, Lenexa, KS, USA). Les Culti-loops sont des œses prêtes à l'emploi pour un usage unique et chargées de gélatine contenant la souche de micro-organismes à étudier. Après déballage près d'une flamme, l'œse est appliquée sur une surface de gélose de Sabouraud avec chloramphénicol et gentamicine (Becton Dickinson™, Aalst, Belgique) pour réhydratation pendant 15 secondes, puisensemencée sur cette gélose. Cette

opération est répétée pour chaque face de l'œse. Dans un deuxième temps, l'œse est appliquée puis piquée dans la gélose d'une 3^{ème} gélose avant d'être ensemencée. L'opération est répétée en inversant l'œse. Cette méthode permet d'avoir un premier repiquage (R₁) réparti en 4 boîtes de Petri qui seront repiquées en pentagone (R₂) sur plusieurs boîtes de Petri par la technique d'isolement et conservées à 4°C. Dans le cadre de cette thèse, un troisième repiquage (R₃) sera réalisé la veille de chaque expérience par ensemencement massif. L'*American Type Culture Collection* recommande de ne pas dépasser 5 repiquages pour le contrôle de qualité des procédures de stérilisation. Bien que n'étant pas d'origine orale (mais bronchique), cette souche de référence a été choisie parce qu'elle a été utilisée par certains auteurs (*Blanco et al.*, 1992) pour tester des antifongiques.

Souches cliniques. Les souches cliniques proviennent d'écouvillonnages de prothèses dentaires à l'aide de cotons-tiges stériles (Eurotubo[®], Deltalab[™], Espagne). Tous les patients ayant accepté de participer à cette étude remplissaient un questionnaire sur les caractéristiques de la prothèse et sur leurs habitudes d'hygiène. Cette collecte fut réalisée à Tlemcen pour la partie *in vitro* et à Bruxelles pour un essai clinique de décontamination *ex vivo* de prothèses dentaires. Les écouvillonnages au Service de prothèse dentaire du CHU de Tlemcen ont été réalisés après approbation des autorités académiques en accord avec la législation algérienne. Des écouvillonnages furent réalisés à Bruxelles par un étudiant dentiste sur des patients recrutés à l'Hôpital Erasme (ULB, Bruxelles, Belgique) en consultation de prothèses ou dans le département de gériatrie : le protocole de cette étude clinique a été approuvé le 22/10/2015 par le Comité d'Ethique Erasme-ULB sous le numéro P2015/413. Après écouvillonnage de l'intrados des prothèses, les écouvillons furent ensemencés sur une gélose ChromAgar[®] (Becton Dickinson[™],

Aalst, Belgique) qui colore spécifiquement les 3 principales espèces de levures du genre *Candida* trouvées dans la cavité orale (Odds, 1994). Les colonies de *C. albicans* sont ainsi repérées par une coloration vert-turquoise sur ce milieu. *C. tropicalis* donne sur gélose CHROMAgar™ des colonies bleues, *C. krusei* des colonies couleur prune de grande taille avec un relief irrégulier, *C. glabrata* des colonies roses / blanches et toutes les autres espèces des colonies blanchâtres. Des tests supplémentaires comme le test de filamentation dans le sérum animal, la recherche de chlamydoconidies sur milieu RAT (*Rice Extract Agar*) avec Polysorbate 80 (Becton Dickinson™, Aalst, Belgique) et des tests biochimiques sur Galerie API® 20 C AUX (BioMérieux™, Lyon, France) permirent une identification de l'espèce de *Candida*. Les souches isolées sur milieu ChromAgar™ furent ensemencées en pentagone par la technique d'isolement puis conservées à 4°C (équivalent du R₂ pour la souche ATCC de référence).

I.1.3. Comptage des levures

Toutes les investigations furent réalisées sur un repiquage R₃ préparé la veille de chaque expérience afin de standardiser l'âge et le potentiel métabolique de la souche. Le jour de l'expérience, la suspension de levures est ajustée à la concentration voulue soit par comptage des blastoconidies au microscope dans une cellule de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Allemagne), soit par turbidimétrie (lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 600 nm). Pour certaines expériences, le nombre de cellules a été déduit *a posteriori* du nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) après ensemencement de dilutions en série sur des milieux solides de Sabouraud. Le Tableau I présente les données obtenues par 2 méthodes de comptage effectuées simultanément sur les suspensions de *C.*

albicans (ATCC 10231 ou souches cliniques) après l'ajustement opacimétrique (600 nm) à 0,800. Pour les suspensions de la souche de référence ATCC 10231, le comptage microscopique direct de blastoconidies (bl) dans une cellule de Neubauer et celui des CFU après culture sur Sabouraud milieu solide indiquait $21,4 \pm 0,9 \times 10^6$ bl/ml (N = 12) et $13,0 \pm 0,8 \times 10^6$ CFU/ml (N = 12) respectivement. Les 2 procédures fournissaient ainsi des données significativement différentes (test t apparié, $p < 0,0001$). Pour les suspensions de *C. albicans* isolées à partir de prothèses dentaires, les comptages microscopiques et ceux des CFU étaient plus proches : $22,9 \pm 1,1 \times 10^6$ bl/ml (N = 7) et $19,5 \pm 1,4 \times 10^6$ CFU/ml (N = 7) respectivement (test t apparié : NS, $p = 0,0814$). Le comptage direct par microscopie des suspensions de la souche de référence (ajustées à une absorbance de 600 nm de 0,800) fournissait ainsi des données similaires pour les souches cliniques préparées de la même manière (test t non apparié : NS, $p = 0,3243$). Cependant, le comptage des CFU dans des suspensions ajustées à 0.800 est significativement plus faible pour la souche de référence que pour les souches cliniques (test t pairé, $p = 0,0003$). Par conséquent, le rapport comptage microscopique / comptage CFU était de $1,72 \pm 0,12$ (N = 12) pour la souche de référence et $1,21 \pm 0,12$ (N = 7) pour les souches cliniques : cette différence est significative (test t de Student non pairé, $p = 0,0125$).

La figure 1 montre que la relation mathématique entre l'absorbance à 600 nm et le nombre de blastoconidies dans une suspension correspond à une hyperbole rectangulaire d'équation $y = 4,5x / 98,7 + x$ ($r = 0,9985$). Dans ces expériences (N = 3), la dilution 20 fois d'une suspension contenant 20×10^6 blastoconidies par ml a diminué l'absorbance à 600 nm de $0,813 \pm 0,007$ à $0,049 \pm 0,002$, soit dans un rapport de 16,7. Une série supplémentaire d'expériences (N = 6) a confirmé ce

ratio : la dilution 20 fois de la suspension de *Candida* a diminué la densité optique de la suspension de $0,794 \pm 0,007$ à $0,048 \pm 0,002$ (soit dans un rapport de 16,5). La figure 2 montre la variation du nombre de blastoconidies (exprimée en pourcentage de la valeur initiale) après 30 à 180 minutes d'incubation dans de l'eau versus bouillon de Sabouraud. Dans l'eau, le nombre de blastoconidies après 30 min représente $95,2 \pm 6,4\%$ de la quantité initiale (N = 6) et $113,9 \pm 8,1\%$ (N = 6) après 150 min. Dans le bouillon, le nombre des blastoconidies varie entre $107,0 \pm 5,2\%$ (N = 6) à 60 min et $131,3 \pm 10,4\%$ (N = 6) à 180 min. Les données observées dans l'eau sont restées dans la plage de la moyenne \pm SEM pendant 180 min. Néanmoins, dans le bouillon, les données de comptage ne sont restées dans la même plage que pendant 90 min ; au-delà de cette période, une élévation du nombre de blastoconidies témoigne de l'amorçage d'une croissance.

	comptage microscopique des blastoconidies (10^6 bl/ml)	comptage des colonies (10^6 CFU/ml)
ATCC 10231	$21,4 \pm 0,9$ (N = 12)	$13,0 \pm 0,8$ (N = 12)
souches cliniques	$22,9 \pm 1,1$ (N = 7)	$19,5 \pm 1,4$ (N = 7)

Tableau I. Comparaison de 2 méthodes différentes de comptage de suspensions de *Candida* dans de H₂O ajustées à 0,800 d'absorbance à 600 nm pour la souche ATCC 10231 et des souches cliniques. Les données sont exprimées en millions de blastoconidies ou de CFU par ml (moyenne \pm SEM).

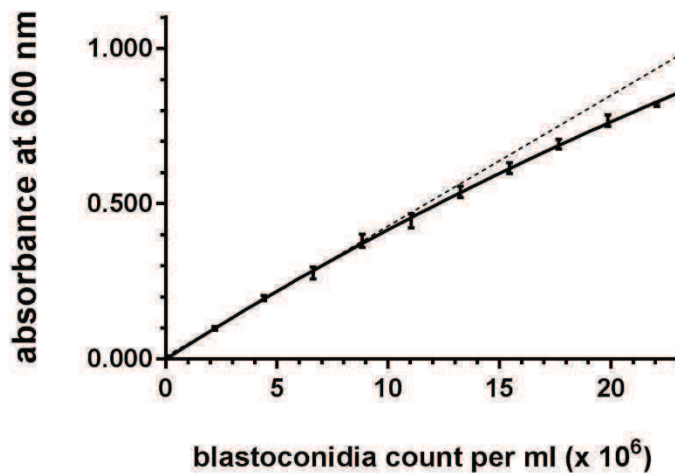


Figure 1. Relation entre absorbance et comptage de blastoconidies (les résultats sont exprimés en 10^6 cellules / ml). Les barres d'erreur dans ce graphe indiquent la déviation standard (N = 3).

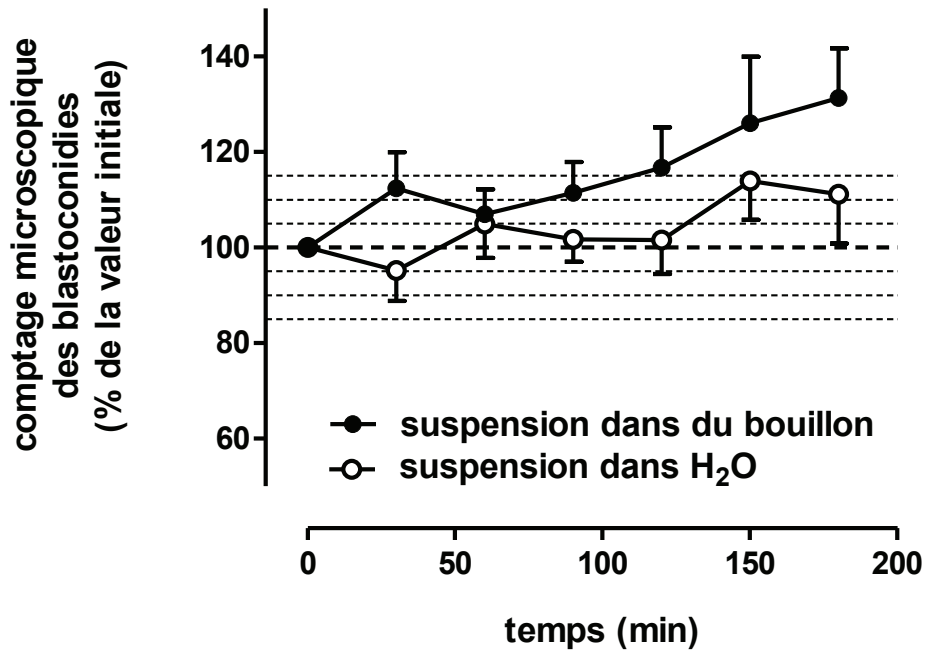


Figure 2. Evolution du nombre de blastoconidies d'une suspension dans H₂O *versus* dans du bouillon de Sabouraud au cours du temps (min) à température ambiante. Les données sont exprimées en % de la valeur initiale (moyenne \pm SEM, N = 6).

1.1.4. Caractéristiques des patients appareillés

Le Tableau II et la Figure 3 présentent la répartition selon le genre et la distribution des âges des patients appareillés dont la prothèse dentaire a été écouvillonnée pour recherche de *Candida*.

	femmes	hommes
N (\leq 40 ans)	2	2
N (41 - 50 ans)	12	4
N (51 - 60 ans)	25	17
N (61 - 70 ans)	9	13
N (\geq 71 ans)	2	8
âge (moyenne \pm SD)	54,5 \pm 10,3	60,5 \pm 10,9
âge (médiane)	55,0	59,5
nombre total	50	44

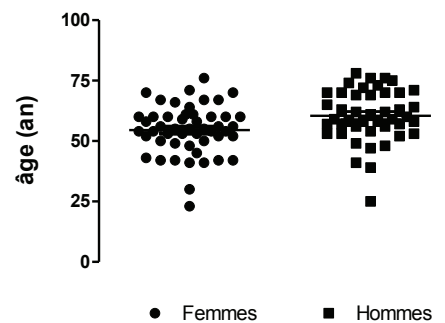


Tableau II. Données socio-anthropométriques des patients de Tlemcen.
Figure 3. Age des porteurs d'une prothèse dentaire à Tlemcen.

L'âge moyen de 94 patients inclus dans cette étude est $57,3 \pm 10,9$ ans. La comparaison de l'âge des femmes à celui des hommes a montré une différence significative (test t de Student non pairé : $p = 0,0077$).

Les Tableaux III et IV résument les données de l'examen bucco-dentaire des patients appareillés à Tlemcen, des observations concernant leur prothèse amovible ainsi que les méthodes d'hygiène utilisées. Il faut noter que 13,9% des patients présentaient l'érythème des muqueuses.

bilan bucco-dentaire des patients enrôlés	
rien à signaler	66
érythème	11
ulcération	2
total des patients examinés	79

description de la prothèse supérieure	
partielle en résine	15
complète en résine	76
total des prothèses examinées	91

Tableau III. Bilan bucco-dentaire des patients enrôlés et description des prothèses testées.

méthode de nettoyage de la prothèse	nombre de patients <i>Candida</i> positif	nombre de patients <i>Candida</i> négatif
rinçage dans l'eau	14 (34,1%)	1 (7,1%)
brossage à l'eau	5 (12,2%)	5 (35,7%)
brossage au dentifrice	12 (29,3%)	4 (28,6%)
pastille effervescente	0 (0,0%)	2 (14,3%)
bain de bouche	0 (0,0%)	1 (7,1%)
autre (javel, bicarbonate, sel de table, savon)	10 (24,4%)	1 (7,1%)
total des patients interrogés	41 (100,0%)	14 (100,0%)

Tableau IV. Bilan des méthodes de nettoyage des prothèses testées par les patients enrôlés. Un test exact de Fisher (variante du test X^2 indiqué pour les petits échantillons) ne montre aucune association entre une technique d'hygiène et l'absence de contamination par *Candida* ($p > 0,05$).

Les caractéristiques des patients édentés enrôlés dans l'étude clinique menée à Bruxelles seront détaillées dans la section *résultats*.

I.1.5. Données mycologiques

Colonisation des prothèses dentaires par des levures. Le taux de colonisation des prothèses est de 68,1% chez les patients examinés en consultation au Service de prothèse du CHU de Tlemcen (N = 94). Le Tableau V montre, sur un groupe de 87 prothèses dentaires, l'absence d'une relation entre l'âge de la prothèse et la contamination par *Candida*.

↓ âge de la prothèse (an)	nombre de prothèse (N, % de classe)		
	<i>Candida</i> positif	<i>Candida</i> négatif	total
0 - 5	23 (62,7%)	14 (37,8%)	37 (100,0%)
6 - 15	15 (65,2%)	8 (34,8%)	23 (100,0%)
16 - 30	18 (78,3%)	5 (21,7%)	23 (100,0%)
31 - 45	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4 (100,0%)
pas de données	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
total :	64 (68,1%)	30 (31,9%)	94 (100,0%)

Tableau V. Age des prothèses écouvillonnées et contamination par *Candida* (test X^2 : NS, $p = 0,4958$).

Identification des souches de *Candida*. Les prothèses examinées avaient étéensemencées soit sur milieu solide de Sabouraud soit sur milieu CHROMagar. Dans la première série (N = 42), le taux de contamination par *Candida* était de 76,2% tandis que dans une seconde série (N = 52), il était de 61,5%. Sur 32 prothèses contaminées par *Candida* qui avaient directement étéensemencées sur CHROMagar™, 22 (68,7%) montrent une contamination *monospecies* (une seule espèce de levure sur base de la couleur des colonies macroscopiques sur milieu CHROMagar™), les 10 prothèses (31,2%) restantes montrent une contamination *plurispecies* (2 ou 3 espèces de levures différentes). Le Tableau VI résume ces données.

	nombre de prothèses
nombre de prothèses étudiées	52
nombre de prothèses <i>Candida</i> +	32 (61,5%)
contamination <i>monospecies</i>	22 (68,7%)
contamination <i>plurispecies</i>	10 (31,2%)

Tableau VI. Comparaison du portage de *Candida*.

C. albicans est retrouvé dans 56,3% des prothèses dont la culture était positive (N = 32), *C. glabrata* dans 18,8% et *C. tropicalis* dans 6,3% (Tableau VII).

CHROMAgar positif pour ...	nombre	(%)
... <i>Candida albicans</i>	18	56,3
... <i>Candida glabrata</i>	6	18,8
... <i>Candida tropicalis</i>	2	6,3
espèces non identifiées	19	59,4
total	45	100,0

Tableau VII. Fréquence des espèces de *Candida* identifiées chez 32 porteurs d'une prothèse contaminée (ensemencement direct sur CHROMAgar™).

I.2. Analyses microscopiques

Les techniques conventionnelles d'observation au microscope (modèle Leica DM2000, Leica™, Wetzlar, Allemagne) ont été utilisées pour la préparation et le suivi des manipulations. Au microscope photonique, *C. albicans* en suspension est sous la forme de cellules bourgeonnantes appelées blastoconidies (5 µm de diamètre). La vitalité des structures mycétales a été analysée par fluorescence avec du diacétate de fluorescéine (Sigma-Aldrich™, St-Louis, MO, USA) et du bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich™, St-Louis, MO, USA). Des solutions fraîches de diacétate de fluorescéine (FDA) (5 mg/ml dans l'acétone) et de bromure d'éthidium (EB) (5 mg/ml dans une solution saline tamponnée au phosphate) ont été diluées séparément 100 fois dans du PBS, puis mélangées dans un rapport 1:1. Une goutte

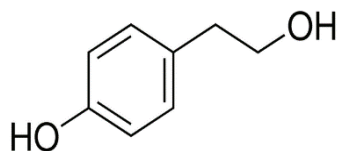
de la solution contenant les fluorochromes et une goutte de la suspension de levures ont été mélangées sur lame. L'examen microscopique était pratiqué après une incubation de 15 min à 37°C. La fluorescence verte correspond aux cellules vivantes et la fluorescence de couleur orange aux cellules non vivantes. Un tel essai fut effectué sur une suspension de *C. albicans* ATCC 10231 avant (100% de blastoconidies vivantes) et après une incubation de 30 min à 80°C (100% de cellules mortes). Ce test fut aussi réalisé sur des prélèvements de biofilm à *Candida*.

I.3. Molécules du *quorum sensing*

L'effet de 2 molécules du *quorum sensing* - tyrosol et farnésol - sur la formation des biofilms à *Candida* a été investigué *in vitro* sur la souche de référence ATCC 10231 et sur des souches cliniques isolées à partir de prothèses dentaires. Le tyrosol est soluble dans l'eau (seuil de solubilité : 25,3 mg/ml) tandis que le farnésol ne l'est que très peu (seuil de solubilité : 0,3 mg/ml).

I.3.1. Tyrosol

Le tyrosol (4-(2-hydroxyéthyl)phénol, C₈H₁₀O₂, PM : 138,16 g/mol) provenait de Sigma-Aldrich™, St-Louis, MO, USA. Cette molécule se trouve en quantité abondante dans l'huile d'olive.

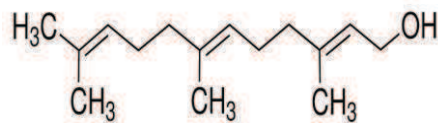


Formule 1. Tyrosol (repris de la notice Sigma™).

Différentes concentrations finales (de 1 à 20 mM) en tyrosol ont été réalisées à partir d'une pesée de 442,11 mg mis en solution dans 20 ml (160 mM).

I.3.2. Farnésol

Le farnésol (*trans, trans*-3,7,11-Triméthyl-2,6,10-dodecatriène-1-ol, C₁₅H₂₆O, PM : 222,37 g/mol, densité : 0,879 g/ml) provenait de Sigma-Aldrich™, St-Louis, MO, USA. Liquide et très peu soluble dans l'eau, cette molécule a été préparée dans du DMSO 1%. Différentes concentrations finales - de 0,001 à 3 mM - en farnésol furent réalisées à partir d'une solution obtenue par pipetage de 50 µl de réactif dans 8,185 ml de DMSO 1% (24 mM).



Formule 2. Farnésol (repris de la notice Sigma™).

La Figure 4 montre que le DMSO n'inhibe pas la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 pour des concentrations finales comprises entre 0,1 et 2,5% (vol/vol). L'accroissement de l'absorbance à 600 nm d'un milieu liquide de Sabouraud en présence de DMSO n'est pas statistiquement différent de celui observé en absence de DMSO (test t de Student non pairé, $p = 0,4573$, $N = 16$). La croissance est partiellement inhibée en présence de DMSO 7,5% et totalement en présence de DMSO 10%. D'autre part, les ensemencements sur gélose de milieu liquide des puits avec les deux concentrations les plus élevées en DMSO ont montré une quasi absence de colonies (CFU). En présence de DMSO 10%, la croissance était nulle (concentration minimale inhibitrice) et aucune CFU n'était visible (concentration minimale létale) après culture sur milieu solide de Sabouraud.

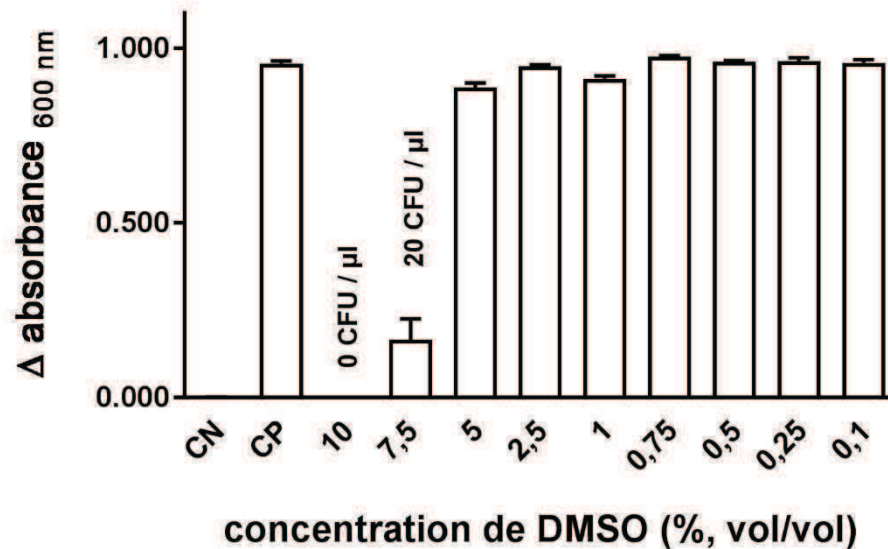


Figure 4. Effet du DMSO sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 (volume total 250 μ l ; $0,25 \times 10^6$ blastoconidies par puits). CN : contrôle négatif, CP : contrôle positif.

I.4. Molécules exocrines salivaires

I.4.1. Lysozyme

Le lysozyme (Sigma-Aldrich™, St Louis, MO, USA) a été purifié à partir du blanc d'œuf de poule. Les principales caractéristiques de la protéine sont : masse moléculaire : 14 307 Da ; point isoélectrique (pI) : 11,35 ; activité du lysozyme : $\geq 40,000$ unités/mg de protéine. Une unité produira un changement de A_{450} 0,001 par minute à pH 6,24 à 25 °C, en utilisant une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* comme substrat, dans 2,6 ml de mélange réactionnel (trajet lumineux : 1 cm). L'activité du lysozyme est une fonction du pH et force ionique. L'enzyme est active sur une large gamme de pH (6,0 - 9,0). A pH 6,2, l'activité maximale est observée sur une plus large gamme de forces ioniques (de 0,02 - 0,10 M) qu'à un pH de 9,2 (0,01 - 0,06 M). Différentes concentrations finales (de 3 μ g/ml à 1 mg/ml) en lysozyme ont été réalisées à partir d'une première pesée de 10 mg de la protéine mise en solution dans 1 ml de bouillon de Sabouraud.

I.4.2. Système peroxydase

On appelle «système peroxydase» une formulation galénique comprenant une peroxydase (le plus souvent la lactoperoxydase proche de la peroxydase salivaire), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou d'une séquence enzymatique en produisant par exemple la séquence glucose (G) / glucose oxydase (GOD) et d'un substrat à oxyder comme un halogénure (Cl^- , I^- , Br^-) ou un pseudohalogénure (SCN^-).

- La lactoperoxydase (Taradon™, Bruxelles, Belgique) a été purifiée à partir de lait bovin ; indice de pureté (mesuré par le ratio des absorbances 412 nm / 280 nm) : 0,60 ; activité spécifique : 600 unités ABTS par mg de protéines à 37°C à pH 5,00 (une unité ABTS correspond à la quantité d'enzyme catalysant l'oxydation de 1000 μ moles du substrat ABTS en une minute dans des conditions standardisées, *Mansson-Rahemtulla et al.*, 1988). Des sachets contenant de la lactoperoxydase adsorbée sur des particules inertes d'argile ont été fournies aussi par la firme Taradon™.
- H_2O_2 ~35% (Perhydrol®, Merck™, Darmstadt, Allemagne).
- Iodure de potassium (KI, PM : 166,0 g/mol), (Merck™, Darmstadt, Allemagne).
- Thiocyanate de potassium (KSCN, PM : 97,2 g/mol), (Merck™, Darmstadt, Allemagne).

I.4.3. Préparation d'une solution d'oxydants $OSCN^-/OI^-$

Préparation de la solution oxydante. Un sachet contenant de la lactoperoxydase (50 mg) adsorbée sur des billes inertes d'argile (100 mg) est immergé dans du tampon phosphate (0,1 M à pH 7,4). Les substrats de l'enzyme sont ajoutés à savoir : 856 mg de KI (5,2 mM final) et de 116,4 mg de KSCN (1,2 mM final) puis un volume de 550 μ l de Perhydrol™ (5,5 mM final) est ajouté au goutte à goutte,

sous agitation pendant 1 minute. Le sachet est ensuite retiré et la solution peut se conserver à 4°C pendant plusieurs semaines. La Figure 5 décrit le dispositif expérimental (Bafort *et al.*, 2014).

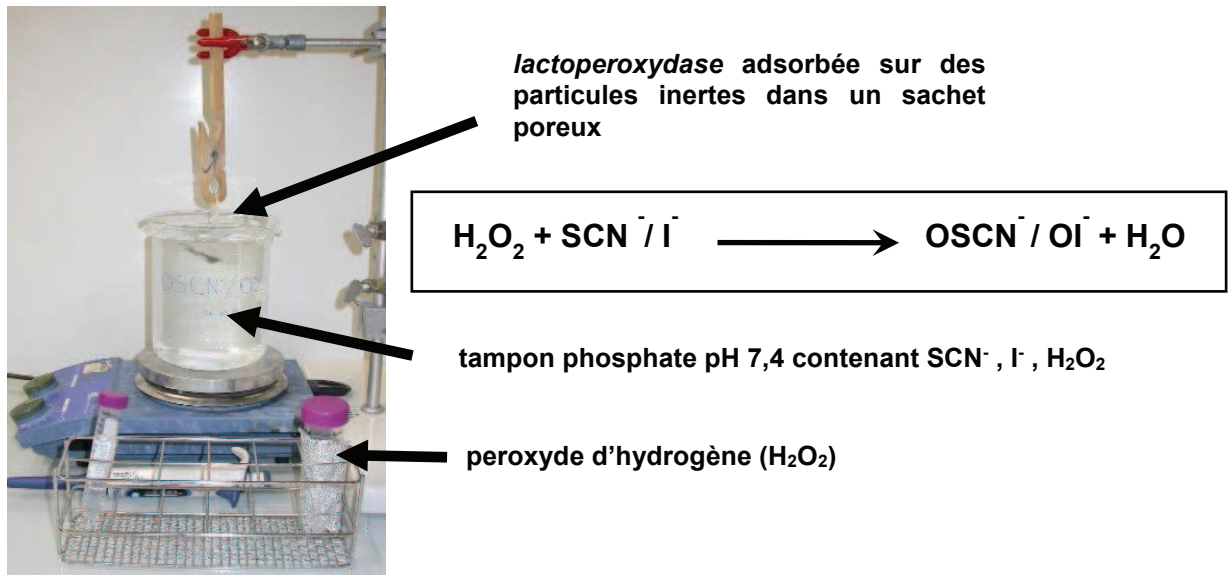
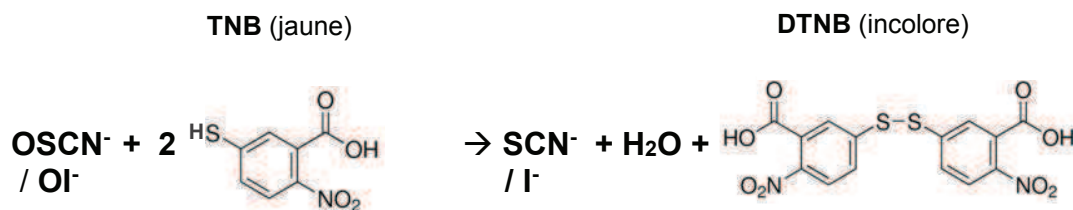


Figure 5. Dispositif expérimental de production d'une solution d'hypohalogéneux.

Dosage des oxydants. Les composés hypohalogéneux oxydants, produits par le dispositif expérimental mis en place, ont été dosés par la méthode (Aune & Thomas, 1977) au DTNB (acide dithiobisnitrobenzoïque). Le MCE (Merck™, Darmstadt, Allemagne) réduit le DTNB (Sigma-Aldrich™, St Louis, MO, USA) en TNB (acide thionitrobenzoïque) qui est jaune. Lors de la mise en contact avec les hypohalogéneux oxydants, le TNB va, lui-même, être oxydé en DTNB incolore. Cette différence de coloration est mesurée au spectrophotomètre à 412 nm. A partir de la loi de Beer-Lambert, on calcule le nombre de moles de TNB oxydées, ce qui correspond stœchiométriquement à une demi-mole d'oxydant (Formule 3).



Formule 3. TNB (acide thionitrobenzoïque) et DTNB (acide dithiobisnitrobenzoïque). OSCN⁻ peut être remplacé par OI⁻ dans cette formule.

La Figure 6 montre la variation de l'absorbance du TNB oxydé par différents volumes d'hypothiocyanite/hypoiodite. La relation entre la diminution d'absorbance et la quantité d'oxydants est linéaire jusqu'à un volume de 200 µl de la solution. La loi de Beer Lambert a permis le calcul de la concentration d'oxydants en prenant $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Aune & Thomas, 1977). Sachant qu'une mole d'hypohalogéneux oxyde deux moles de TNB réduit, la concentration des oxydants peut être déterminée : elle est de $2000 \pm 72 \text{ } \mu\text{M}$ (moyenne \pm SEM, N = 10) ; le coefficient de variation vaut 12,2%. Le graphique en insert dans la Figure 6 représente les absorbances exprimées en pourcentage de leur somme pour les volumes compris entre 0 et 200 µl ; la relation est alors linéaire ($y = 0.261x$, $r = 0.9977$).

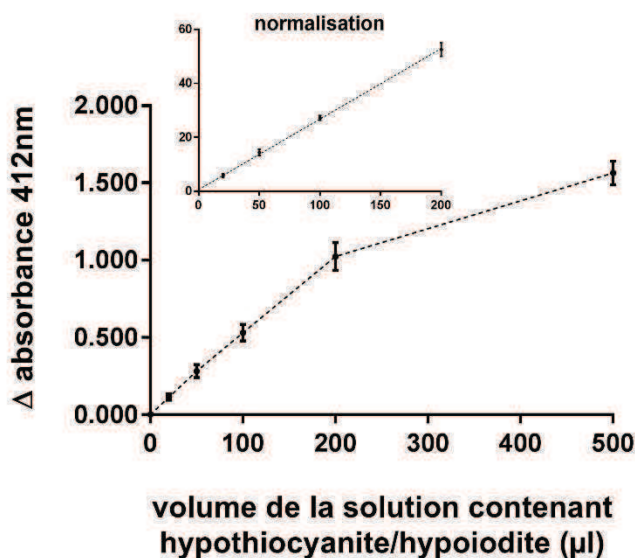


Figure 6. Oxydation du DTNB par OSCN⁻/OI⁻ (moyenne \pm SEM). Le graphique en insert représente les résultats normalisés (% du total des absorbances).

La Figure 7 montre l'évolution de l'absorbance au cours du temps lors du dosage de l'hypothiocyanite/hypoiodite en présence de TNB. Cette absorbance est considérée constante pour les différentes dilutions de l'oxydant (la pente des droites est inférieure à $|0,0002|$ par min et jamais supérieure à celle du blanc réactif), quel que soit le temps écoulé entre le mélange des réactifs et la mesure au spectrophotomètre.

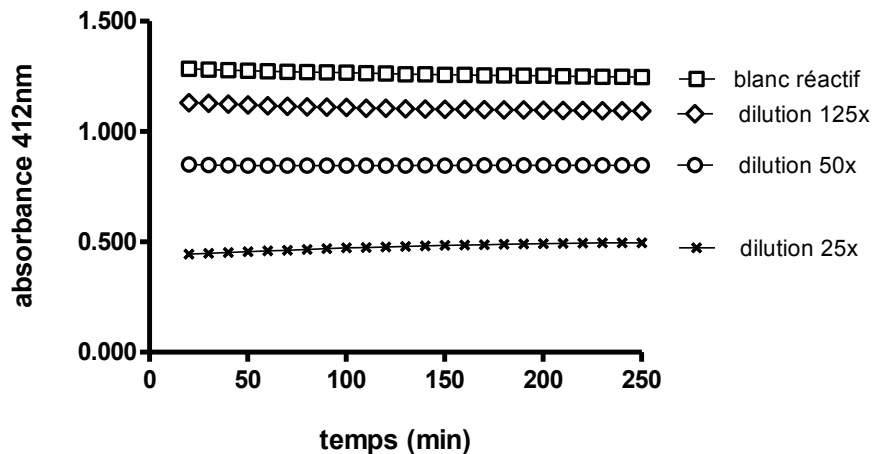


Figure 7. Variation de l'absorbance au cours du temps après le mélange échantillon - réactif lors du dosage de l'hypothiocyanite / hypoiodite avec le TNB.

La Figure 8 montre l'évolution de l'absorbance au cours du temps lors du dosage de l'hypoiodite avec le TNB. Cette absorbance est considérée constante pour les différentes dilutions de l'oxydant (la pente des droites est inférieure à $|0,0004|$ par min et jamais supérieure à celle du blanc réactif), quel que soit le temps écoulé entre le mélange des réactifs et la mesure au spectrophotomètre.

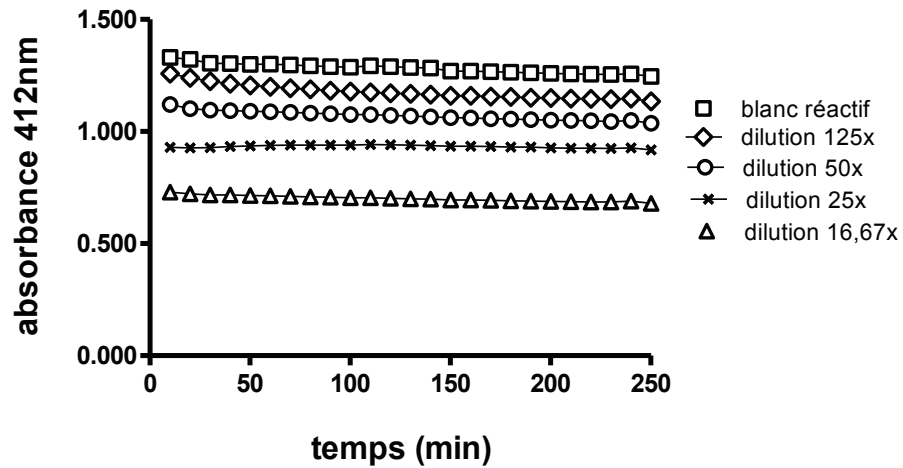


Figure 8. Variation de l'absorbance au cours du temps lors du dosage de l'hypiodite avec le TNB.

La Figure 9 montre l'évolution de l'absorbance au cours du temps lors du dosage de l'hypothiocyanite avec le TNB. La première mesure est d'autant plus faible qu'il y a d'oxydant mais l'absorbance continue à diminuer au cours du temps pour tendre vers zéro, au contraire de ce qui était observé pour les solutions contenant de l'iodure.

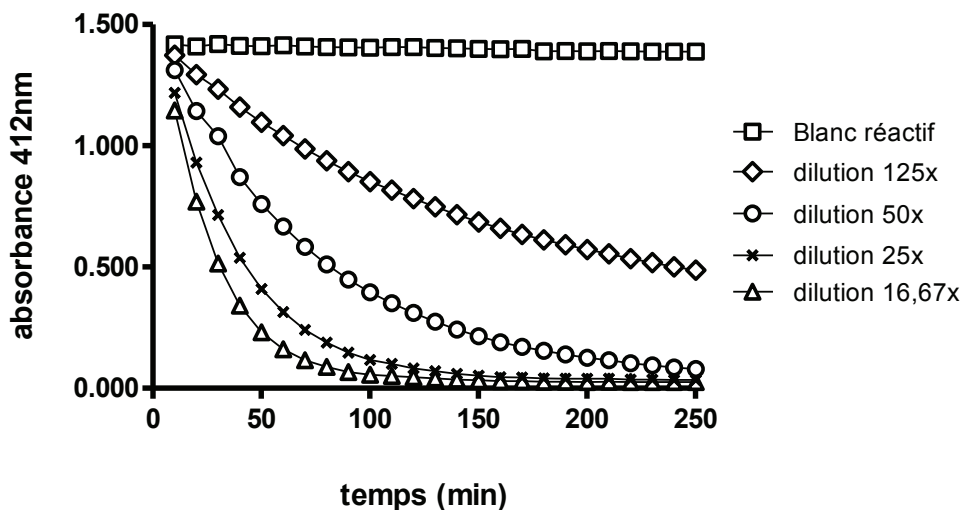


Figure 9. Variation de l'absorbance au cours du temps lors du dosage de l'hypothiocyanite avec le TNB.

La Figure 10 montre l'évolution de l'absorbance du TNB après addition de peroxyde d'hydrogène. La première mesure est d'autant plus faible qu'il y a plus de H_2O_2 mais l'absorbance continue à diminuer au cours du temps pour tendre vers zéro.

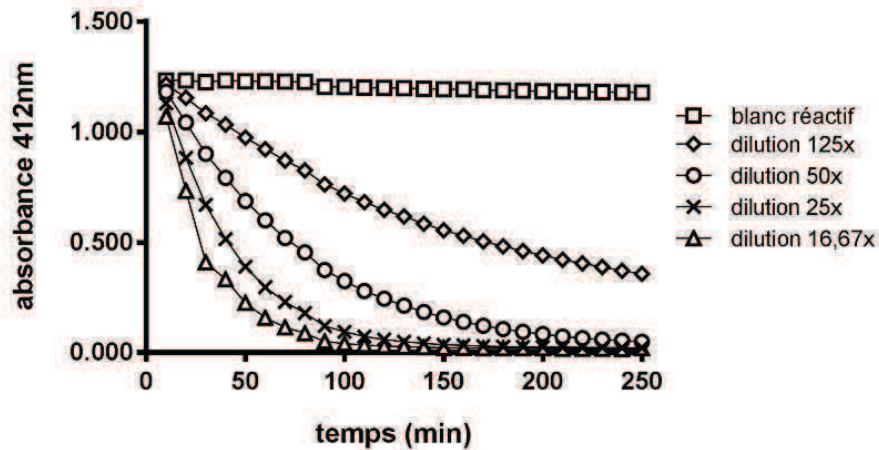


Figure 10. Variation de l'absorbance au cours du temps lors du dosage de H_2O_2 avec le TNB.

La Figure 11 montre que l'addition de catalase (Sigma-Aldrich™, St-Louis, MO, USA) dans le milieu réactionnel (concentration finale : 5000 U/ml) annule l'oxydation du TNB au cours du temps en présence d'hypothiocyanite ou de H_2O_2 seul, comme montré dans la figure précédente. Il faut remarquer, dans cette figure 11, que l'absorbance en présence de catalase est stable mais supérieure à celle du blanc sans catalase.

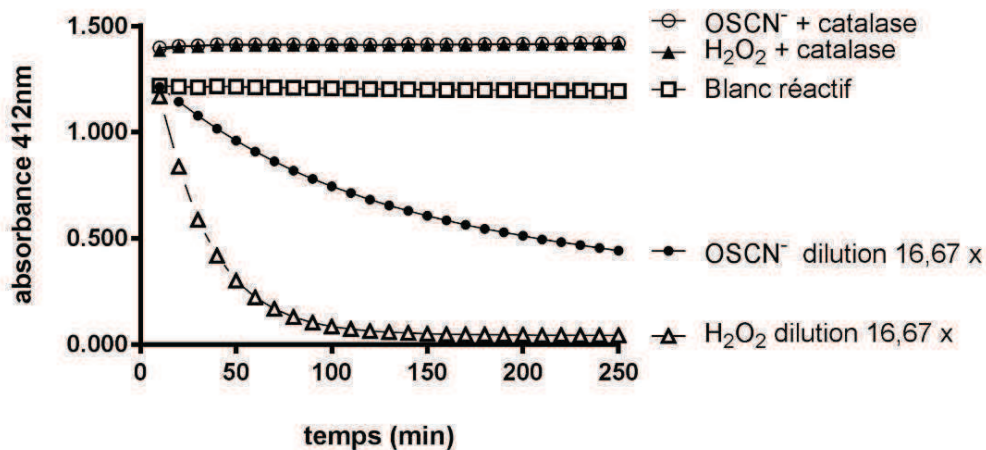


Figure 11. Effet de la catalase (5000 U / ml) sur la stabilité du TNB en présence de $OSCN^-$ et de H_2O_2 .

La Figure 12 évalue la conservation de l'hypothiocyanite/hypoiodite au cours du temps. Après 5 semaines de conservation à 4°C, la concentration de OSCN⁻/OI⁻ diminue de 45,4% ; après 53 semaines de conservation à 4°C, la concentration de OSCN⁻/OI⁻ diminue de 89,5%. Lorsque le dosage des hypohalogéneux était fait immédiatement après la production de la solution oxydante, leur concentration était en moyenne $2000 \pm 72 \mu\text{M}$ (N = 10).

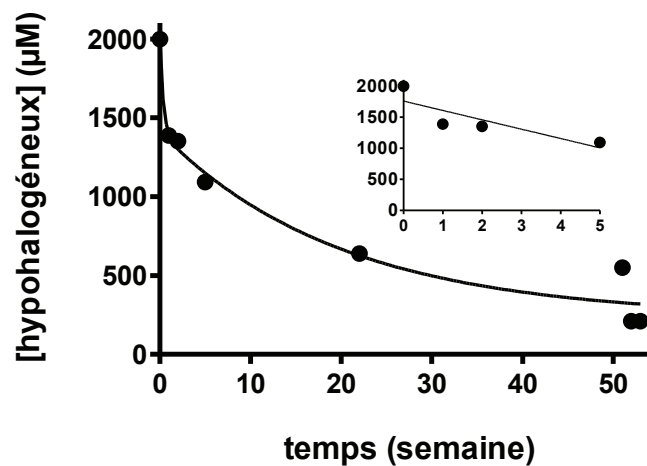


Figure 12. Evaluation de la conservation des oxydants à 4°C pendant 1 an (moyenne de 4 réplicats pour chacune des 8 solutions d'âge différent). L'insert montre les données disponibles pour 5 semaines.

Dosage de la peroxydase. La lactoperoxydase a été dosée dans des solutions d'hypohalogéneux par la méthode à la tétraméthylbenzidine (TMB) pour s'assurer de l'absence de passage de l'enzyme hors du sachet vers la solution qui servira à décontaminer des biofilms à *Candida* (Josephy et al., 1982). En présence de H₂O₂ (5 mM), la lactoperoxydase oxyde le TMB 10 mM (Sigma-Aldrich™, St Louis, MO, USA) en un produit coloré absorbant à 450 nm dans un tampon acétate (50 mM, pH 5,4). La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de H₂SO₄ (1 M) après un temps déterminé (15 min).

I.5. Matériaux

Des languettes de résine (mesures au pied à coulisse : longueur $18,30 \pm 0,10$ mm, largeur $4,60 \pm 0,10$ mm, épaisseur $2,56 \pm 0,01$ mm) ont été fabriquées par une méthode de mise au four à moufle, classique pour une prothèse amovible, par le laboratoire des prothèses dentaires de la Faculté de Médecine ULB. Un côté a été poli (surface lisse) et l'autre ne l'a pas été (surface rugueuse). Les morceaux de résine ont été conservés à 4°C dans de l'azide de sodium 0,1% (poids/volume) (Merck™, Darmstadt, Allemagne) pour leur désinfection.

II. Méthodes

II.1. Evaluation de la croissance dans des plaques 96-puits

Les biofilms à *Candida* sont produits dans des plaques multi-puits à fond plat en polystyrène (GreinerBio-one®, CellStar™, Neuburg, Allemagne). Chaque colonne de la microplaque correspondait à une condition expérimentale répétée 8 fois. Après distribution de la suspension cellulaire et de la solution à tester à l'aide de pipettes Combitips (Eppendorf®, Allemagne), l'absorbance à 600 nm de chaque puits est lue dans un lecteur de microplaque (PerkinElmer™, Packard SpectraCount™, Wellesley, MA, USA) ; le trajet lumineux traverse les puits de haut en bas. Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'absorbance à 600 nm de chaque puits est relue dans le lecteur de microplaque. Cette mesure opacimétrique évalue la phase planctonique et la phase attachée sur le fond du puits plus les cellules sédimentées sans faire la différence entre ces 3 types de cellules. Les données sont comparées avec un contrôle positif sans la molécule. Un contrôle négatif sans la suspension cellulaire atteste l'absence de contamination accidentelle lors de la manipulation. La

Figure 13 montre l'évolution, d'heure en heure pendant 24 heures, de la turbidité des puits ensemencés avec $0,25 \times 10^6$ blastoconidies et $0,75 \times 10^6$ blastoconidies. La croissance peut être assimilée à une fonction sigmoïde avec un coefficient de régression non linéaire proche de 1 ($r = 0,9938$ et $0,9942$). Cette courbe de croissance présente, après 12 h d'évolution, un plateau qui reste stable pendant 48 heures. La Figure 14 compare l'absorbance à 600 nm mesurée après 24 et 48 heures de culture à 37°C.

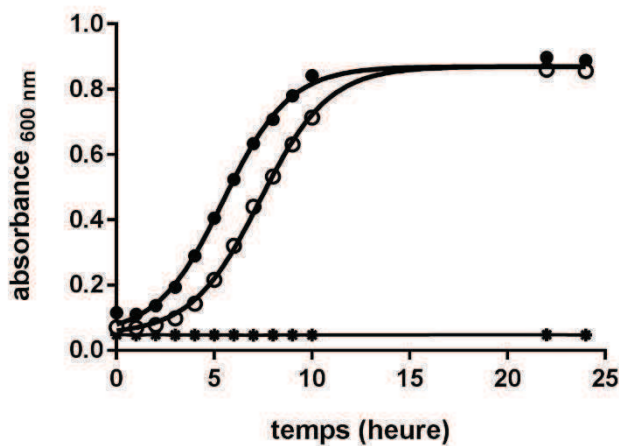


Figure 13. Evolution de la turbidité d'un bouillon de Sabouraud (200 μ l) ensemencé avec $0,25 \times 10^6$ blastoconidies (\circ) et $0,75 \times 10^6$ blastoconidies (\bullet). Les contrôles négatifs sont indiqués par des astérisques (*).

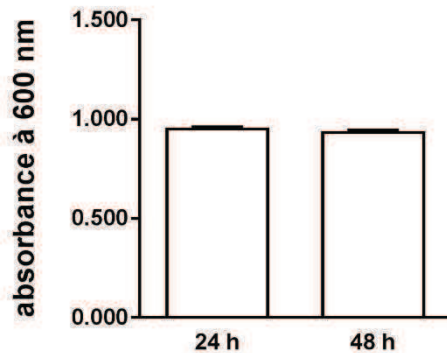


Figure 14. Croissance des levures évaluée, après 24 et 48 heures de culture, par turbidimétrie (N = 16) dans un bouillon de Sabouraud ensemencé par *C. albicans* ATCC 10231 ($0,5 \times 10^6$ bl / puits, volume total : 250 μ l).

II.2. Evaluation des biofilms par coloration au cristal violet

La technique de coloration par le cristal violet est adaptée de celle décrite par Stepanovic et al. (2000). Après la lecture opacimétrique à 24 h, le milieu de culture est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur en verre (VWR™, Louvain, Belgique) connectée à une trompe à eau. Les puits de la microplaque sont lavés 3 fois par une solution de NaCl 9‰ afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules restées en biofilm sont fixées par le méthanol (Sigma-Aldrich™, St Louis, MO, USA) pendant 15 minutes à température ambiante et colorées par le cristal violet 2% filtré (8 g de cristal violet dans 80 mL d'éthanol 95% plus 3,2 g d'oxalate d'ammonium dans 320 mL d'eau distillée) pendant 5 minutes à température ambiante puis rincées à l'eau de robinet puis séchées. L'acide acétique 2 M est utilisé pour solubiliser la biomasse colorée qui est mesurée par photométrie à 600 nm sur un lecteur de microplaque (PerkinElmer™, Packard SpectraCount™, Wellesley, MA, USA). La précision et l'exactitude de la mesure d'absorbance avec le lecteur de microplaques Packard SpectraCount™ sont acceptables jusqu'à une densité optique de 2,500 (CV et CE <5%). Tous les échantillons ayant une valeur d'absorbance supérieure à 2,000 ont été dilués 10 fois.

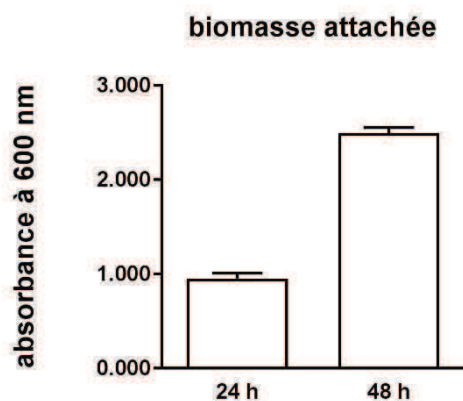


Figure 15. Biomasse attachée, dans des puits de plaque 96-puits, évaluée après 24 et 48 heures de culture par la méthode au cristal violet ($0,5 \times 10^6$ bl / puits, volume total : 250 μ l, N = 16).

II.3. Effet des molécules du *quorum sensing*

Les biofilms sont évalués après 24 h à 37°C dans des plaques à 96-puits à fond plat dans un milieu de Sabouraud liquide avec une concentration croissante de farnésol (0,001 à 3 mM) solubilisé dans du DMSO 1% ou de tyrosol (1 à 20 mM) solubilisé dans de l'eau distillée stérile (volume total de chaque puits : 200 µl). Chaque puits contenait initialement 10⁶ blastoconidies suspendues dans de l'eau. La croissance de la levure est évaluée par spectrophotométrie à 600 nm puis les biofilms sont colorés comme indiqué *supra*.

II.4. Effet du lysozyme

Différentes concentrations de lysozyme ont été testées selon divers protocoles sur plaque 96-puits en polystyrène ou sur languettes de résine : tantôt après des incubations de 4 heures pour étudier son effet sur l'adhésion des blastoconidies, tantôt après des incubations de 24 heures pour évaluer son effet sur la formation des biofilms (ajoute de la protéine au temps zéro de l'expérience) ou pour évaluer son effet sur le biofilm déjà formé (ajoute sur des biofilms déjà formés pendant 24 heures).

Evaluation sur plaques de polystyrène

Les biofilms sont évalués après 24 h à 37°C dans des plaques à 96-puits à fond plat dans un milieu de Sabouraud liquide avec une concentration croissante de lysozyme (0,2 à 70 µM) solubilisé dans du Sabouraud (volume total de chaque puits : 250 µl). Chaque puits contenait initialement 0,5 x 10⁶ de blastoconidies suspendues dans du bouillon de Sabouraud. La croissance de la levure est évaluée par spectrophotométrie à 600 nm puis les biofilms sont colorés au cristal violet.

Evaluation sur languettes de résine

Effet du lysozyme sur des biofilms en formation et sur des biofilms préformés : évaluation par la méthode au cristal violet. Huit languettes de résine ont été transférées dans un potiquet stérile à couvercle (Deltalab™, Barcelone, Espagne) et lavées trois fois dans 60 ml d'eau distillée stérile pendant 5 min avec agitation manuelle, puis rincées une dernière fois dans 60 ml de Sabouraud liquide pendant 5 min avec agitation, chaque languette de résine a été transférée dans un tube (15 ml) polypropylène à fond conique Falcon® (Becton Dickinson™, Franklin Lakes, NJ, USA) contenant du Sabouraud liquide. Le tableau VIII résume la composition des milieux réactionnels au jour J₁.

	liquide de Sabouraud	suspension de <i>C. albicans</i> à 10 ⁶ bl/ml
1	4	-
2	3,6	0,4
3	3,6	0,4
4	3,6	0,4
5	4	-
6	4	-
7	4	-
8	4	-

Tableau VIII. Composition des tubes Falcon au jour J₁.

Tous les tubes furent incubés pendant 24 heures dans un Rotator™ (rotateur Stuart® / SB3, Staffordshire, Royaume-Uni) à 3 rpm. Lors du 2^{ème} jour de l'expérience, les milieux de culture dans les 8 tubes ont été aspirés à l'aide d'une pipette Pasteur connectée à une trompe à eau et de nouveaux milieux réactionnels ont été préparés, le Tableau IX résume la composition des milieux réactionnels au jour J₂.

		liquide de Sabouraud (ml)	solution de lysozyme (ml)		suspension de <i>C.a.</i> à 10 ⁶ bl/ml (ml)	
biofilms pré-formés	1	4	-	mélanger doucement au Rotator™	-	mélanger doucement au Rotator™
	2	4	-		-	
	3	3,6	0,4 (*)		-	
	4	3,6	0,4 (**)		-	
biofilms en formation	5	4	-		-	
	6	3,6	-		0,4	
	7	3,2	0,4 (*)		0,4	
	8	3,2	0,4 (**)		0,4	

Tableau IX. Composition des tubes Falcon au jour J2. (* lysozyme 10 mg/ml, ** lysozyme 100 µg/ml).

Tous les tubes ont été alors incubés pendant 24 heures dans un Rotator™ à 3 tours par min. Après cette incubation, la phase liquide a été aspirée et chaque tube a été lavé 3 fois par 4 ml de NaCl 9‰ avec agitation pendant 1 min au Rotator™. Après aspiration du dernier lavage, les tubes ont été incubés en présence de 4 ml de méthanol pendant 15 min au Rotator™ à température ambiante. Après aspiration du méthanol, les tubes ont été incubés en présence de 4 ml de cristal violet pendant 5 min au Rotator™. Après aspiration du cristal violet, chaque languette de résine a été transférée dans une boîte de Petri vide et stérile puis lavée avec de l'eau de distribution. Les languettes ont été ensuite séchées puis chacune transférée dans un tube Falcon stérile. L'acide acétique 2 M (2 ml) a été finalement ajouté dans chaque tube pour une durée de 24 h. Un volume de 200 µl a été transféré de chaque tube dans un puits d'une plaque 96-puits et la densité de la coloration fut mesurée dans un lecteur de plaque à 600 nm.

Effet du lysozyme sur l'adhérence de *C. albicans* sur la résine : évaluation par comptage de CFU. Quatre languettes de résine ont été transférées dans des tubes (15 ml) polypropylène à fond conique Falcon® et lavées trois fois dans 4 ml d'eau distillée stérile pendant 5 min sous agitation douce à 3 rpm, puis rincées dans du milieu liquide de Sabouraud pendant 5 min. Chaque languette a été, ensuite,

immergée dans un tube contenant du milieu Sabouraud frais. Le tableau X résume la composition des milieux réactionnels.

		liquide de Sabouraud (ml)	solution de lysozyme (ml)		suspension de <i>C.albicans</i> à 10 ⁶ bl/ml (ml)	
phase d'adhésion	1	4	-	mélanger doucement au Rotator™	-	mélanger doucement au Rotator™
	2	3,6	-		0,4	
	3	3,2	0,4 (*)		0,4	
	4	3,2	0,4 (**)		0,4	

Tableau X. Composition des tubes Falcon (* lysozyme 10 mg/ml, ** lysozyme 100 µg/ml).

Après incubation pendant 4 heures à 37°C sous agitation continue à 3 rpm, la phase liquide a été aspirée et chaque pièce de résine a été transférée dans un nouveau tube Falcon propre. Les languettes de résine ont été ensuite lavées trois fois dans du NaCl 0,9% stérile, puis transférées séparément dans une boîte de Petri vide et stérile. Chaque surface (rugueuse ou lisse) de chaque languette a étéensemencée en série sur quatre boîtes différentes de gélose Sabouraud - à l'aide d'une pince hémostatique courbe stérile, en ayant soin de ne toucher que l'épaisseur de la languette avec la pince - pour une récupération optimale des cellules de levure adhérentes. Une languette de résine incubée uniquement dans le Sabouraud frais servait de contrôle négatif. Les CFU ont été comptées après incubation de toutes les boîtes de Petri pendant 48 heures à 37°C.

II.5. Effet de la solution d'oxydants OSCN⁻/OI⁻

Les biofilms sont évalués après 24 h à 37°C dans des plaques à 96-puits à fond plat dans un milieu de Sabouraud liquide avec des concentrations finales croissantes d'oxydants (31 à 1000 µM). Chaque puits contenait initialement 0,5 x 10⁶ de blastoconidies suspendues dans 25 µl de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4. Après ajout d'un même volume (25 µl) de la solution oxydante, la plaque est

mélangée 5 min à température ambiante avec un agitateur magnétique (Ikamag™, Boutersem, Belgique). Le bouillon de Sabouraud est finalement ajouté (volume final de chaque puits : 250 µl). La croissance de la levure est évaluée par spectrophotométrie à 600 nm puis les biofilms sont colorés comme indiqué *supra*.

II.6. Effet antibiofilm d'un surnageant de culture de *C. albicans*

Dans un tube Falcon 40 ml à fond conique (Becton Dickinson Labware™, NJ, USA), une suspension de *C. albicans* est incubée dans de l'eau distillée stérile (concentration finale 20×10^6 bl/ml) à 37°C pendant 40 min. Après centrifugation (Rotenta 46R®, Hettich™, Tuttlingen, Allemagne), le surnageant est récupéré dans un autre tube. En parallèle, une deuxième suspension cellulaire fraîche est préparée dans de l'eau distillée stérile (concentration finale 20×10^6 bl/ml). Le but est d'incuber cette deuxième suspension avec le surnageant de la première dans des plaques 96-puits puis d'évaluer la quantité de biofilm formée après 24 h à 37°C. A cette fin, la suspension cellulaire ($0,5 \times 10^6$ blastoconidies par puits) est distribuée dans les puits par 25 µl, puis mélangées avec 50 µl de surnageant et finalement complétées avec du bouillon de culture. Le volume final dans chaque puits est de 200 µl. Des contrôles négatifs et positifs sont conjointement réalisés pour l'interprétation des résultats. La croissance de la levure est évaluée par spectrophotométrie à 600 nm puis les biofilms sont colorés par la méthode au cristal violet.

II.7. Dosage de H₂O₂

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer le peroxyde d'hydrogène consommé par des levures ou produit par l'enzyme glucose oxydase : une méthode

spectrophotométrique et une méthode par chimiluminescence. Les deux méthodes présentent des limitations telles que l'interférence des protéines et la turbidité des suspensions de *Candida* pour les lectures spectrophotométriques à 230 nm, ou l'inhibition de la chimiluminescence par des ions, entre autre le phosphate.

Dosage de la consommation de H₂O₂ par *C. albicans*. La consommation de H₂O₂ par *C. albicans* fut évaluée par spectrophotométrie à 230 nm. La méthode spectrophotométrique (Beers & Sizer, 1952) est basée sur l'absorbance de H₂O₂ à 230 nm dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7 ; le coefficient d'extinction molaire vaut dans ces conditions 0,071 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Beutler, 1971). Les caractéristiques de la méthode sont les suivantes : limites analytiques pour la détermination de H₂O₂ de 5 et 30 mM, le coefficient de précision et de variation inférieur à 1,5 et 5%, respectivement. La consommation de H₂O₂ par *C. albicans* est évaluée en suivant par spectrophotométrie à 230 nm la disparition de H₂O₂ à partir d'une concentration initiale de 10,8 mM. Le zéro du spectrophotomètre est ajusté contre une solution de tampon contenant du glucose 0,1 g/l. La consommation de H₂O₂ par *C. albicans* est déterminée par une cinétique (intervalle de temps 10 min, lecture pendant 90 min à 230 nm). La solution de H₂O₂ est préparée en diluant du H₂O₂ concentré (Perhydrol[®], Merck[™], Darmstadt, Allemagne) dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 contenant du glucose (0,1 g/l) pour obtenir une concentration de 67,3 mM. Une suspension de *C. albicans* de 20 x 10⁶ bl/ml est préparée dans du tampon phosphate stérile (après filtration sur Millipore[™] 0,2 µm). Dans une cuvette en quartz, 100 µl de la suspension de *C. albicans* (concentration finale 2 x 10⁶ bl/cuvette) est mélangée avec 400 µl de H₂O₂ à 67,3 mM puis complété à 2500 µl par du tampon phosphate/glucose. La cinétique est enclenchée et la ΔDO_{230nm}/min

est calculée. L'activité (concentration de H₂O₂ consommé en une minute) est calculée par la formule suivante :

$$\Delta DO \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot l} \cdot FD \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{N}$$

où DO : densité optique à 230 nm
 ΔDO : ΔDO analyse (DO temps 0 - DO temps x) – ΔDO blanc (DO temps 0 - DO temps x),
 ϵ : 0,071 mM⁻¹.cm⁻¹,
 l : longueur du trajet lumineux
 FD : facteur de dilution de l'échantillon,
 t : temps de la réaction (cinétique),
 N : nombre de blastoconidies par cuvette.

Dosage de la production de H₂O₂ par la glucose oxydase. La production de H₂O₂ par l'enzyme glucose oxydase a été évaluée par chimiluminescence (méthode à la lucigénine). La méthode par chimiluminescence (*Yamaguchi et al.*, 2010) est basée sur l'oxydation de la lucigénine (20 µM) par H₂O₂ dans une solution alcaline (8,3 mM Na₂CO₃ ajusté à pH 10,4) produisant une émission de photons qui a ensuite été mesurée sur un bioluminomètre LKB 1250 (LKB-Wallac™, Turku, Finlande). Caractéristiques de la méthode : plage analytique de 0,1 à 4,0 mM, du coefficient de précision et de variation inférieure à 1,5 et 5,0%, respectivement.

II.8. Evaluation de l'effet candidacide des oxydants OSCN⁻/OI⁻

L'effet candidacide de la solution d'hypohalogéneux a été évalué par comptage de CFU sur boîtes de Petri.

Procédure. Une suspension de *C. albicans* (10⁶ blastoconidies dans 0,1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,40) est incubée en présence de la solution d'oxydants (9,9 ml) pendant 5 min. Une suspension contrôle est mise en contact de tampon phosphate seul. Après cette incubation, 20 µl - des tubes essais (sans dilution) et des tubes contrôles (après dilution 100 x) - sont étalés sur une gélose

de Sabouraud. Les colonies sont comptées après une incubation à 37°C pendant 24 h à l'aide d'un compteur de colonies e-Count™ (Heathrow Scientific®, Vernon Hills, IL, USA).

II.9. Analyse de la toxicité cellulaire

La coloration au bleu trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. En effet, le bleu trypan qui pénètre dans des cellules vivantes est immédiatement expulsé. Ainsi, les cellules mortes apparaissent colorées en bleu alors que les cellules vivantes ne présentent pas d'aspect coloré. Cette méthode est utilisée dans le cadre de ce travail pour tester l'effet des molécules du *quorum sensing* et de la solution d'oxydants sur les cellules épithéliales buccales présentes dans la salive après desquamation épithéliales.

Procédure. La salive de volontaires - au sein du Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie à l'ULB - est récupérée dans des potiquets (Deltalab™, Barcelone, Espagne). Un volume de 50 µl de salive diluée 2 fois (dans du NaCl 9 ‰) est mélangé avec 50 µl d'une solution de bleu trypan (Merck™, Darmstadt, Allemagne) à une concentration de 0,4 g/100 ml. Le pourcentage de cellules mortes est observé entre lame (Thermo™, Braunschweig, Allemagne) et lamelle (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Allemagne) sur un microscope optique Leica DM2000 (Leica™, Wetzlar, Allemagne) : ce pourcentage sert de contrôle. Pour vérifier la toxicité des molécules, cette opération est précédée par une incubation de 30 minutes de 100 µl de salive avec 100 µl de la molécule à tester en solution.

III. Etude clinique *ex vivo*

Des patients porteurs d'une prothèse amovible ont été recrutés à l'Hôpital Erasme (ULB, Bruxelles) en consultation de prothèses ou dans le département de gériatrie de l'hôpital Erasme entre janvier et mars 2016. Les patients enrôlés sont répartis en 2 groupes de 23 patients, soit 46 patients appareillés âgés de 41 à 98 ans. La répartition entre groupe test *versus* groupe contrôle s'est faite en alternance. Le traitement *ex vivo* des prothèses est réalisé en 3 étapes : 1°) écouvillonnage (temps zéro) de l'intrados des prothèses pour détecter la présence de *Candida*, 2°) trempage de la prothèse 5 min dans la solution d'ions hypohalogéneux (test) ou de l'eau stérile (contrôle) puis rinçage à l'eau stérile, 3°) ré-écouvillonnage (temps 1) de l'intrados des prothèses pour détecter la présence résiduelle de *Candida*. Les prothèses du groupe contrôle sont plongées dans la solution d'hypohalogéneux, puis écouvillonnées (temps 3).

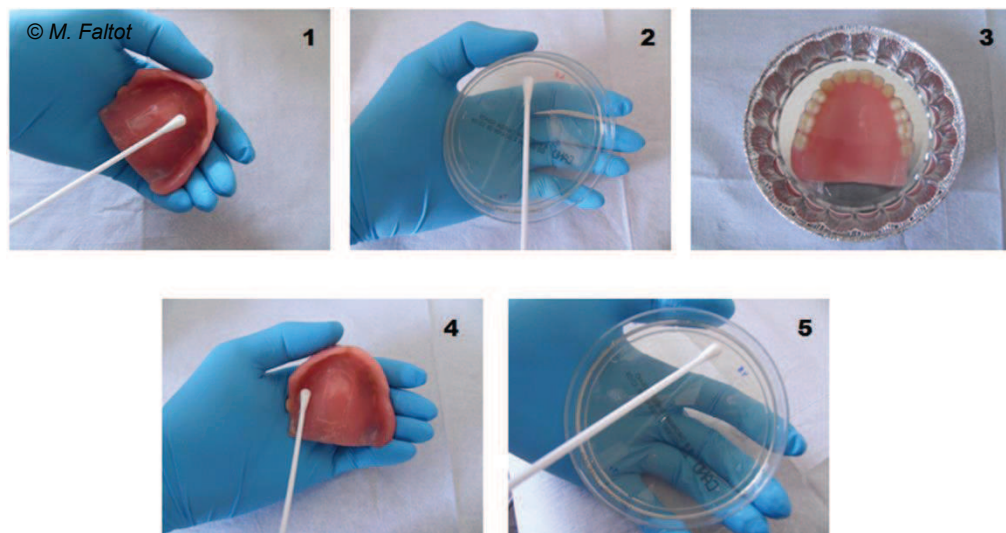


Figure 16. Protocole expérimental *ex vivo* pour la décontamination de prothèses par une solution d'hypohalogéneux. Etape 1 : écouvillonnage (1 et 2) de l'intrados de la prothèse puis ensemencement sur CHROMAgar™. Etape 2 : trempage (3) de la prothèse 5 min dans la solution d'hypohalogéneux (test) ou dans de l'eau stérile (contrôle) puis rinçage à l'eau stérile. Etape 3 : écouvillonnage de l'intrados (4 et 5) pour détecter la présence résiduelle de *Candida*. Photographie : M. Faltot.

IV. Analyses statistiques

Les tests statistiques (moyenne, SEM, déviation standard, test t de Student pairé et non pairé, test ANOVA complété par un test de Bonferroni ou de Dunnett, test 2 way ANOVA, test de Kolmogorov-Smirnov, one-sample t-test, test de Mann-Whitney, test de Wilcoxon, test de Kruskal-Wallis complété par un post-test de Dunn) ont été réalisés avec le logiciel GraphPadPrism, version 7.01 pour Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Les dépouillements mathématiques et la mise en graphiques des données ont été réalisés par ce même logiciel. Les valeurs moyennes ont été exprimées avec leur erreur standard (SEM), sauf indication contraire.

RESULTATS

Les investigations menées *in vitro* ont envisagé les effets anti-biofilms de deux molécules du *quorum sensing* et de deux molécules exocrines salivaires sur des cultures d'une souche répertoriée de *C. albicans* (ATCC 10231) et sur différentes souches cliniques prélevées à partir de prothèses dentaires amovibles. Les données les plus intéressantes ont mené à une tentative de décontamination *ex vivo* de prothèses dentaires contaminées par des levures du genre *Candida* et à des investigations complémentaires concernant la toxicité des différentes molécules sur des cellules épithéliales des muqueuses orales.

I. Etudes *in vitro*

Toutes les souches cliniques récoltées à partir de prothèses dentaires n'étaient pas productrices de biofilms sur le polystyrène. La Figure 17 montre la distribution des biomasses attachées sur les parois de puits des microplaques en polystyrène, évaluées par l'intensité de la coloration au cristal violet. Dans une série de 31 souches de *C. albicans*, isolées consécutivement à partir de prothèses dentaires, 41,9% d'entre elles montraient une biomasse attachée trop faible lors de l'évaluation par le cristal violet que pour observer une inhibition en présence des molécules testées. Dans le travail qui suit, différentes molécules ont été testées pour leur rôle anti-biofilm sur une souche de référence (ATCC 10231) et sur des souches cliniques productrices de biofilms sur base d'une biomasse attachée équivalente à une absorbance 600 nm supérieure à 0,100 après coloration au cristal violet. La formation de biofilms à *C. albicans* fut ainsi évaluée en présence des 2 molécules du *quorum sensing* les plus citées dans la littérature, le tyrosol et le farnésol, ainsi qu'en présence des 2 facteurs antimicrobiens exocrines salivaires les plus étudiées dans la littérature, le lysozyme et les

hypohalogéneux produits par une peroxydase (la lactoperoxydase utilisée *in vitro* est très proche de la sialoperoxydase salivaire).

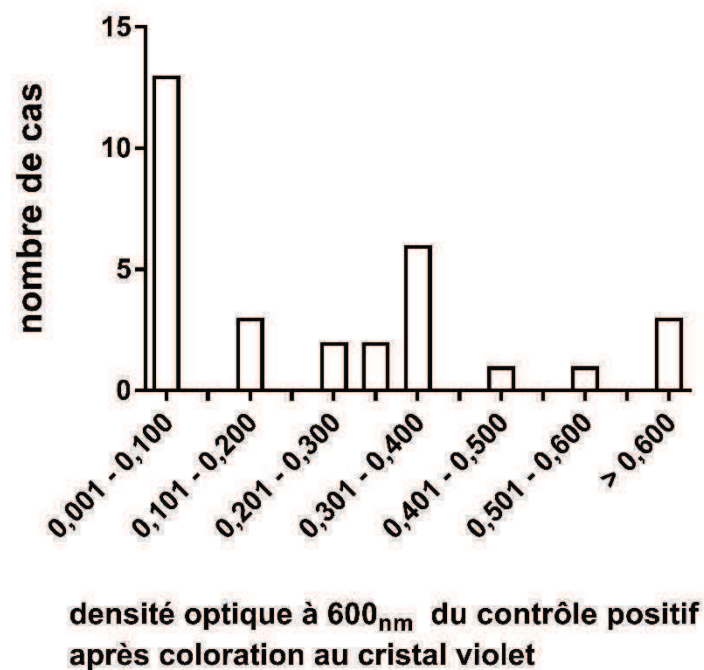


Figure 17. Capacité à former des biofilms sur du polystyrène par des souches cliniques (N = 31). Evaluation des biofilms par coloration au cristal violet.

I.1. Molécules du *quorum sensing*

La croissance de *C. albicans* et sa capacité à former des biofilms ont été évaluées en présence de concentrations croissantes de tyrosol (de 1 à 20 mM) et de farnésol (de 1 μ M à 3 mM) après 24 heures d'incubation à 37°C.

I.1.1. Effet du tyrosol sur la formation du biofilm

Souche de référence. La Figure 18 (a & b) montre l'effet de différentes concentrations (de 1 à 20 mM) en tyrosol sur la croissance d'une souche de collection (*C. albicans* ATCC 10231) et sur la formation de biofilms par cette même souche dans les puits d'une plaque 96-puits en polystyrène. Les données

ont été normalisées par rapport à la moyenne des contrôles positifs pour chaque expérience, permettant ainsi à la fois d'estimer la variabilité des résultats au sein de chaque condition par rapport au contrôle du jour et d'éviter le biais de la variabilité entre expériences. La turbidité du milieu de culture (Figure 18a) dans tous les puits contrôles représente une absorbance à 600 nm de $0,785 \pm 0,010$ (CV = 12,7% ; N = 96 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 3,6%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), des concentrations de tyrosol comprises entre 1 et 15 mM ne modifient pas la turbidité observée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés : l'absorbance à 600 nm après 24 heures d'incubation à 37°C varie entre $96,6 \pm 2,5\%$ à $100,4 \pm 0,7\%$ de celle observée pour les contrôles (test de Dunnett, NS). Une concentration en tyrosol plus élevée de 20 mM ralentit légèrement mais non significativement la croissance évaluée par turbidimétrie. En effet, l'absorbance à 600 nm pour une concentration en tyrosol de 20 mM après les mêmes conditions d'incubation vaut $92,9 \pm 2,2\%$ de celle observée dans les puits contrôles. Un test ANOVA ($p < 0,0707$) tend vers la signification (sans atteindre $p = 0,05$) pour cette faible diminution de 7,1% de la turbidité à une concentration de 20 mM en tyrosol. Un test de Student non pairé montre une différence significative ($p = 0,0070$) à 20 mM par rapport au contrôle. Si on considère toutes les valeurs normalisées (N = 96 pour les contrôles et N = 48 pour conditions avec tyrosol en 6 expériences indépendantes), le test ANOVA ($p = 0,0707$) complété par un test de Dunnett ($p < 0,001$) est alors significatif pour cette faible diminution de 7,1% de la turbidité à une concentration de 20 mM en tyrosol mais aussi pour les diminutions observées en présence de tyrosol 10 et 15

mM (test de Dunnett $p < 0,05$ et $0,001$ respectivement). Un test de Student non pairé montre une différence très significative ($p < 0,001$) à 20 mM par rapport au contrôle. Dans une expérience pilote (résultats non montrés), des concentrations en tyrosol comprises entre 3 μ M et 10 mM n'ont pas montré de différence significative (ANOVA, $p = 0,6572$).

La Figure 18b évalue la biomasse attachée sur la paroi interne des puits après coloration au cristal violet. Les contrôles positifs présentent après coloration et dilution 10 fois une absorbance de $0,539 \pm 0,287$ (CV = 53,3%, N = 96 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles (précision *intra-assay*) vaut 20,9%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), les résultats obtenus en présence de tyrosol montrent une diminution statistiquement significative (test ANOVA complété par un post-test de Dunnett) proportionnelle à la concentration comprise entre 4 et 20 mM en tyrosol. A une concentration de 20 mM, la quantité de biofilms ne représente plus que $9,9 \pm 2,8\%$ (N = 6) de la valeur moyenne des contrôles positifs appariés. Il faut noter qu'une faible concentration en tyrosol (1 mM) entraîne une augmentation non significative de la biomasse attachée : $110,0 \pm 7,4\%$. Des concentrations de tyrosol inférieures à 4 mM ne modifient pas la biomasse attachée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés. Un test ANOVA ($p < 0,0001$) complété par un post-test de Dunnett est hautement significatif pour la réduction des biofilms en présence de tyrosol entre 4 et 20 mM, bien que faiblement significatif pour 4 mM en tyrosol.

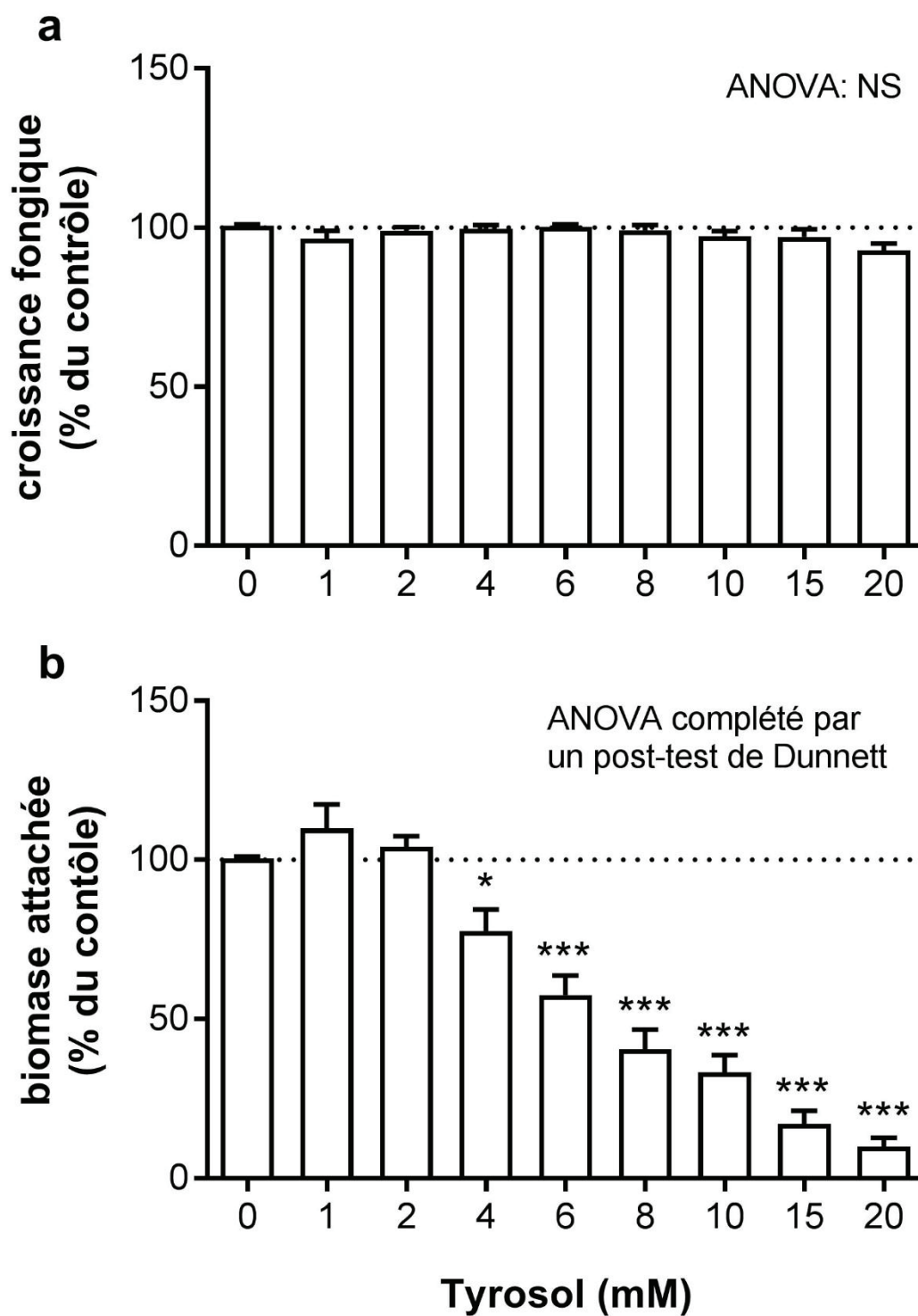


Figure 18. Effet du tyrosol sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 évaluée par turbidimétrie (a) et sur la formation *in vitro* de biofilm, évaluée par coloration au cristal violet (b). Les traits pointillés indiquent la valeur contrôle normalisée 100%. Moyenne \pm SEM ; N = 6 expériences indépendantes.

Souches cliniques. L'effet du tyrosol sur la croissance fongique et sur la formation de biofilms est similaire sur des souches cliniques isolées à partir de l'intrados de prothèses dentaires (Figure 19 a & b). La turbidité du milieu de culture (Figure 19a) dans les puits contrôles représente une absorbance à 600 nm de $0,765 \pm 0,006$ (CV = 8,0%). La diminution de la turbidité devient significative à partir d'une concentration de 2 mM en tyrosol ($95,3 \pm 0,7\%$ des contrôles appariés) et atteint $87,7 \pm 0,9\%$ (N = 6) à une concentration de 20 mM. Un test ANOVA ($p < 0,0001$) complété par un post-test de comparaison de Dunnett montre donc une faible diminution de la turbidité de 4,7 à 12,3% pour 2 et 20 mM en tyrosol respectivement : la signification est faible pour 2 mM et hautement significative pour des concentrations supérieures. La Figure 19b résume les données pour la biomasse attachée sur la paroi interne des puits après coloration au cristal violet. Les contrôles positifs présentent après coloration et dilution 10 fois une absorbance de $0,668 \pm 0,072$ (CV = 104,9%, N = 96 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles (précision *intra-assay*) vaut 35,9%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), comme pour la souche de référence, les résultats obtenus en présence de tyrosol montrent une diminution statistiquement significative (test ANOVA complété par un post-test de Dunnett) proportionnelle à la quantité de tyrosol à partir d'une concentration de 8 mM. A une concentration de 20 mM, la quantité de biofilms ne représente plus que $19,9 \pm 11,1\%$ (n = 6) de la valeur moyenne des contrôles positifs appariés. Il faut noter qu'une faible concentration en tyrosol (1 mM) entraîne une augmentation significative de la biomasse attachée : $153,8 \pm 17,2\%$;

en présence de tyrosol 2 mM, l'augmentation n'est pas significative (test ANOVA complété par un post-test de Dunnett, $p < 0,05$).

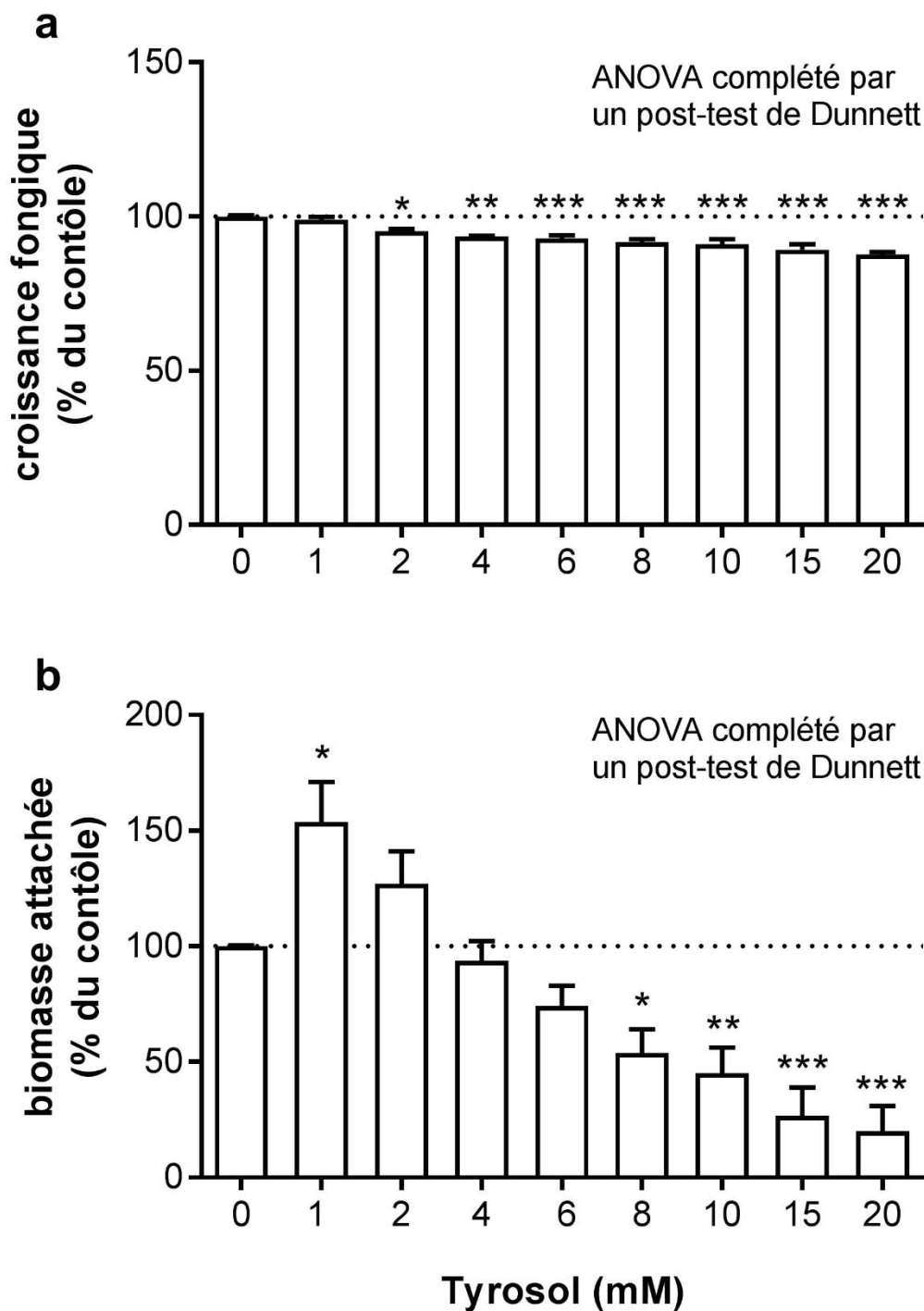


Figure 19. Effet du tyrosol sur la croissance de souches cliniques de *C. albicans* évaluée par turbidimétrie (a) et sur la formation *in vitro* de biofilm évaluée par coloration au cristal violet (b). Les traits pointillés indiquent la valeur contrôle normalisée 100%. Moyenne \pm SEM ; N = 6 expériences indépendantes.

I.1.2. Effet du farnésol sur la formation du biofilm

Souche de référence. La Figure 20 (a & b) montre l'effet de différentes concentrations (de 0,001 à 3 mM) en farnésol sur la croissance de la souche *C. albicans* ATCC 10231 et sur la formation de biofilms par cette même souche dans les puits d'une plaque 96-puits en polystyrène. Comme pour le tyrosol, les données ont été normalisées par rapport à la moyenne des contrôles positifs de chaque expérience, permettant ainsi à la fois d'estimer la variabilité des résultats au sein de chaque condition par rapport au contrôle et d'éviter le biais de la variabilité entre expériences. La turbidité du milieu de culture (Figure 20a) dans tous les puits contrôles représente une absorbance à 600 nm de $0,735 \pm 0,010$ (CV = 12,9% ; N = 96 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 6,6%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), des concentrations de farnésol comprises entre 1 μ M et 1 mM ne modifient pas la turbidité observée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés : l'absorbance à 600 nm après 24 heures d'incubation à 37°C varie entre $101,7 \pm 4,0\%$ à $112,1 \pm 4,5\%$ de celle observée pour les contrôles (test de Dunnett, NS). Une concentration en farnésol plus élevée de 3 mM ralentit légèrement mais non significativement la croissance évaluée par turbidimétrie. En effet, l'absorbance à 600 nm pour une concentration en farnésol de 3 mM après les mêmes conditions d'incubation vaut $92,4 \pm 5,1\%$ de celle observée dans les puits contrôles. Ni un test ANOVA ($p < 0,0707$) complété par un post-test de Dunnett ni un test t de Student non païré ne montrent de signification statistique pour cette réduction de 7,6% de la turbidité à une concentration de 3 mM en farnésol. Si on considère toutes les valeurs normalisées (N = 96 pour les contrôles

et N = 48 pour conditions avec farnésol en 6 expériences indépendantes), le test ANOVA ($p < 0,0001$) complété par un test de Dunnett ($p < 0,001$) est alors significatif pour cette faible diminution de 7,1% de la turbidité en présence de farnésol 3 mM mais aussi pour les augmentations observées (de $108,2 \pm 1,4\%$ à $112,0 \pm 1,6\%$) en présence de farnésol à une concentration comprise entre 0,01 et 0,001 mM (test de Dunnett $p < 0,001$).

La Figure 20b évalue la biomasse attachée sur la paroi interne des puits après coloration au cristal violet. Les contrôles positifs présentent après coloration et dilution 10 fois une absorbance de $0,824 \pm 0,054$ (CV = 63,7%, N = 96 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 6,6%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), les données obtenues montrent un effet biphasique du farnésol sur la formation de biofilms : inhibiteur à 3 mM et activateur entre 0,001 et 0,01 mM. Ces variations sont statistiquement significatives (test ANOVA complété par un post-test de Dunnett). A une concentration de 3 mM, la quantité de biofilms ne représente plus que $10,5 \pm 4,6\%$ (N = 6) de la valeur moyenne des contrôles positifs appariés. Par contre, de faibles concentrations en farnésol entraînent une augmentation significative de la biomasse attachée comprise entre $221,2 \pm 26,8\%$ à 1 μM et $207,8 \pm 20,5\%$ à 10 μM .

Souches cliniques. L'effet du farnésol sur la croissance fongique et sur la formation de biofilms est similaire sur des souches cliniques isolées à partir de l'intrados de prothèses dentaires (Figure 21 a & b). La turbidité du milieu de culture (Figure 20a) dans tous les puits contrôles représente une absorbance à 600 nm de $0,735 \pm 0,010$ (CV = 12,9% ; N = 96 en 6 expériences indépendantes).

Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 6,6%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), des concentrations de farnésol comprises entre 1 μ M et 300 μ M ne modifient pas la turbidité observée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés : l'absorbance à 600 nm après 24 heures d'incubation à 37°C varie respectivement entre $103,3 \pm 1,8\%$ à $96,0 \pm 2,0\%$ de celle observée pour les contrôles (test de Dunnett, NS). Des concentrations plus élevées en farnésol (1 et 3 mM) ralentissent légèrement mais significativement la croissance évaluée par turbidimétrie. En effet, l'absorbance à 600 nm pour une concentration en farnésol de 1 et 3 mM après les mêmes conditions d'incubation vaut respectivement $88,9 \pm 3,7\%$ et $83,0 \pm 3,3\%$ de celle observée dans les puits contrôles (ANOVA : $p < 0,0001$; un post-test de Dunnett : $p < 0,01$) pour ces réductions de 11,1 et 17,0% de la turbidité.

La Figure 21b évalue la biomasse attachée sur la paroi interne des puits après coloration au cristal violet. Les contrôles positifs présentent après coloration et dilution 10 fois une absorbance de $0,824 \pm 0,054$ (CV = 63,7%, N = 96 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 42,1%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), les données obtenues montrent un effet biphasique du farnésol sur la formation de biofilms comme pour la souche ATCC : inhibiteur à 3 mM et activateur entre 0,001 et 0,01 mM. A une concentration de 3 mM, la quantité de biofilms ne représente plus que $27,8 \pm 4,5\%$ (N = 6) de la valeur moyenne des contrôles positifs appariés. De faibles concentrations en farnésol entraînent une augmentation non significative (test ANOVA complété par un post-test de Dunnett) de la biomasse

attachée comprise entre $159,5 \pm 25,8\%$ à $1 \mu\text{M}$ et $138,7 \pm 20,3\%$ à $10 \mu\text{M}$; les données deviennent significatives lorsqu'on les dépouille en considérant les 96 réplicats évalués en 6 expériences indépendantes.

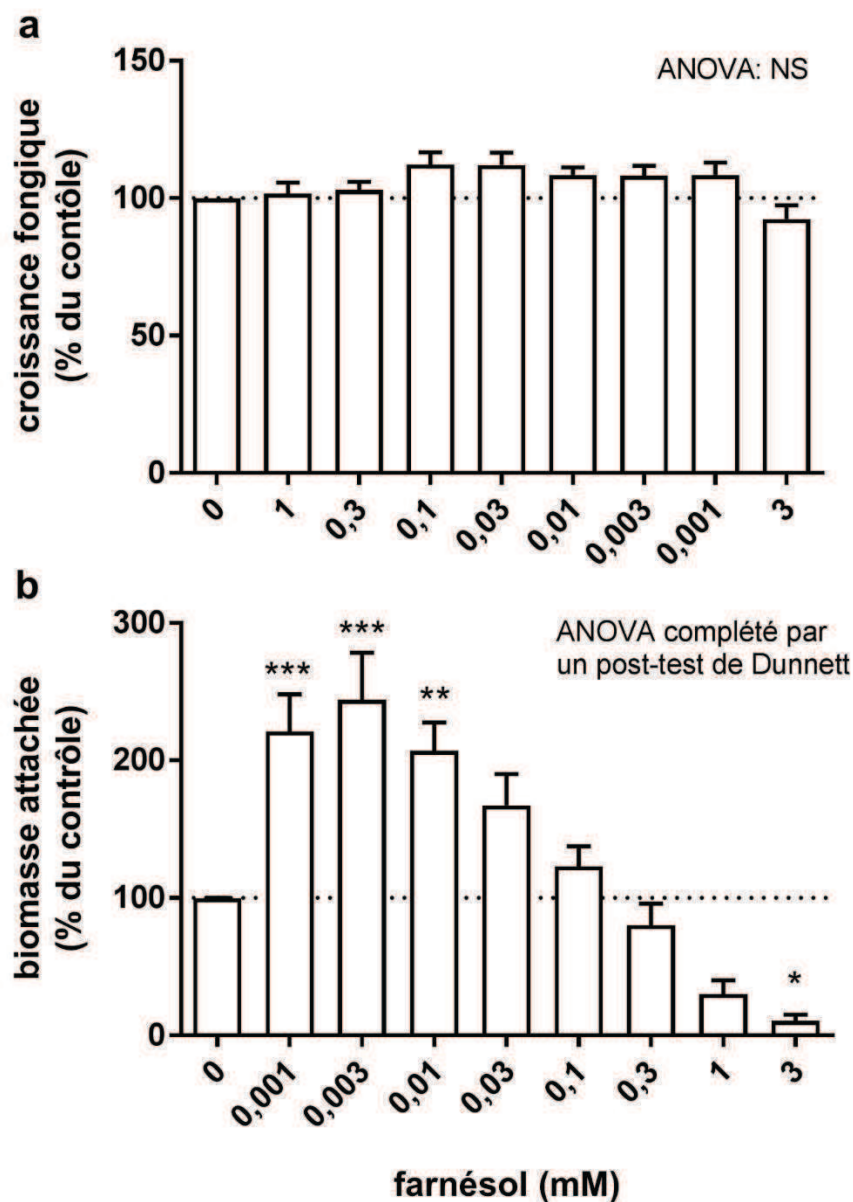


Figure 20. Effet du farnésol sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 évaluée par turbidimétrie (a) et sur la formation *in vitro* du biofilm évaluée par la coloration au cristal violet (b). Moyenne \pm SEM, N = 6.

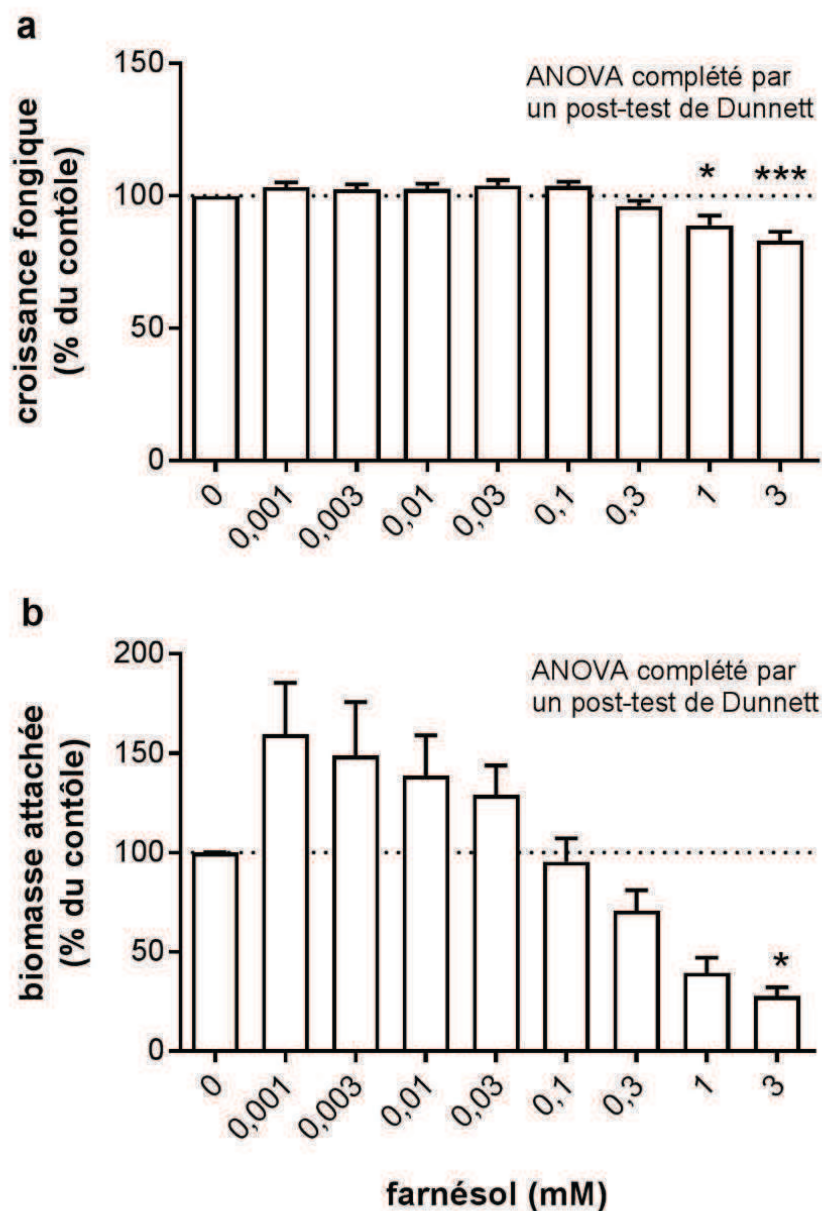


Figure 21. Effet du farnésol sur la croissance et la formation *in vitro* du biofilm de 6 souches cliniques de *C. albicans*, évaluées par turbidimétrie (a) et par la coloration au cristal violet (b), respectivement (moyenne ± SEM).

I.1.3. Effet des QSM sur un biofilm déjà formé

La Figure 22 démontre un effet inhibiteur du tyrosol 20 mM ou du farnésol 3 mM lorsque ces molécules sont ajoutées sur des biofilms préalablement formés pendant 24 heures. Après formation de biofilms à *C. albicans* ATCC 10231

pendant 24 heures à 37°C dans une microplaque, les puits furent lavés 3 fois avec du NaCl 0,9% et remplis de bouillon de Sabouraud contenant soit du tyrosol soit du farnésol pour une seconde incubation de 24 h à 37°C. La turbidité du milieu de culture dans tous les puits contrôles après la seconde incubation représente une absorbance à 600 nm de $0,099 \pm 0,021$ (CV = 84,9% ; N = 8 en 1 expérience indépendante). En présence de tyrosol 20 mM ou de farnésol 3 mM, la croissance turbidimétrique (Figure 22a) est alors quasi totalement abolie tandis que la biomasse attachée (Figure 22b) est réduite de $21,3 \pm 5,3\%$ pour le tyrosol 20 mM et de $55,0 \pm 3,5\%$ pour le farnésol 3 mM : toutes ces différences sont hautement significatives (ANOVA, $p < 0,0001$). Après une incubation en présence de farnésol 3 mM, la biomasse attachée est similaire à celle déjà présente initialement.

I.1.4. Production de facteurs anti-biofilms par *C. albicans*

Le surnageant de culture, prélevé après 40 minutes d'incubation à 37°C des blastoconidies de *C. albicans* ATCC 10231 dans de l'eau osmosée distillée stérile, réduit la formation de biofilms par cette souche. En effet, le surnageant mélangé à du milieu de culture entraîne une diminution de la biomasse attachée après 24 h d'incubation de $30,7 \pm 2,5\%$ de la biomasse observée pour un contrôle où le milieu de culture avait été mélangé avec de l'eau. Ceci suggère la production d'inhibiteur(s) de type molécule du *quorum sensing* (test t non pairé de Student, $p < 0,0001$). Ces surnageants ne présentaient aucun effet sur la croissance planctonique (test t non pairé de Student, $p = 0,5964$). Ces données sont résumées dans la Figure 23.

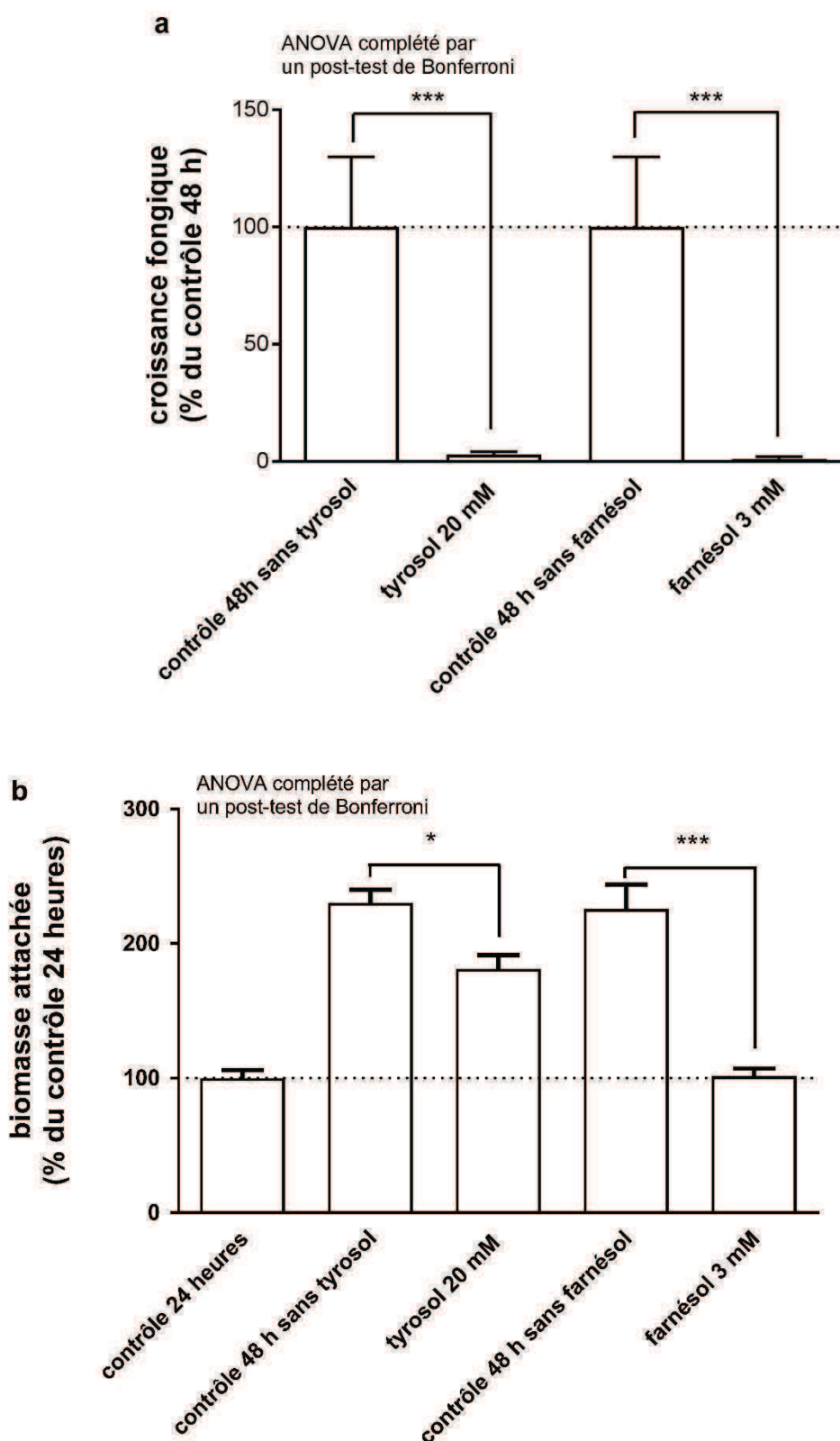


Figure 22. Etude de l'effet du tyrosol 20 mM et du farnésol 3 mM sur des biofilms à *C. albicans* ATCC 10231 déjà formés (moyenne \pm SEM) (N = 32 en 1 expérience indépendante). Evaluation par turbidimétrie (a) et par coloration au cristal violet (b).

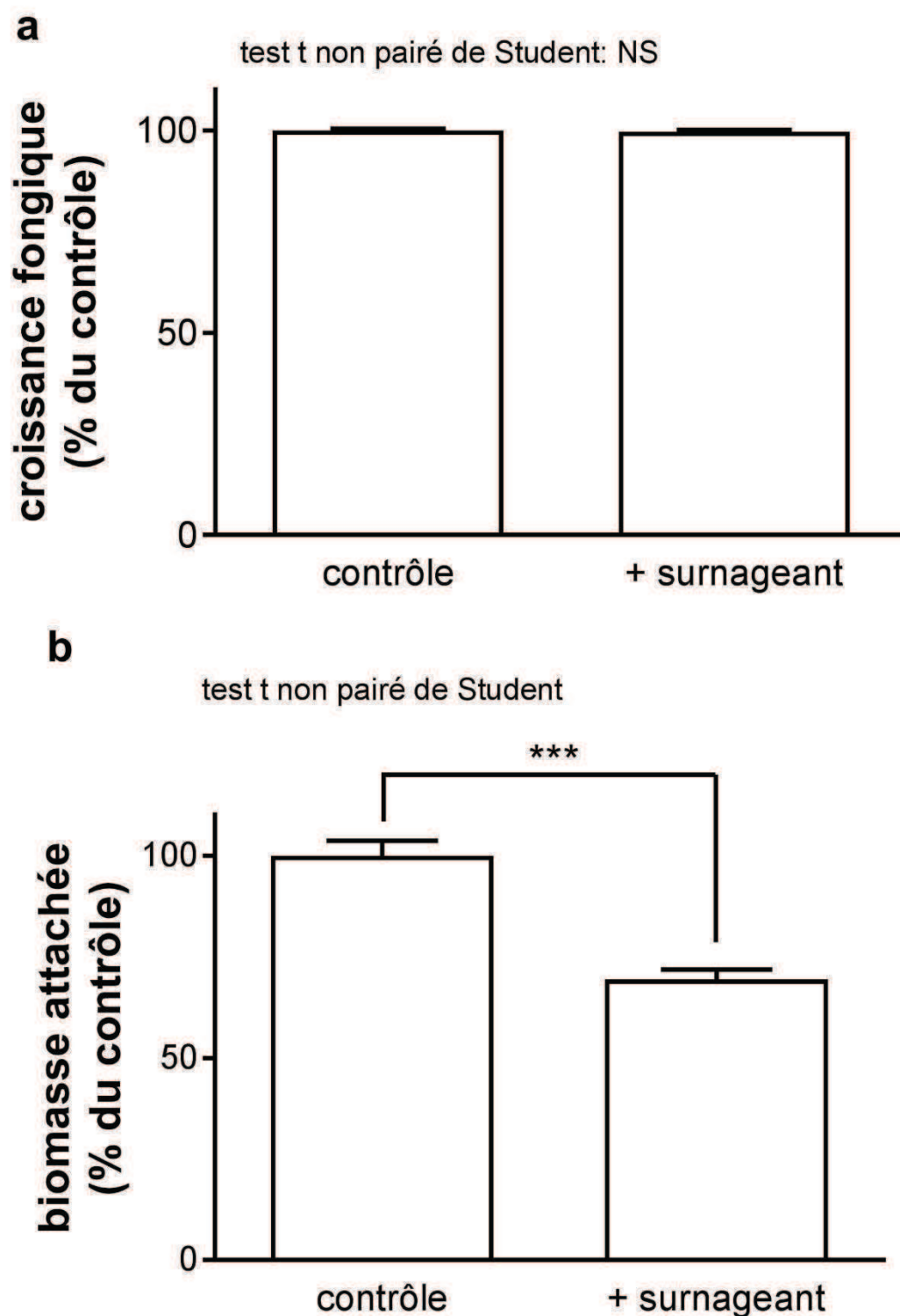


Figure 23. Effet d'un surnageant de culture sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 évaluée par turbidimétrie (a) et sur la formation *in vitro* du biofilm évaluée par la coloration au cristal violet (b) (moyenne \pm SEM, N = 3 expériences indépendantes).

I.2. Protéines exocrines salivaires

Le lysozyme et les peroxydases salivaires sont des protéines exocrines pour lesquelles un effet inhibiteur sur les levures du genre *Candida* a été déjà décrit dans la littérature (*cfr* introduction). Il existe déjà sur le marché des produits d'hygiène dans lesquels ces protéines sont incorporées. Mais les données *in vitro* sont parfois contradictoires et les études cliniques font défaut. Dans le cadre de cette thèse, le lysozyme et la lactoperoxydase ont été investiguées sur la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 et sur des souches cliniques isolées à partir de prothèses dentaires.

I.2.1. Effet du lysozyme sur la formation du biofilm

Du lysozyme purifié à partir de blanc d'œuf de poule fut introduit en quantité croissante dans des cultures de *Candida albicans* (souche de référence ATCC 10231 ou souches cliniques) afin d'étudier son effet sur la formation des biofilms.

Souche de référence. La Figure 24a montre l'effet de différentes concentrations en lysozyme comprises entre 3 à 1000 $\mu\text{g/ml}$ sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 dans un milieu liquide de Sabouraud. Seules les concentrations en lysozyme égales ou supérieures à 300 $\mu\text{g/ml}$ ont réduit la croissance de *C. albicans* (ANOVA complémenté par un test de Dunnett, $p < 0,0001$) ; la réduction à 300 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ était de $5,3 \pm 0,9\%$ et de $9,0 \pm 1,6\%$ respectivement (N = 6 plaques indépendantes avec 8 réplicats pour chacune). Les concentrations en lysozyme inférieures à 100 $\mu\text{g/ml}$ n'ont pas affectées la croissance de *C. albicans*. La Figure 24b illustre l'effet du lysozyme sur la formation du biofilm par la souche de référence dans des plaques 96 puits en polystyrène. Les données montrent un effet biphasique du lysozyme sur la formation du biofilm tandis que la protéine

n'avait que légèrement affecté la croissance de la levure évaluée par turbidimétrie. En effet, le lysozyme avait un effet promoteur de formation de biofilms à la plus forte concentration testée (1000 µg/ml) et un effet limitant la formation de biofilms aux concentrations les plus faibles (3 et 30 µg/ml). A 1000 µg/ml, la biomasse attachée moyenne représentait $266,1 \pm 48,9\%$ (N = 6 plaques indépendantes avec 8 réplicats pour chacune, médiane 252,9%, distribution Gaussienne) par rapport à celle observée pour le contrôle. Toutefois, à 10 µg/ml de lysozyme, la biomasse attachée était $57,8 \pm 8,1\%$ (N = 6 plaques indépendantes avec 8 réplicats pour chacune, médiane : 50,5%, distribution Gaussienne) du contrôle. Une analyse ANOVA avec un test de comparaison multiple de Dunnett et un test-t à un échantillon (*one-sample t-test*) a confirmé l'effet probiofilm de la concentration de 1000 µg/ml en lysozyme ($p < 0,001$). En présence de 3 à 30 µg/ml de lysozyme, la biomasse attachée était significativement différente de la valeur théorique de 100% (*one-sample t-test*, $p < 0.01$) mais une comparaison entre les différentes conditions du lysozyme par un test ANOVA n'a pas révélé de différences significatives.

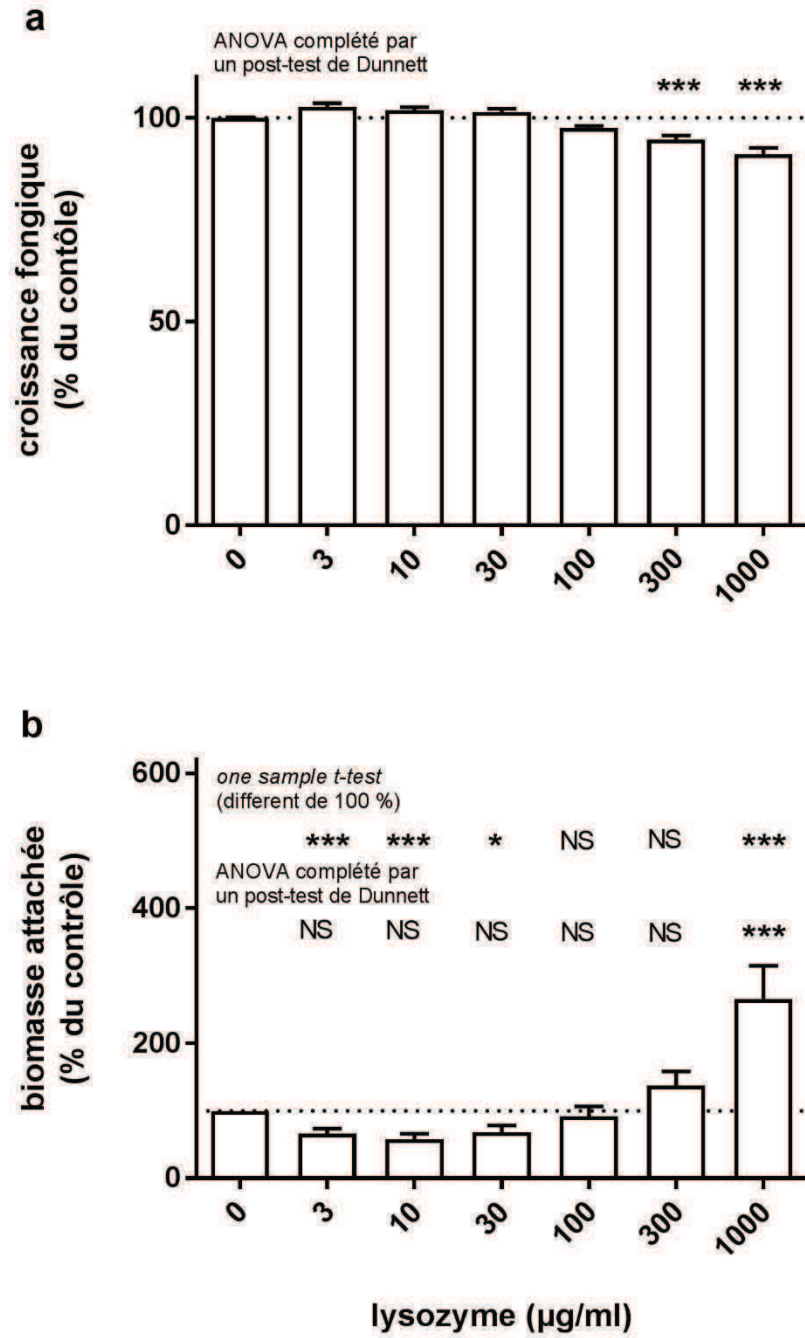


Figure 24. Effet du lysozyme sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 évaluée par turbidimétrie (a) et sur la formation de biofilm évaluée par la coloration au cristal violet (b). Moyenne \pm SEM, N = 6.

Souches cliniques. La figure 25 (a & b) montre des données similaires (à celles de la souche de référence) pour 10 souches cliniques de *C. albicans* isolées de différentes prothèses dentaires. La Figure 25a montre l'absence d'un effet du lysozyme dans le même intervalle de concentration (3 - 1000 µg/ml) sur la croissance des souches cliniques dans un milieu liquide de Sabouraud. Toutefois, une tendance à une légère mais non significative diminution de la croissance fongique a été observée à la concentration du lysozyme la plus élevée (1000 µg/ml). La Figure 25b montre une réponse biphasique des souches cliniques pour la formation des biofilms dans des plaques à 96 puits en présence de lysozyme à des concentrations comprises entre 3 et 1000 µg/ml, comme cela a déjà été décrit *supra* pour la souche de référence ATCC 10231. La stimulation *versus* l'inhibition de la formation de biofilms en présence du lysozyme varie d'une souche à l'autre. Certaines souches caractérisées par une grande production de biofilm en présence d'une forte concentration du lysozyme (1000 µg/ml) ont été faiblement inhibées par des concentrations faibles de la même protéine. Inversement, certaines souches qui sont faiblement productrices de biofilms en présence d'une forte concentration de lysozyme sont plus inhibées par une concentration faible (3 - 30 µg/ml). Une seule souche clinique sur dix a été inhibée par le lysozyme proportionnellement à la concentration en protéine. Dans les 10 souches cliniques isolées de prothèses dentaires (Figure 25b), la biomasse attachée après incubation avec 1000 µg/ml du lysozyme variait de 36,1 à 3825,0% (N = 10) par rapport à celle observée pour le contrôle (moyenne : 548,4%, médiane : 191,4%, distribution non-Gaussienne). Cependant, à 3 µg/ml de lysozyme, la biomasse attachée variait de 26,3 à 114,8% (N = 10) à celle observée pour le contrôle apparié (moyenne ± SEM : 73,8 ± 8,9%, médiane :

73,8%, distribution Gaussienne). La différence de biomasse attachée entre les deux concentrations de lysozyme testées (3 et 1000 µg/ml) est significative aussi bien pour la souche de référence que pour les souches cliniques (test de Mann-Whitney, $p = 0,0006$ et $0,0232$, respectivement). L'augmentation de la quantité du biofilm en présence de 1000 µg/ml de lysozyme n'a pas été significative (test de Mann-Whitney : $p = 0,1399$) pour les souches cliniques, mais la signification a été observée pour la souche de référence ($p = 0,0012$). En revanche, la diminution de l'attachement de la levure en présence de 3 µg/ml de lysozyme était significative malgré deux souches cliniques (sur dix) insensibles (test de Mann-Whitney : $p = 0,0255$). L'effet inhibiteur du lysozyme a été observé jusqu'à 30 µg/ml, ce qui est considéré comme physiologique dans la salive, tandis que des doses non physiologiques supérieures à 100 µg/ml ont augmenté la production du biofilm dans six souches sur 10.

Etude de la cohérence du biofilm en présence du lysozyme. La figure 26 montre les variations de la turbidité des cultures de *C. albicans* ATCC 10231 (24 h à 37°C) dans des plaques à 96 puits après trois lavages successifs avec du NaCl 0,9% stérile. Curieusement, la turbidité (figure 26a) après le premier lavage était de $627,4 \pm 144,4\%$ de celle du milieu de culture après 24 heures d'incubation; la turbidité était encore de $316,3 \pm 59,7\%$ et $230,4 \pm 23,6\%$ de celle du milieu de culture après les deuxième et troisième lavages, respectivement ($N = 4$). En absence d'incubation, la turbidité de la suspension fraîche a subi une diminution progressive pour atteindre une turbidité résiduelle de $1,7 \pm 0,7\%$ ($N = 3$). En présence de 10 µg/ml de lysozyme, l'évolution de la turbidité du liquide de lavage était similaire à celle du contrôle sans lysozyme (figure 26b). Cependant, en présence de 1000 µg/ml de lysozyme, la turbidité du liquide de lavage est restée

proche de celle observée après 24 heures d'incubation et donc avant les étapes de lavage. Une analyse *two-way* ANOVA a révélé que les étapes de lavage et la concentration du lysozyme affectent significativement la turbidité du liquide ($p < 0,0001$). Cependant, les étapes de lavage n'avaient pas le même effet pour les deux concentrations de lysozyme ($p = 0,0101$).

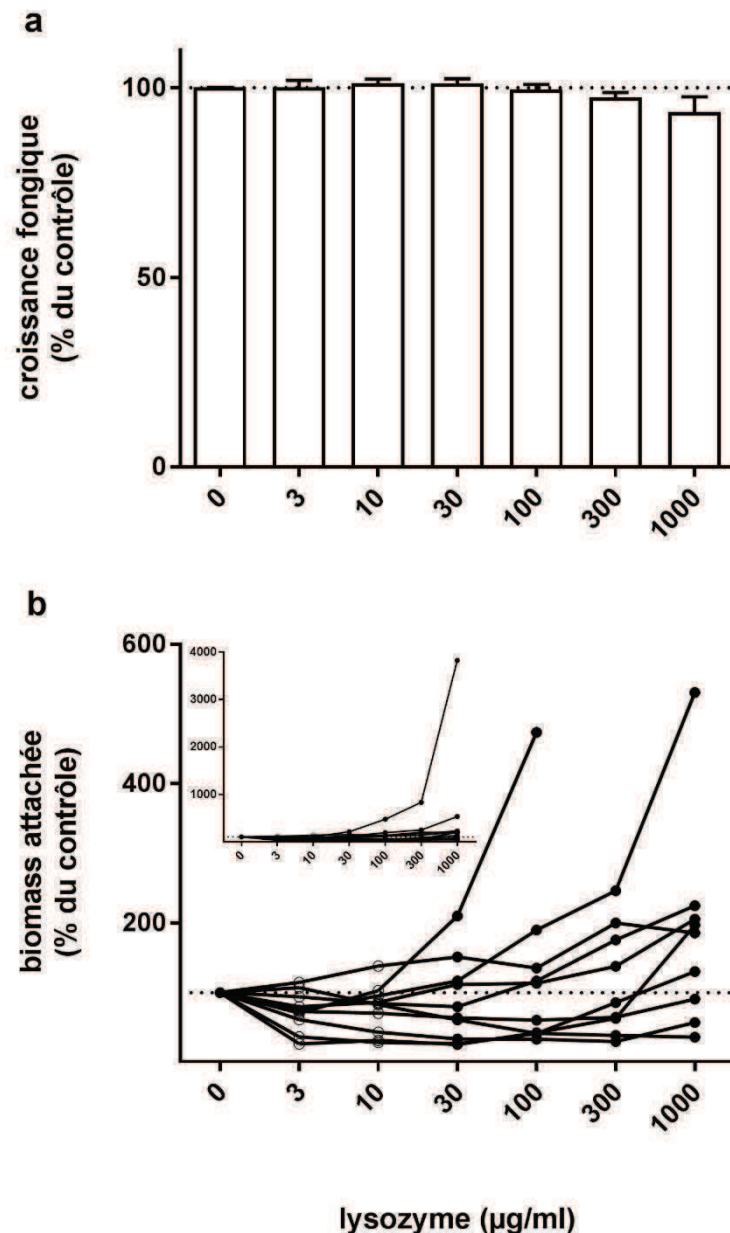


Figure 25. Effet du lysozyme sur la croissance et sur la formation *in vitro* de biofilms pour 10 souches cliniques de *C. albicans*, évaluées par turbidimétrie (a) et par la coloration au cristal violet (b), respectivement. Moyenne \pm SEM, N = 10.

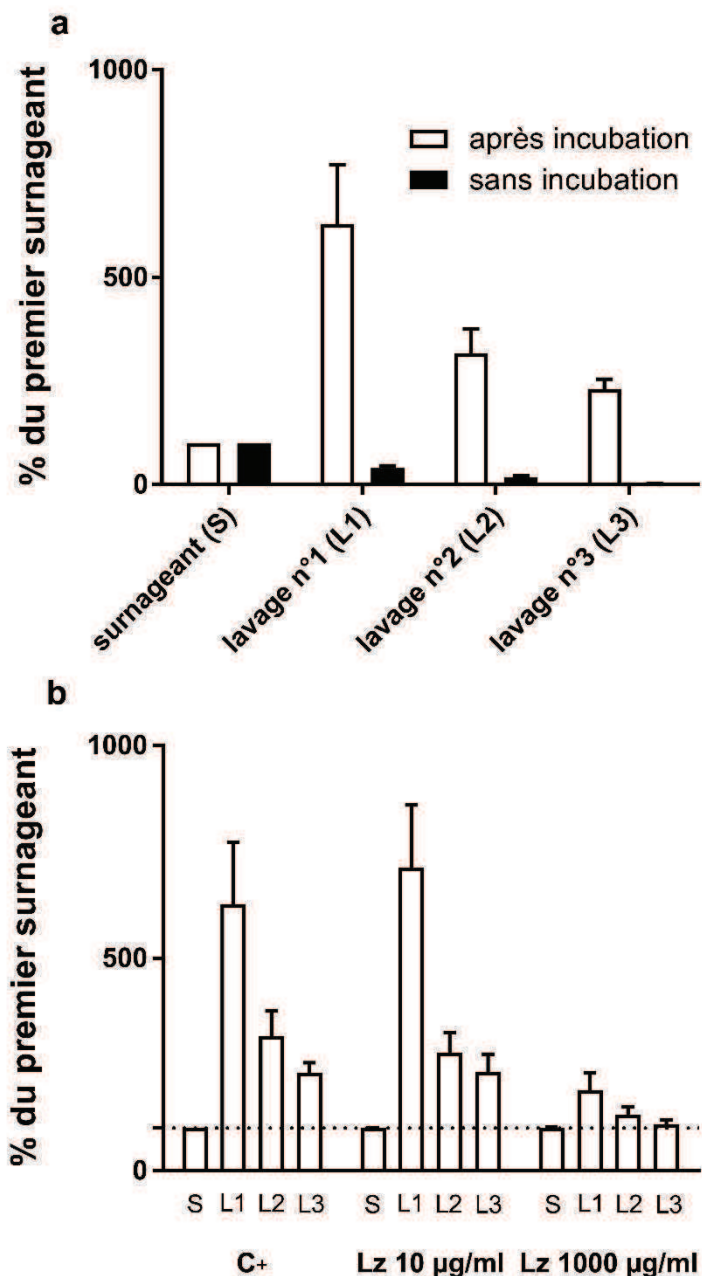


Figure 26. Suivi du processus de lavage (L) de biofilms dans des plaques 96 puits après 24 heures d'incubation en présence de *C. albicans* ATCC 10231. Graphique supérieur (26a) : absorbance à 600 nm lors de chaque étape du processus de lavage. Les puits ont été lavés trois fois avec du NaCl 0,9%. Les barres non colorées correspondent aux puits incubés 24 heures tandis que les barres noires représentent le suivi des puits lavés immédiatement sans incubation préalable. Les données sont exprimées en pourcentage de l'absorbance (600 nm) du premier surnageant, mesuré directement après incubation. Graphique inférieur (26b) : absorbance à 600 nm à chaque étape du processus de lavage pour 3 conditions différentes : contrôle, lysozyme (Lz) 10 µg/ml et 1000 µg/ml.

1.2.2. Effet du lysozyme sur des biofilms formés sur résine

Effet du lysozyme sur des biofilms préformés. Aucun effet du lysozyme n'a pu être démontré (Figure 27) sur des biofilm déjà formés après 24 heures d'incubation. La biomasse attachée fut évaluée par coloration au cristal violet. Aucune différence statistiquement significative (ANOVA, $p = 0,143$) n'est observée pour la formation du biofilm aussi bien à faible qu'à forte concentration en lysozyme (10 $\mu\text{g/ml}$ et 1 mg/ml respectivement). La Figure 27 illustre aussi l'effet du lysozyme, après une incubation de 24 heures, sur la formation du biofilm à *Candida* ATCC 10231 avec de la résine comme support.

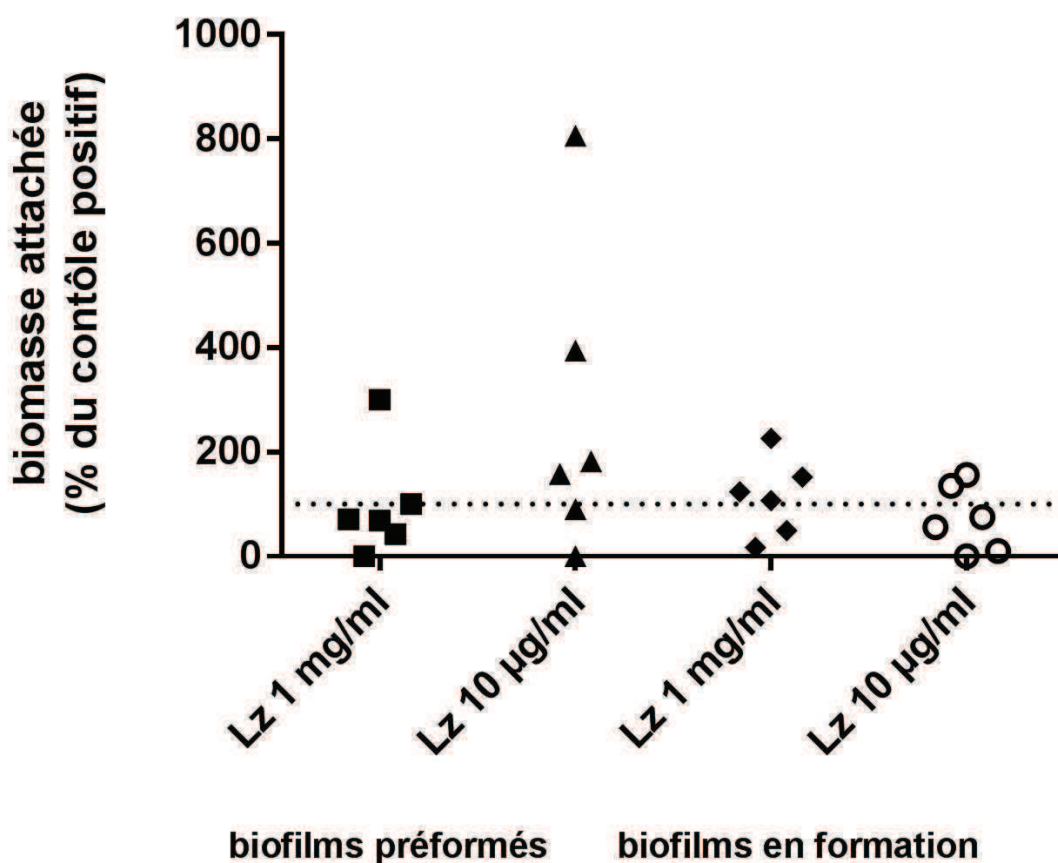


Figure 27. Effet du lysozyme sur la formation du biofilm sur des languettes de résine. Evaluation par coloration au cristal violet (N = 6). L : lysozyme. La ligne pointillée indique la valeur 100% obtenue en absence de lysozyme.

Effet sur l'adhérence des cellules fongiques à la résine. La Figure 28 compare l'adhérence de *C. albicans* aux morceaux de résine (sans et après polissage de la surface) après 4 heures d'incubation à 37°C, en présence des deux concentrations de lysozyme (10 µg/ml et 1000 µg/ml). Le nombre de cellules fongiques adhérentes a été déterminé par ensemencement des languettes sur gélose de Sabouraud et comptage des CFU après 24 - 48 heures à 37°C. Pour chaque languette de résine, la face rugueuse a été analysée séparément de la face lisse. Une fois de plus, la plus forte concentration de lysozyme, contrairement à la plus faible, facilite l'adhérence de *C. albicans* sur les deux types de surfaces de résine. La concentration de 1 mg/ml en lysozyme favorise l'attachement de *Candida* après 4 heures d'incubation à 37°C tant sur la face lisse que la face rugueuse. Cette augmentation est significative (*Wilcoxon signed rank test*) uniquement pour la face rugueuse ; cependant la face lisse montre la même tendance ($p = 0,0781$ proche du seuil 0,05). L'analyse statistique est délicate à cause de la variabilité des résultats d'une part et de la distribution des résultats pas toujours gaussienne d'autre part : un test ANOVA ne montre pas de différence significative. Dans cette série d'expériences, la distribution des données n'a pas montré une distribution gaussienne (attesté par le test de Kolmogorov Smirnov). Le lysozyme à 1000 µg/ml a montré une augmentation jusqu'à 10,0 et 15,7 fois la valeur du contrôle, respectivement, sur le côté rugueux (médiane : 312,3% du contrôle) et le côté lisse (médiane : 184,0% du contrôle) de la languette de résine. Le lysozyme à une concentration de 10 µg/ml n'a pas conduit à des changements significatifs dans le nombre de cellules de levure adhérentes : jusqu'à 4,1 fois pour le côté rugueux (médiane : 184,0% du contrôle) et 2,3 fois pour le côté lisse (médiane : 19,8% du contrôle). Un test de Wilcoxon a démontré que seule la

concentration élevée du lysozyme a fourni une médiane des valeurs au-dessus de la valeur théorique de 100% avec une signification pour le côté rugueux de la résine ($p = 0,0469$) et avec une tendance de signification pour le côté lisse ($p = 0,0781$). Un effet anti-biofilm du lysozyme à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ n'a pas été attesté avec la résine, contrairement aux données obtenues avec le polystyrène. Dans les expériences avec la résine, le polissage de la surface entraîne une réduction du nombre de *Candida* attachés après 4 heures d'incubation. La Figure 29 montre une adhérence statistiquement significative (*Wilcowon signed Rank test*, $p = 0,0247$) plus importante de *Candida* sur la face rugueuse que sur la face lisse.

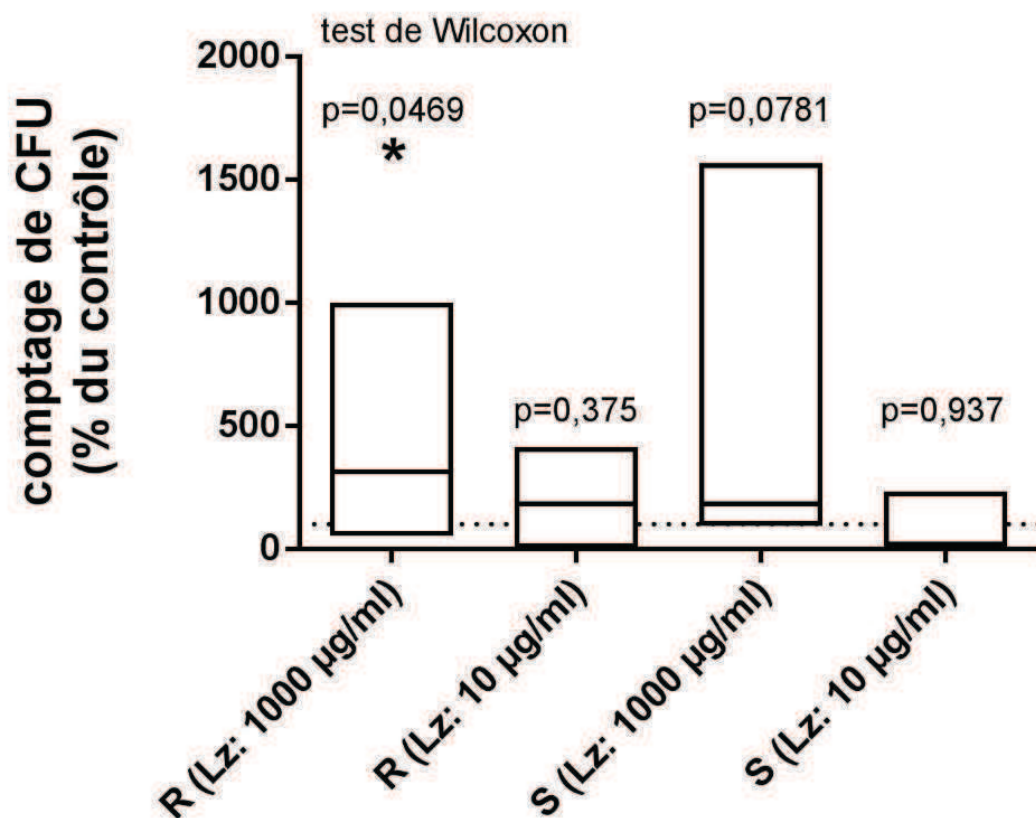


Figure 28. Effet du lysozyme (10 ou 1000 $\mu\text{g/ml}$) sur l'adhérence de *C. albicans* ATCC 10231 sur des languettes de résine (R : face rugueuse non polie, S : face lisse polie).

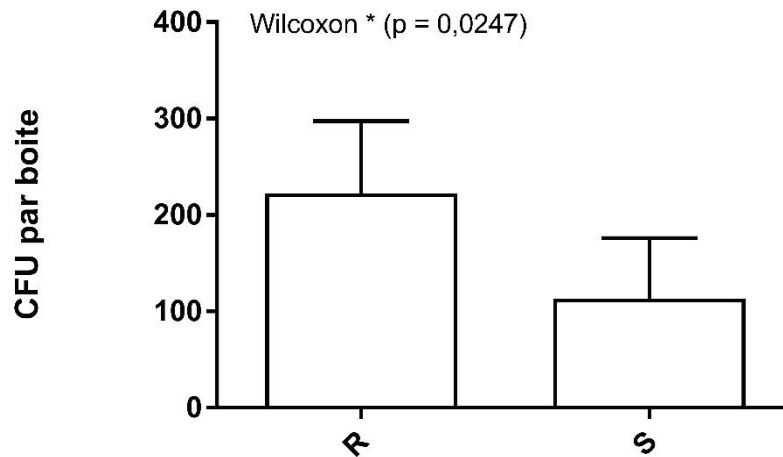


Figure 29. Effet de la rugosité de la résine sur l'adhérence de *Candida*.
R : face rugueuse non polie ; S : face lisse polie.

I.2.3. Effet des hypohalogéneux sur la formation du biofilm

Les systèmes peroxydases dans les sécrétions exocrines sont connus pour leur effet antimicrobien. Une activité peroxydase produit des hypohalogéneux en présence de H_2O_2 . Toutefois, la disponibilité de ce substrat est un facteur limitant pour l'utilisation d'un tel système antimicrobien. *C. albicans* est capable de consommer ce substrat : les deux principales activités enzymatiques citées sont la catalase et la glutathion peroxydase. Cette consommation de H_2O_2 par *C. albicans* a été mise en évidence par cinétique.

Mesure de la consommation de H_2O_2 par *C. albicans*. Une suspension de blastoconidies de *C. albicans* ATCC 10231 diminue l'absorbance à 230 nm de différentes solutions de H_2O_2 . La figure 30a montre que la consommation de H_2O_2 par *C. albicans* ATCC 10231 est directement proportionnelle au nombre de blastoconidies. L'équation de la droite ajustée est $y = 11,3 x$ et le coefficient de régression r est 0,9575. Ces résultats sont représentatifs de 6 expériences indépendantes. La Figure 30b illustre la relation entre le taux de consommation de

H₂O₂ par les cellules de levure et sa concentration initiale, qui peut être assimilée à une hyperbole rectangulaire : $y = 138,6 x / (123,7 + x)$, avec un coefficient de régression r égal à 0,9940. La vitesse maximum (V_{max}) correspond à une concentration de H₂O₂ en dehors de la plage analytique supérieure de la méthode spectrophotométrique (30 mM). La représentation en double inverse Lineweaver-Burk linéarise l'hyperbole rectangulaire (équation d'ajustement : $y = 0,78x - 0,01$; coefficient de régression : $r = 0,9872$), où l'abscisse à l'origine correspondant à $-1 / K_m$ et l'ordonnée à l'origine correspondant à $1 / V_{max}$ ont permis de calculer un K_m apparent de 55,1 mM et une V_{max} théorique de 70,6 nmol/min. La vitesse de la consommation de H₂O₂ a augmenté de 5,7 nmol/min pour $0,5 \times 10^6$ blastoconidies à 28,3 nmol pour $2,5 \times 10^6$ blastoconidies. Le taux de consommation de H₂O₂ par la souche *C. albicans* ATCC 10231 était de $12,1 \pm 2,7$ nanomoles \times min⁻¹ par 10^6 blastoconidies (moyenne \pm SD, N = 8). Les données de 7 souches cliniques de *C. albicans* allaient de 5,5 à 22,3 nanomoles \times min⁻¹ par 10^6 cellules (moyenne \pm SD : $13,1 \pm 5,1$; médiane : 12,2). Cette consommation de H₂O₂ ne variait pas d'une sous-culture à l'autre. La figure 31 compare les résultats obtenus pour trois repiquages (R₁₋₃) successifs de 7 souches cliniques de *C. albicans* : la consommation de H₂O₂ ne diffère pas lors des 3 repiquages en série (ANOVA : $p = 0,8442$, NS) : 13,1, 14,3 et 13,4 nmol/min par 10^6 blastoconidies. Par contre, la figure 32 montre que le glucose présent dans le milieu réactionnel influence la consommation de H₂O₂ par les blastoconidies. L'augmentation de la quantité de glucose dans le mélange réactionnel multiplie de manière significative la consommation de H₂O₂ par les blastoconidies. En effet, l'augmentation de la concentration en glucose allant de 0,1 g/l à 10 ou 20 g/l multiplie de manière

significative (ANOVA complétée par un test de Bonferroni : $p < 0,01$) la consommation de H_2O_2 de 1,5 et 1,8 fois respectivement.

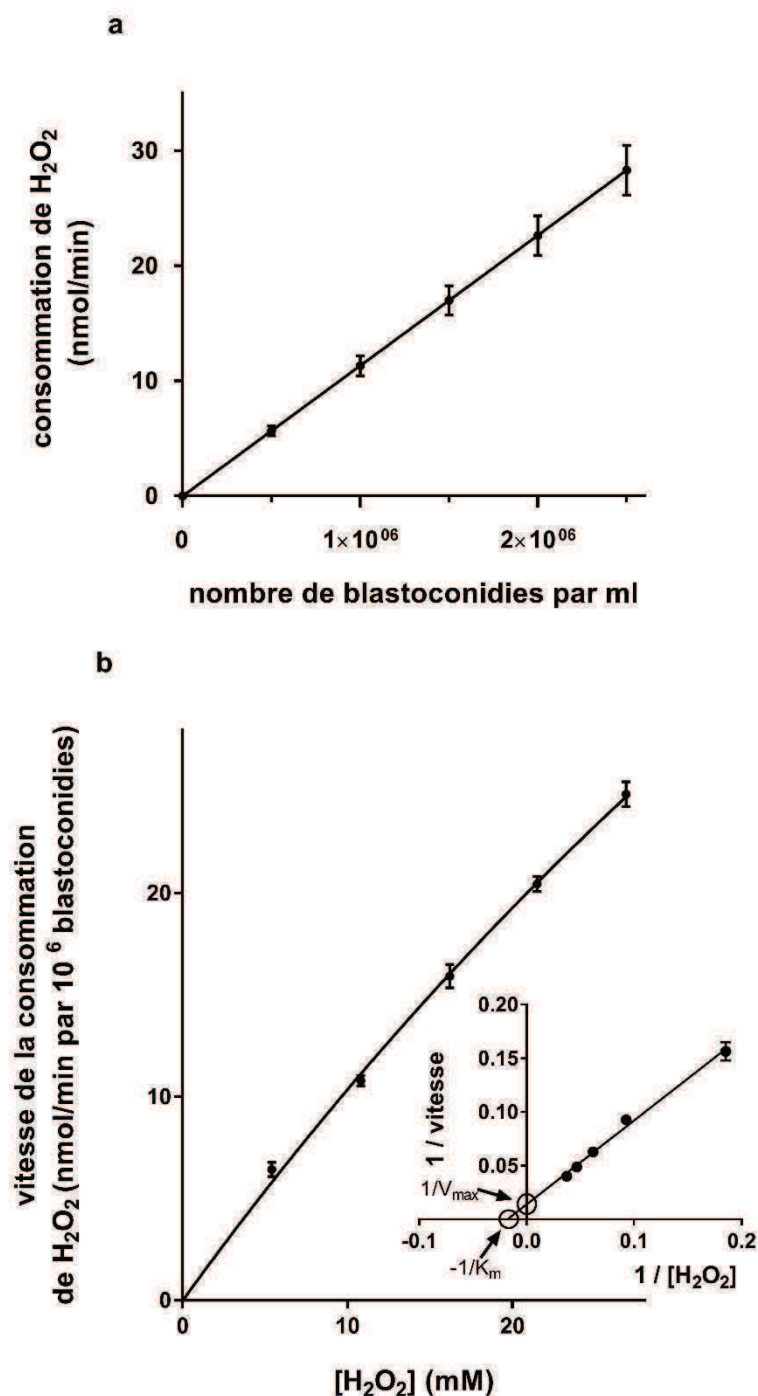


Figure 30. Consommation de H_2O_2 par les blastoconidies de *C. albicans* ATCC 10231. (a) relation entre le taux de disparition de H_2O_2 et le comptage de blastoconidies. (b) aspects cinétiques de la consommation de H_2O_2 par les blastoconidies de *C. albicans* ATCC 10231 avec représentation de Lineweaver-Burk en insert.

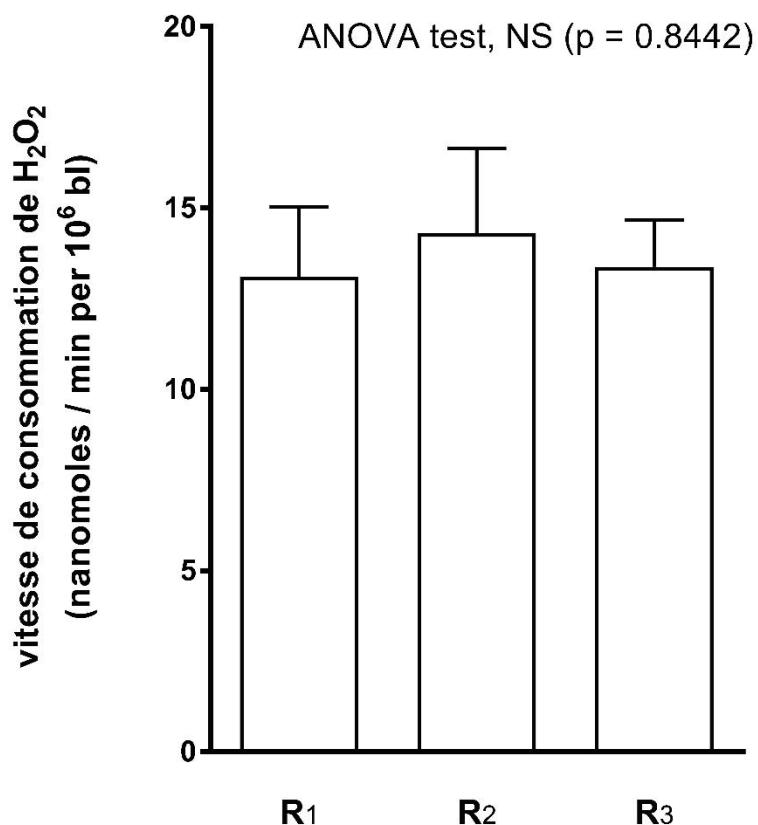


Figure 31. Vitesse de la consommation de H₂O₂ par 3 sous-cultures successives (R₁₋₃) de souches cliniques de *C. albicans* (N = 7).

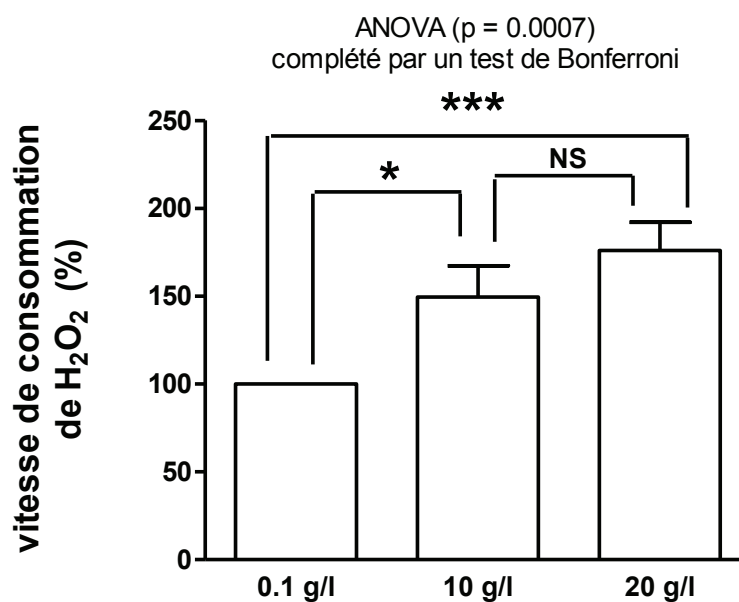


Figure 32. Consommation de H₂O₂ par min par des souches cliniques de *C. albicans* en présence de 3 concentrations différentes de glucose. Les données sont exprimées en pourcentage de la valeur trouvée à la plus faible concentration en glucose.

Mesure de la production de H₂O₂ par G / GOD. Le Tableau VIII présente des données relatives à la production de H₂O₂ par la séquence glucose / glucose oxydase (1,2 U/ml et 12 U/ml) après une incubation de 30 min dans H₂O. A 37°C, 12 U/ml d'activité GOD a induit une plus forte production de H₂O₂ (1,04 ± 0,04 pmol / ml, N = 7) qu'à 1,2 U/ml de solution (0,45 ± 0,02 pmol / ml, n = 7) : le test t non pairé montre une différence hautement significative (p <0,0001). Les Figures 33a et 33b examinent la production de H₂O₂ dans un milieu aqueux par la GOD en fonction de la quantité d'enzyme (34a) et en fonction du temps (34b). En présence de 44,4 mM de glucose, l'augmentation de l'activité GOD (selon une progression géométrique de 12 mU/ml à 12 U/ml) multiplie la production de H₂O₂ (après 30 min à 37°C) par un facteur proche de 15.

	GOD (1,2 U/ml)	GOD (12,0 U/ml)
[H ₂ O ₂] (µmol/ml)	0,36 – 0,52 (N = 7)	0,90 – 1,20 (N = 7)
valeur médiane (µmol/ml)	0,49	1,05
valeur moyenne (µmol/ml)	0,45 ± 0,02	1,04 ± 0,04
CV (%)	14,2	10,5

Tableau VIII. Concentration de H₂O₂ atteinte après une incubation de 30 min de glucose (44,4 mM) et de glucose oxydase (1,2 ou 12,0 U/ml) dans de l'eau distillée à 37°C. H₂O₂ a été dosé par la méthode à la lucigénine.

Catabolisme de H₂O₂ par la catalase. La figure 34 illustre l'inhibition de la croissance en milieu liquide de *C. albicans* ATCC 10231 en présence de glucose (155 mM) / glucose oxydase (12 U/ml) du système après incubation pendant 5 heures. L'absorbance à 600 nm était de 0,170 ± 0,004 (N = 6) dans les suspensions de contrôle, mais seulement de 0,033 ± 0,002 (19,4 ± 1,3% du contrôle, N = 6) en présence de G / GOD (12 U/ml). L'addition de catalase (5000 U/ml) à la solution G / GOD éliminait cet effet inhibiteur, l'absorbance étant alors

égale à $0,185 \pm 0,007$ ($108,8 \pm 4,9\%$ du contrôle, $N = 6$) après 5 heures d'incubation. En présence de G / GOD sans catalase, l'inhibition de la croissance était statistiquement significative (ANOVA complété par un post-test de Bonferroni : $p < 0,001$) du contrôle et des conditions G / GOD / catalase. Ces résultats ont été recalculés à partir des données de *Ahariz*, 2010.

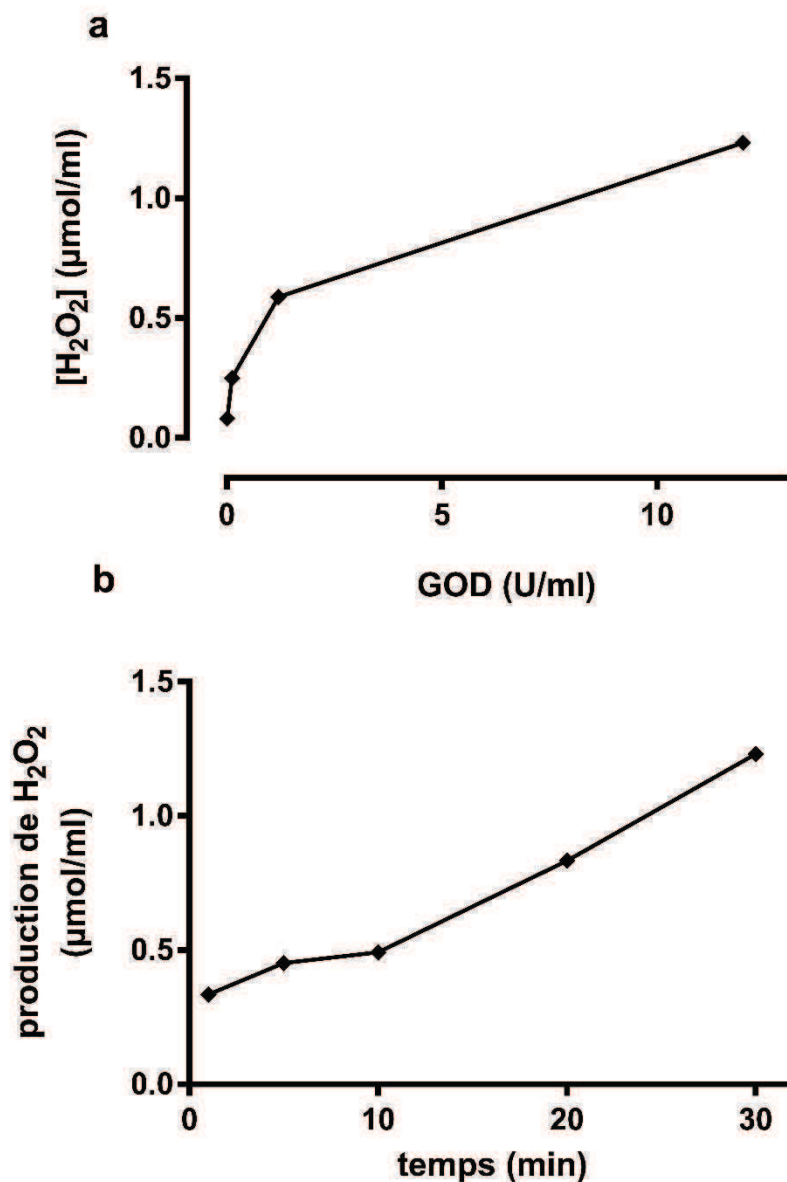


Figure 33. (a) H₂O₂ (µmol/ml) produit par G / GOD (12 mU à 12 U) après 30 minutes d'incubation. (b) Production de H₂O₂ (µmol/ml) en présence de 12 U/ml GOD en fonction du temps. Dosage par chimiluminescence en présence de lucigénine.

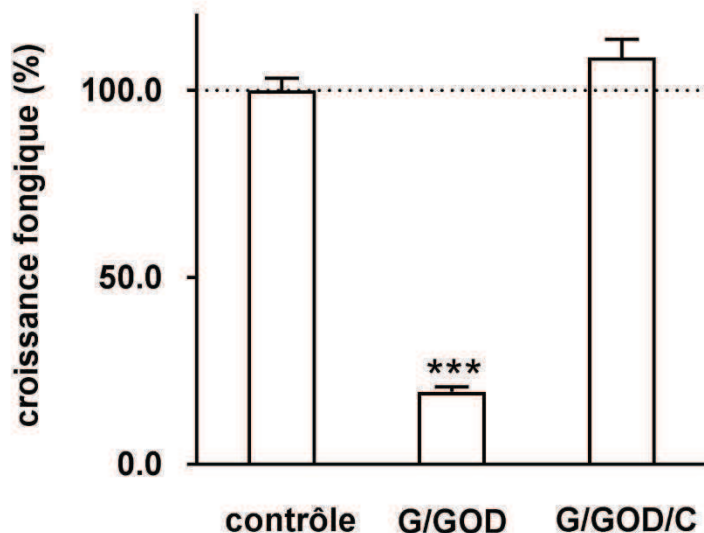


Figure 34. Effet de la catalase (C) sur l'inhibition de la croissance de *C. albicans* par la séquence glucose (G) / glucose oxydase (GOD). Conditions expérimentales : GOD : 12 U/ml ; incubation : 5 heures. Données reprises de Ahariz, 2010.

La figure 35 montre le taux de survie des levures planctoniques en présence du système LPO / G / GOD / KI en fonction de la quantité de H₂O₂ produit par de la GOD en 30 min d'incubation. Le système a été évalué sur 2 suspensions différentes de *Candida* : l'une contenait 10⁷ blastoconidies par ml et l'autre 10⁸ blastoconidies par ml. La première suspension est très sensible au système peroxydase, tandis que la seconde est plus résistante. La figure 35 présente les valeurs moyennes des 7 expériences indépendantes.

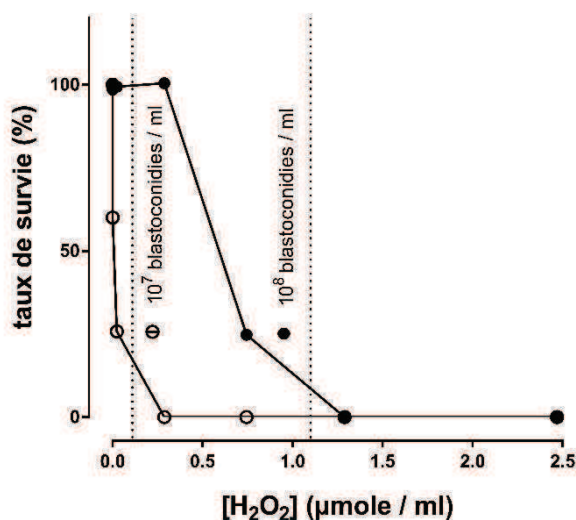


Figure 35. Effet de H₂O₂ (μmoles/ml) sur le taux de survie (%) de *C. albicans* ATCC 10231 dans 2 suspensions contenant respectivement 10⁷ (○) et 10⁸ (●) blastoconidies/ml. Le taux de survie est évalué par comptage de CFU. Les lignes pointillées indiquent la consommation théorique de H₂O₂ par les blastoconidies de chaque suspension.

Production d'oxydants hypohalogéneux. Un nouveau procédé de production de composés hypohalogéneux a été mis au point pour éviter la compétition entre la consommation par *Candida* et la lactoperoxydase pour H₂O₂. Ce procédé consiste à plonger un sachet poreux (ressemblant à un sachet de thé en papier) contenant de la lactoperoxydase adsorbée sur des particules inertes dans une solution tampon phosphate pH 7,40. Les substrats (thiocyanate, iode et peroxyde d'hydrogène) sont alors ajoutés. La Figure 36 et le Tableau IX illustrent le pouvoir candidacide de cette solution oxydante qui contenait en moyenne 2000 ± 72 µM de composés hypohalogéneux (OSCN⁻/OI⁻). Une telle solution oxydante détruit jusqu'à 10⁶ blastoconidies voire plus (une expérience isolée a montré un effet candidacide total sur 20 x 10⁶ blastoconidies). Le Tableau IX indique aussi la concentration moyenne en hypohalogéneux obtenue lors de 9 préparations consécutives, le nombre de blastoconidies inhibées et le taux de survie après 5 min d'incubation.



Figure 36. Taux de survie de *C. albicans* ATCC 10231 après 5 min d'incubation dans une solution d'hypohalogéneux.

[oxydants] (µM)	nombre de bl/ml	survie (%)
2026 ± 76 (N = 9)	0,51 ± 0,06 x 10 ⁶ (N = 9)	0 ± 0 (N = 9)

Tableau IX. Taux de survie de *C. albicans* ATCC 10231 après 5 min d'incubation dans une solution d'hypohalogéneux.

Concentration minimale inhibitrice des composés hypohalogéneux. La *concentration minimale inhibitrice* (CMI) des hypohalogéneux (OSCN⁻/OI⁻) a été évaluée pour la croissance en milieu liquide et celle des cellules sessiles (SCMI) pour la formation de biofilms sur la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 et sur des souches cliniques isolées à partir de prothèses dentaires.

Souche de référence. La Figure 37 (a & b) montre l'effet de différentes concentrations (de 30 à 1000 µM) en hypohalogéneux sur la croissance et sur la formation de biofilms dans les puits d'une plaque 96-puits en polystyrène par la souche de collection *C. albicans* ATCC 10231. Les données de chaque expérience indépendante ont été normalisées par rapport à la moyenne des contrôles positifs de l'expérience, permettant ainsi à la fois d'estimer la variabilité des résultats au sein de chaque condition par rapport au contrôle et d'éviter le biais de la variabilité entre expériences. La turbidité du milieu de culture (Figure 37a) dans tous les puits contrôles représente une absorbance à 600 nm de $0,785 \pm 0,007$ (CV = 7,8% ; N = 86 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 2,2%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), des concentrations de composés hypohalogéneux oxydants (OSCN⁻/OI⁻) égales ou inférieures à 250 µM ne modifient pas la turbidité observée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés : l'absorbance à 600 nm après 24 heures d'incubation à 37°C varie alors entre $99,8 \pm 1,3\%$ à $102,1 \pm 1,7\%$ de celle observée pour les contrôles (test de Dunnett, NS). Une concentration en hypohalogéneux supérieure à 250 µM supprime significativement la croissance évaluée par turbidimétrie (test ANOVA complété par un test de Dunnett : $p < 0,001$). La Figure 37b évalue la biomasse

attachée sur la paroi interne des puits après coloration au cristal violet. Les contrôles positifs présentent après coloration et dilution 10 fois une absorbance de $0,730 \pm 0,050$ (CV = 62,7%, N = 84 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles (précision *intra-assay*) vaut 50,2%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), les résultats obtenus en présence d'hypohalogéneux montrent une diminution statistiquement significative (test ANOVA complété par un post-test de Dunnett : $p < 0,001$) pour les concentrations comprises entre 250 et 1000 μM . L'inhibition est totale pour 500 et 1000 μM tandis qu'à 250 μM , il reste $17,4 \pm 4,6\%$ (N = 6) de la biomasse moyenne des contrôles positifs appariés.

Souches cliniques. L'effet des oxydants sur la croissance fongique et sur la formation de biofilms est similaire sur des souches cliniques isolées à partir de l'intrados de prothèses dentaires (Figure 38 a & b). La turbidité (Figure 38a) du milieu de culture dans tous les puits contrôles représente une absorbance à 600 nm de $0,885 \pm 0,006$ (CV = 7,1%; N = 94 en 6 expériences indépendantes). Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne, le coefficient de variation des contrôles vaut 13,7%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), des concentrations en hypohalogéneux comprises entre 31 μM et 250 μM ne modifient pas la turbidité observée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés : l'absorbance à 600 nm après 24 heures d'incubation à 37°C varie entre $93,6 \pm 4,4\%$ à $100,1 \pm 0,4\%$ de celle observée pour les contrôles (test de Dunnett, NS). Des concentrations plus élevées en hypohalogéneux (500 et 1000 μM) inhibent significativement

78,1 ± 8,8% et 99,4 ± 0,6% respectivement de la croissance contrôle évaluée par turbidimétrie (ANOVA complété par un post-test de Dunnett : $p < 0,001$).

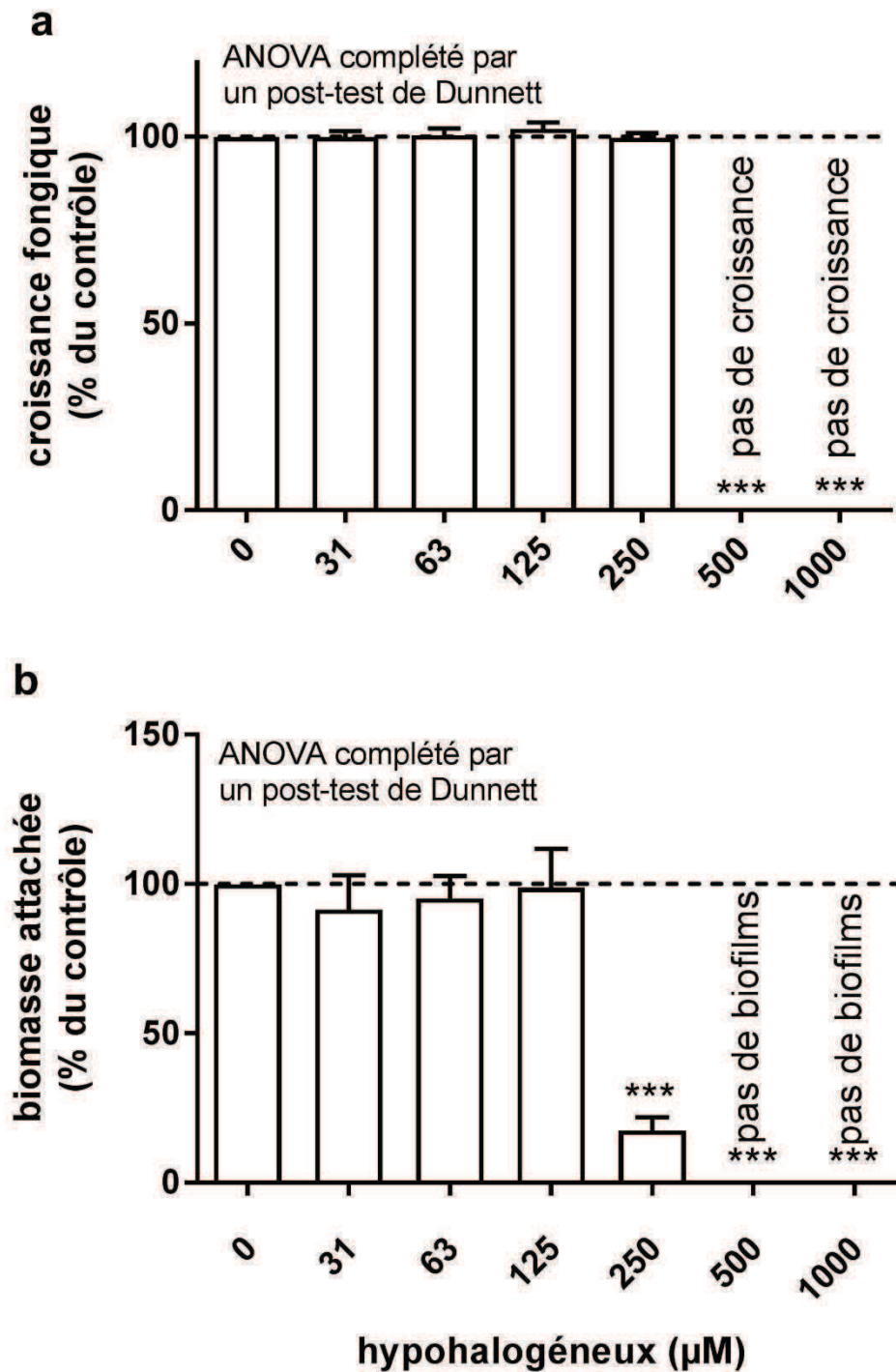


Figure 37. Effet de la solution d'oxydants sur la croissance de *C. albicans* ATCC 10231 évaluée par turbidimétrie (a) et sur la formation *in vitro* du biofilm évaluée par la coloration au cristal violet (b). Moyenne ± SEM, N = 6.

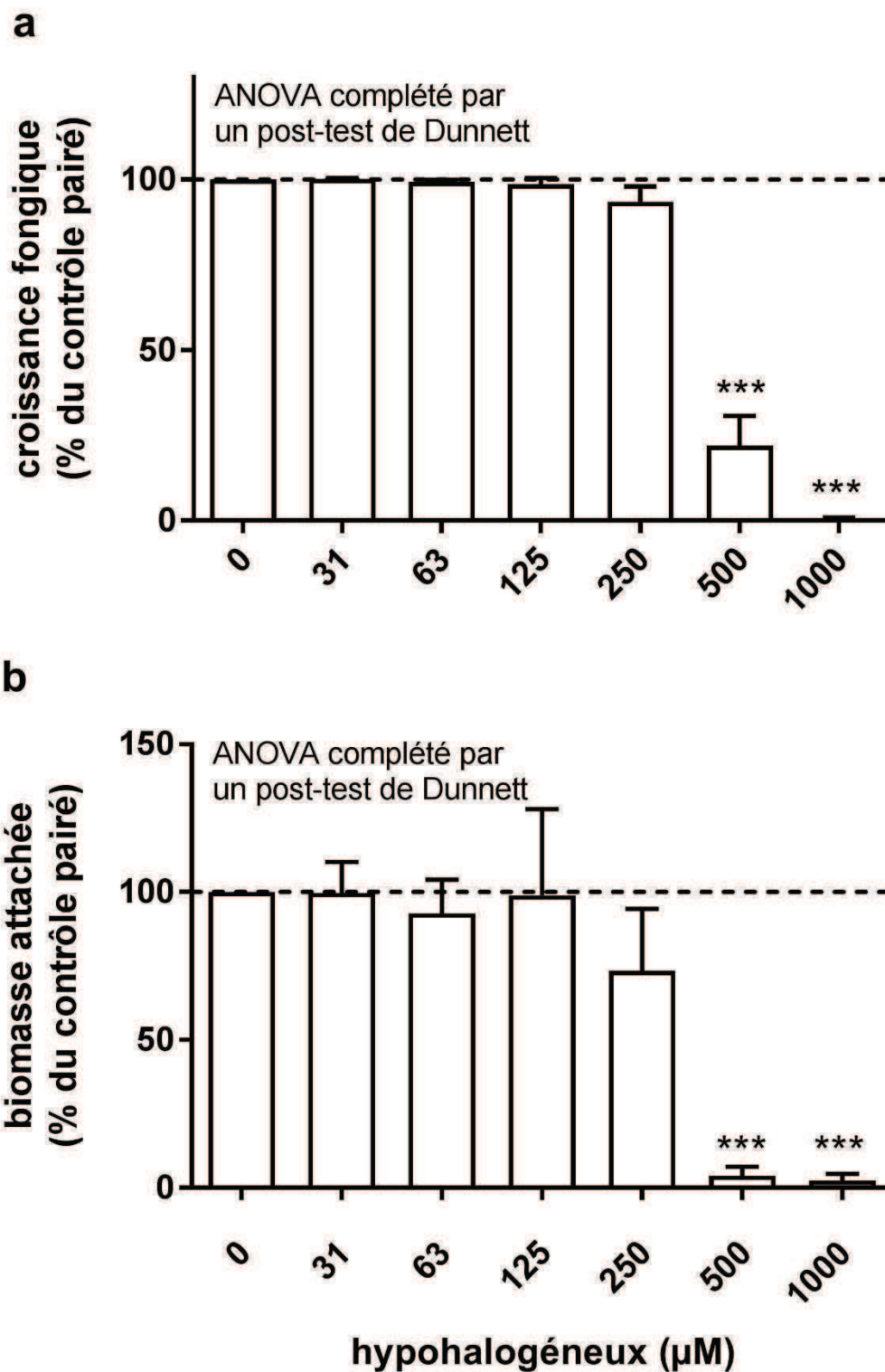


Figure 38. Effet de la solution d'oxydants sur la croissance et sur la formation *in vitro* du biofilm de 6 souches cliniques de *C. albicans*, évaluées par turbidimétrie (a) et par la coloration au cristal violet (b), respectivement. Moyenne \pm SEM.

La Figure 38b évalue la biomasse attachée sur la paroi interne des puits après coloration au cristal violet. Après normalisation des valeurs contrôles de chaque expérience par rapport à leur moyenne du jour, le coefficient de variation des contrôles vaut 38,8%. Si on considère les moyennes par expérience (N = 6), des concentrations en hypohalogéneux comprises entre 31 μ M et 250 μ M ne modifient pas la biomasse attachée, observée dans les puits par rapport à la moyenne des contrôles appariés : l'absorbance à 600 nm après 24 heures d'incubation à 37°C varie entre $73,3 \pm 21,0\%$ à $99,7 \pm 10,5\%$ de celle observée pour les contrôles (test de Dunnett, NS). Des concentrations plus élevées en hypohalogéneux (500 et 1000 μ M) inhibent significativement $96,0 \pm 3,0\%$ et $97,5 \pm 2,3\%$ de la biomasse attachée contrôle évaluée par la méthode au cristal violet (ANOVA complété par un post-test de Dunnett : $p < 0,001$).

Effet de différentes protéines salivaires. La Figure 39 compare l'action de 3 protéines exocrines sur la croissance (Figure 39a) de *C. albicans* en milieu liquide et sur la formation de biofilms (Figure 39b) : le lysozyme (10 μ g/ml), la lactoferrine (10 μ g/ml) et la lactoperoxydase (187 μ g/ml) proche de la sialoperoxydase. Ces résultats mènent à la conclusion qu'une protéine exocrine seule n'entraîne pas d'inhibition de la croissance turbidimétrique (de 98,1 à 99,1% du contrôle). Par contre, la lactoperoxydase avec ses substrats (thiocyanate et peroxyde d'hydrogène produit par de la glucose oxydase) inhibe $98,9 \pm 0,4\%$ de la croissance contrôle. La séquence glucose / glucose-oxydase produisant du peroxyde d'hydrogène dans les conditions expérimentales réduit la croissance à seulement $61,1 \pm 0,5\%$ du contrôle. L'addition de lysozyme et / ou de lactoferrine au système peroxydase actif induit une inhibition supérieure à 99,5%. Les données recueillies pour la formation des biofilms sont surprenantes à plus d'un

titre. La lactoferrine ne présente pas d'effet antibiofilm au contraire du lysozyme pour une concentration de 10 µg/ml. La lactoperoxydase seule présente un effet inexpliqué puisqu'il fût obtenu en absence des substrats. Le système peroxydase complet présente un effet anti-biofilm plus marqué que la séquence glucose / glucose oxydase seule. L'association des 3 protéines exocrines (substrats de la lactoperoxydase compris) limite mieux la formation de biofilms. Toutes ces différences sont attestées par un ANOVA ($p < 0,0001$) complété par un post-test de Dunnett.

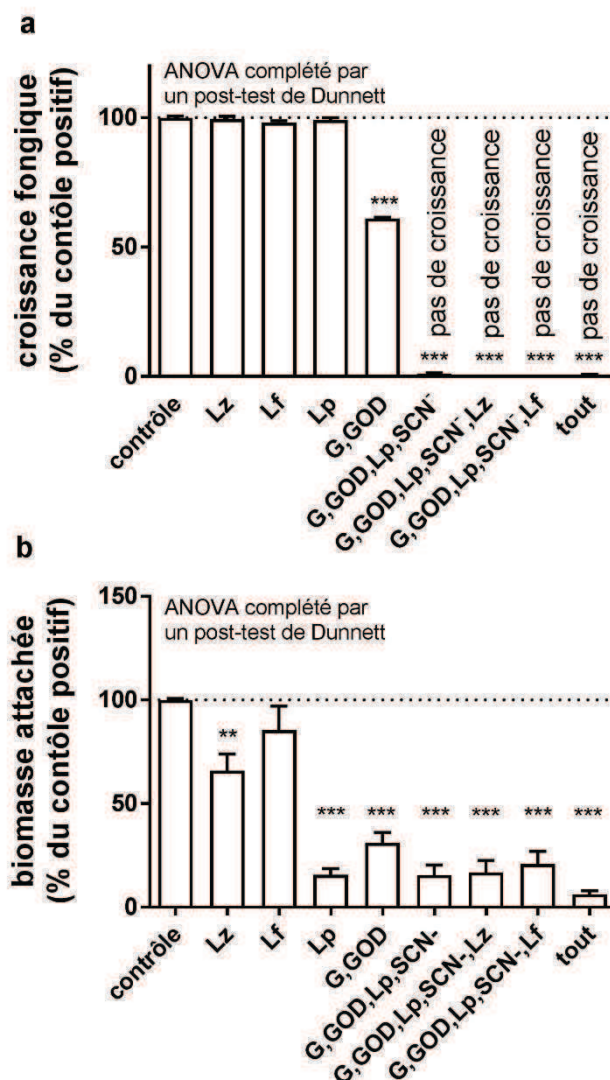


Figure 39. Evaluation de l'effet de 3 protéines exocrines sur la croissance et la formation de biofilms (moyenne \pm SEM, N = 24 en 3 expériences indépendantes).

II. Etude ex vivo

II.1. Caractéristiques de l'essai clinique

Le Tableau X détaille le nombre de patients (avec une prothèse contaminée par *Candida*) approchés, recrutés puis enrôlés pour une étude clinique dans les services de gériatrie et de prothèse dentaire de l'Hôpital Erasme à Bruxelles.

nombre de ...	total	groupe test	groupe contrôle
... patients testés	46	23	23
... patients avec une prothèse contaminée par <i>Candida</i>	27	12	15
... patients enrôlés	46	23	23
... patients ayant terminé	46	23	23
... abandon	0	0	0

Tableau X. Nombre de patients à chaque étape du processus d'enrôlement de l'étude clinique.

II.2. Données socio-anthropométriques

Le Tableau XI ci-dessous présente la répartition selon le genre et la distribution des âges pour les patients qui ont accepté de s'engager dans cette étude clinique. Les âges moyens des 2 groupes étaient 74,3 ans pour le groupe contrôle (N = 23, médiane : 68,0 ans) et 79,5 ans pour le groupe test (N = 23, médiane : 82,0 ans). Les âges moyens des patients *Candida* + étaient 74,2 ans pour le groupe contrôle (N = 15) et 77,5 ans pour le groupe test (N = 12).

II.3. Données cliniques

Les Tableaux XII et XIII résument les données de l'examen bucco-dentaire des patients recrutés, les observations de leur prothèse amovible ainsi que les méthodes d'hygiène utilisées. On ne note pas d'influence des techniques d'hygiène sur la contamination des prothèses par *Candida* à Bruxelles comme déjà signalé pour l'étude à Tlemcen.

âge (année)	groupe test		groupe contrôle	
	consultation	hospitalisation	consultation	hospitalisation
< 61	2	0	6	0
61 - 70	2	0	8	0
71 - 80	4	1	3	2
81 - 90	4	9	1	2
> 90	0	1	0	1
moyenne ± SD (N)	72,3 ± 11,5	86,6 ± 3,7	63,9 ± 10,6	84,6 ± 8,6
médiane	76,5	88,0	64,0	83,0
nombre de femmes	3	4	14	4
nombre d'hommes	9	7	4	1

Tableau XI. Données socio-anthropométriques.

bilan bucco-dentaire des patients enrôlés			
	groupe test	groupe contrôle	total
rien à signaler	22	23	45
candidose	0	0	0
maladie de la bouche	0	0	0
bouche sèche	1	0	1
description de la prothèse supérieure			
	groupe test	groupe contrôle	total
partielle en résine	3	2	5
partielle squelettique	1	6	7
complète en résine	18	8	26
description de la prothèse inférieure			
	groupe test	groupe contrôle	total
partielle en résine	0	2	2
partielle squelettique	3	2	5
complète en résine	0	1	1

Tableau XII. Bilan bucco-dentaire des patients enrôlés et description des prothèses testées.

nettoyage de la prothèse	groupe <i>Candida</i> +	%	groupe <i>Candida</i> -	%
brossage à l'eau	3	11,1	4	21,1
brossage au dentifrice	18	66,7	11	57,9
pastille effervescente	14	51,9	7	36,8
bain de bouche	9	33,3	9	47,4
autre (javel)	0	0,0	1	5,3

Tableau XIII. Bilan des méthodes de nettoyage des prothèses testées par les patients enrôlés.

II.4. Données mycologiques

Taux de colonisation des prothèses dentaires par des levures. Le taux de colonisation des prothèses était de 58,7% chez les patients examinés dans le cadre de cette étude (N = 46) : ces données sont résumées dans le Tableau XIV. Une étude préliminaire (*Vanden Abbeele et al.*, 2008) avait montré un taux de 75,9% (N = 87).

	groupe test	groupe contrôle	total (N = 27)
nombre de patients testés	23	23	46
nombre de patients <i>Candida</i> +	12	15	27

Tableau XIV. Nombre de prothèse contaminée par *Candida*.

Chez 55,6% des porteurs d'une prothèse contaminée, la colonisation de celle-ci était supérieure à 50 CFU par boîte. On dénombrait en effet 15 patients dont le frottis de prothèse ramenait plus de 50 CFU et moins de 10000 CFU. Plus de la moitié des patients (85,2%, N = 23 pour un total de 27 patients appareillés) chez qui des levures avaient été observées au niveau de la prothèse, montrait une contamination *monospecies* (une seule espèce de levure sur base de la couleur des colonies macroscopiques observée sur milieu CHROMagar®), les 14,8% (N = 4 pour un total de 27 patients édentés) restant étaient colonisés par plusieurs espèces (2 ou 3 espèces de levures différentes). Lors d'une étude préliminaire (*Ahariz*, 2012), 14 patients sur 23 (soit 60,9%) étaient contaminés par au moins 2 espèces différentes de levures.

Identification des souches de *Candida*. L'espèce *albicans* est retrouvée dans 74,1% des cultures positives (N = 27). Une étude préliminaire (*Ahariz*, 2012) avait montré que 73,9% des patients en étaient porteurs (N = 23). Le Tableau XV détaille les différentes espèces identifiées. Comme déjà décrit dans la littérature, *C. glabrata* est l'espèce la plus souvent rencontrée après *C. albicans*.

L'association *C. albicans* plus *C. glabrata* fut retrouvée chez 11,1% des patients *Candida* positif.

	groupe test		groupe contrôle		total (N = 27)	
	nombre	(%)	nombre	(%)	nombre	(%)
<i>C. albicans</i>	9	56,3	11	68,6	20	74,1
<i>C. glabrata</i>	4	25,0	1	6,3	5	18,5
<i>C. tropicalis</i>	0	0,0	1	6,3	1	3,7
autres	3	18,8	3	18,8	6	22,2

Tableau XV. Fréquence des espèces de *Candida* identifiées chez 27 porteurs de prothèse contaminée.

Les données socio-anthropométriques (âge et sexe), la description des prothèses testées, les données mycologiques (espèce de *Candida* ; portage *mono-* ou *pluri-species*) ainsi que les méthodes de nettoyage montrent que les 2 groupes de l'étude clinique sont comparables. Cependant, leur distribution n'est pas toujours gaussienne, à la vue de l'écart entre moyenne et médiane.

II.5. Effet candidacide de la solution d'oxydants

Un seul trempage de 5 minutes dans la solution d'ions hypohalogéneux entraîne une diminution d'au moins 1 unité logarithmique du nombre de CFU dans 7 cas sur 12 (soit 58,3%) alors qu'un trempage dans de l'eau n'a aucun effet sur la colonisation de la prothèse (Tableau XVI). Cet effet est statistiquement significatif (Chi carré, $p = 0,0006$, Test de Fisher, $p = 0,0009$). Une diminution d'au moins une unité logarithmique correspond à une diminution de plus de 90% des CFU comptées initialement.

nombre de cas ...	groupe test	groupe contrôle
avec réduction de 1 unité logarithmique	7	0
sans réduction de 1 unité logarithmique	5	15

Tableau XVI. Effets des solutions test et contrôle sur le portage de *Candida*.

Les prothèses dentaires du groupe contrôle furent également soumises à un trempage final de 5 min dans la solution d'ions hypohalogéneux puis à un ré-écouvillonnage. Le Tableau XVII montre que 60% des prothèses du groupe contrôle trempées secondairement dans la solution active pendant 5 min connaissent aussi une diminution de l'ordre d'1 unité logarithmique. Le pourcentage de prothèses ayant alors montré une réduction est similaire à celui observé dans le groupe test.

nombre de cas ...	groupe contrôle après trempage dans H₂O puis après trempage dans la solution d'oxydants
avec réduction de 1 unité logarithmique	0	9
sans réduction de 1 unité logarithmique	15	6

Tableau XVII. Effets de la solution test sur les prothèses contrôles.

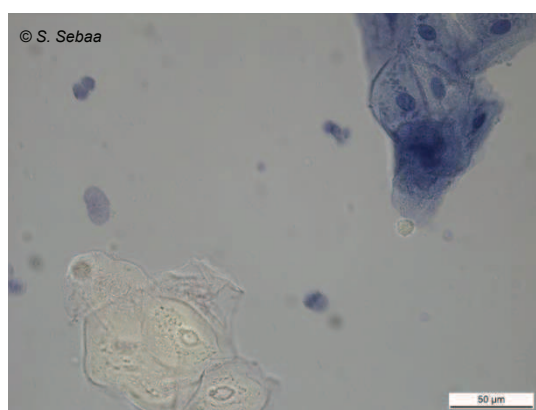
III. Toxicité sur les cellules épithéliales buccales

Le pourcentage de cellules épithéliales colorées en bleu trypan a été déterminé dans la salive provenant de 6 adultes (5 femmes et 1 homme âgés de 25 à 65 ans), sans et avec ajout de différentes molécules testées sur *Candida*. Les différentes molécules testées sur la formation de biofilms à *Candida* montrent toutes une toxicité sur les cellules épithéliales orales inférieures à celle observée pour la chlorhexidine, un antiseptique largement utilisé en stomatologie. Le Tableau XVIII montre un accroissement du nombre de cellules épithéliales présentes colorées par le bleu trypan après 30 min d'incubation à température ambiante, inférieur à celui trouvé en présence de chlorhexidine dans les mêmes conditions expérimentales. Un test ANOVA complété par un post-test de Dunnett montre que cette augmentation est significative pour le tyrosol ($p < 0,01$), pour la solution 1000 μM d'hypohalogéneux ($p < 0,001$) et pour la chlorhexidine ($p > 0,001$).

	% de cellules colorées en bleu trypan après 30 min d'incubation
contrôle	34,8 ± 2,0 (N = 6)
tyrosol 10 mM	48,3 ± 1,5 (N = 6) **
farnésol 1,5 mM	40,8 ± 2,7 (N = 6)
hypohalogéneux 300 μM	41,8 ± 1,0 (N = 3)
hypohalogéneux 1000 μM	54,8 ± 6,0 (N = 3) ***
chlorhexidine 0,1%	100,0 ± 0,0 (N = 6) ***

Tableau XVIII. Toxicité des différentes molécules étudiées sur les cellules épithéliales. Test ANOVA complété par un post-test de Dunnett, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) ;

Figure 40. Viabilité des cellules épithéliales de la muqueuse orale (test au bleu trypan). Microscopie optique ; grossissement x400.



DISCUSSION

Les candidoses oropharyngées sont fréquentes chez les patients médicalement compromis (SIDA, diabète, etc ...) et chez les porteurs de prothèse amovible. Elles sont traitées efficacement par des antifongiques locaux tels que la nystatine et le miconazole. En cas de candidose réfractaire ou systémique, l'administration per os ou intra-veineuse peut être envisagée ; les effets toxiques des antifongiques administrés en parentéral ne sont pas négligeables. Malgré une meilleure prise en charge des candidoses systémiques et l'apparition de nouveaux antifongiques, leur mortalité reste encore très élevée : plus de 40% (Anofel, 2014). La contamination des prothèses dentaires par *C. albicans* est décrite depuis de nombreuses années. Ce travail, réalisé à la fois en Algérie et en Belgique, montre que cette réalité est commune à différentes régions du monde. Ainsi, la fréquence des dentiers contaminés par des levures du genre *Candida* est similaire dans les deux pays concernés. Les données épidémiologiques collectées dans le cadre de cette thèse et celles de la littérature (Vanden Abbeele et al., 2008 ; Ahariz, 2012) illustrent l'intérêt de développer de nouvelles méthodes de prévention pour réserver les antifongiques classiques au traitement des infections avérées et par conséquent d'éviter l'apparition de souches résistantes. A cette fin, des mécanismes biologiques propres aux levures et des systèmes antimicrobiens salivaires ont été explorés en tant que facteurs limitant la capacité à former des biofilms qui constituent pour *Candida* une adaptation indispensable pour survivre dans la cavité orale. Ainsi, les levures - comme des bactéries et d'autres mycètes - sécrètent des molécules dites du *quorum sensing* capables d'adapter le nombre d'individus de la colonie à l'environnement. Les molécules du *quorum sensing* les plus citées pour les levures sont le farnésol et le tyrosol. En fonction du nombre de cellules fongiques, ces molécules induisent des modifications de la croissance, de

la morphologie, de la sécrétion de facteurs de virulence et de la capacité à former des biofilms. D'autre part, de nombreuses études en biologie orale ont montré l'importance de différentes molécules salivaires pour contrôler la microflore orale. Les molécules exocrines salivaires les plus citées comme ayant un rôle antifongique sont le lysozyme et les peroxydases.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier *in vitro* l'inhibition des biofilms à *Candida albicans* - tant en formation que déjà formés - par des molécules du mycète même ou par des protéines exocrines de l'hôte. Dans le cadre de cette thèse, des molécules du *quorum sensing* et des sécrétions salivaires ont été testées *in vitro*, d'abord sur la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 souvent utilisée pour l'évaluation de molécules antifongiques, ensuite sur des souches cliniques prélevées par écouvillonnage de prothèses dentaires. Finalement, une étude clinique *ex vivo* a été réalisée pour confirmer les résultats les plus prometteurs obtenus *in vitro*.

I. Former des biofilms *in vitro*

Afin de répéter des manipulations sous différentes conditions et confirmer statistiquement les résultats, l'usage des plaques à 96-puits était indispensable. En effet, les microplaques permettent d'envisager d'évaluer, en une seule expérience, plusieurs concentrations d'une même molécule ou différentes combinaisons de molécules supputées capables d'empêcher la colonisation d'une surface orale. Pour ce travail, chacun des protocoles a été répété au moins 6 fois de façon indépendante. L'usage d'une procédure turbidimétrique estime à la fois les cellules libres (planctoniques) et attachées (biofilm). Tandis que la méthode au cristal violet quantifie uniquement les biomasses des biofilms composés de *C.*

albicans. Après 24 h d'incubation à 37°C, la densité optique à 600 nm fut mesurée pour évaluer la croissance des levures par turbidimétrie. Après cette mesure, le surnageant a été éliminé, parfois transféré dans une autre plaque pour une nouvelle mesure turbidimétrique pour tester l'effet des lavages sur le détachement de la biomasse attachée. Puis après rejet des surnageants de culture, les parois des puits furent lavées (3 cycles ajout de NaCl 9‰ – agitation – aspiration) puis colorées au cristal violet. Les lavages permettaient d'éliminer les levures planctoniques mais détachaient certainement du biofilm. La quantification de la biomasse attachée était donc sous-évaluée : cet écueil rend obligatoire la comparaison d'une condition avec un contrôle sans la molécule testée mais avec la même procédure de lavage. D'autre part, les contrôles et toutes les conditions ont toujours été répétés 8 fois (tous les puits d'une colonne d'une microplaque). Le coefficient de variation après normalisation de chaque expérience était toujours inférieur à 13,0% pour l'évaluation turbidimétrique, par contre, ce coefficient de variation était plus élevé (jusqu'à 50,2% pour certaines expériences) pour la coloration de la biomasse attachée. La procédure de l'évaluation de la biomasse attachée par coloration au cristal violet a été adaptée à partir d'un protocole de biofilm à staphylocoques (*Stepanović et al.*, 2000). Les plaques multi-puits permettent de traiter avec une grande répétabilité un grand nombre de données de croissance fongique avec des CV ne dépassant pas 4% pour les contrôles négatifs et 13% pour les contrôles positifs. La croissance planctonique de *Candida* suit une allure sigmoïde et présente un plateau après 12 h d'évolution. Les contrôles négatifs sont utilisés comme contrôle de stérilité, les contrôles positifs, quant à eux, sont utilisés comme contrôles de référence. La mise en évidence du biofilm par le cristal violet se caractérise par un CV inférieur à 5% pour les

contrôles négatifs mais de l'ordre de 40% pour les contrôles positifs. Un coefficient de variation élevé s'explique par le fait qu'il y a des temps d'aspiration, de lavage, d'agitation du biofilm durant la manipulation avec une quantité de biofilm perdue à chaque rinçage. L'intensité de la coloration mesurée par spectrophotométrie a permis d'évaluer l'importance des biofilms appelés aussi « phase attachée » pour bien les distinguer des cellules fongiques (à l'état de blastoconidies) en suspension ou simplement sédimentées. On cite plusieurs étapes dans la formation des biofilms : adhésion, d'abord réversible puis irréversible, recouvrement de la surface du support et croissance en épaisseur. A l'exception de quelques expériences, la mise en évidence des biofilms par le cristal violet dans le cadre de ce travail ne distingue pas ces différentes étapes puisque l'évaluation de la biomasse attachée se faisait 24 heures après le mélange d'une suspension avec du milieu de culture en présence parfois de molécules à tester. Evaluer séparément les différentes étapes implique de laver le support après le temps d'adhésion qu'il faut définir préalablement pour les conditions expérimentales. Cela implique aussi de comparer la biomasse attachée par rapport à un contrôle négatif (sans la suspension) pour étudier l'adhésion ou de comparer la biomasse attachée après la période de croissance à celle observée après l'adhésion. Ceci a permis par exemple de montrer que le lysozyme à concentration salivaire ralentissait la croissance des biofilms mais favorisait l'adhésion pour des concentrations élevées non physiologiques. Il existe des souches de *C. albicans* formatrices de biofilms et d'autres qui le sont moins. En effet, parmi les souches cliniques étudiées, le rapport de la biomasse formée après 24 heures sur polystyrène entre la souche la plus formatrice et la souche la moins formatrice était de 1391 (sur un total de 31 souches cliniques évaluées). Le

comportement *in vitro* de ces souches cliniques sur du polystyrène n'implique pas des résultats similaires sur d'autres supports *in vitro* ni *in vivo*. Pour les souches cliniques isolées à partir de la cavité orale, la littérature (Noumi *et al.*, 2010) relève aussi une grande variabilité de capacité à former des biofilms tant sur le polystyrène que sur le polyméthacrylate (PMMA). Cette caractéristique de former des biofilms est considérée comme un facteur de virulence. Certains auteurs (Chandra *et al.*, 2001a) observent une différence de vitesse de formation des biofilms en fonction de la nature du support : le développement des biofilms à *Candida* est plus lent sur PMMA (38 à 72 heures pour atteindre la phase de maturation) que sur le polystyrène (24 heures pour atteindre la phase de maturation). Toutes les souches analysées dans notre étude proviennent de patients qui ne présentaient pas de stomatite prothétique : cette étude ne permet donc pas de confirmer le lien entre capacité à former des biofilms et risque de présenter une candidose. Toutefois, ce lien a été démontré de nombreuses fois dans la littérature (Gendreau & Loewy, 2011). Les biofilms à *Candida* dans la cavité orale diffèrent de ceux produits *in vitro*. La différence la plus importante concerne le nombre d'espèces microbiennes constituant le biofilm. La microflore orale est très diversifiée avec pour conséquence la formation des biofilms *plurispecies* sur la prothèse dentaire. Les modèles *in vitro* de biofilms *monospecies* n'envisagent pas nécessairement les nombreuses interactions entre différentes espèces. Les protocoles expérimentaux utilisés ne reproduisent pas toutes les conditions environnementales de la bouche tant physico-chimiques (pH, température) que biologiques (salive, pellicule exogène acquise sur le support, immunité, présence de molécules ingérées telles que aliments, nutriments et

médicaments). Toutes ces limitations exigent de toujours compléter des études *in vitro* par des études cliniques.

II. Réguler les biofilms à *C. albicans*

Les biofilms à *C. albicans* sont régulés par les levures elles-mêmes via des molécules dites du *quorum sensing*, principalement le farnésol et le tyrosol. L'étude des molécules du *quorum sensing* a révélé une action antibiofilm à une concentration de 3 mM pour le farnésol et de 20 mM pour le tyrosol. Ces résultats complètent d'autres décrites dans la littérature. Certains auteurs (*Chen et al.*, 2001 ; *Alem et al.*, 2006) affirment sur une autre souche que de faibles doses en tyrosol activent la prolifération de *C. albicans* et engendrent des biofilms sur un support. Mais, ce travail démontre, sur la souche *C. albicans* ATCC 10231 et sur des souches cliniques, qu'à plus forte concentration, le tyrosol montre un effet antibiofilm. De façon similaire, le farnésol possède le même effet inhibiteur à de fortes concentrations (1 à 3 mM) alors qu'à faibles concentrations (0,001 à 0,01 mM), la molécule favorise les biofilms. Le tyrosol et le farnésol présentent donc un effet biphasique en fonction de leurs concentrations. Le tyrosol et le farnésol ne modifient pas le pH du milieu réactionnel quelles que soient leurs concentrations (*Dardour*, 2014), ce qui exclut qu'un changement de pH par ces molécules en solution soit la cause de l'inhibition des biofilms. Des études (*Shirtliff et al.*, 2009) ont rapporté que le farnésol à haute dose induit de l'apoptose sur des levures planctoniques en phase de croissance exponentielle. Des études ultérieures devraient être envisagées pour mettre en évidence une éventuelle synergie entre ces 2 molécules. Les concentrations observées inhibitrices dans les investigations de cette thèse sont généralement supérieures à celles citées

dans la littérature pour l'étude de la filamentation en culture liquide ; cependant, la littérature ne rapporte pas de dosage dans des biofilms oraux.

II.1. Effet antibiofilm du tyrosol

Dans le cadre de cette thèse, le tyrosol inhibe la formation de biofilms à des concentrations supérieures à 4 mM. Certains auteurs (*Alem et al.*, 2006) ont rapporté que du tyrosol de 50 μ M à 1 mM ajouté de 0 à 24 heures après le début de l'incubation n'influçait pas la formation du biofilm évalué à 48 heures. D'autres auteurs (*Cordeiro et al.*, 2015) ont rapporté un effet inhibiteur sur des cellules planctoniques de *C. albicans* et *C. tropicalis* et sur leur capacité de former des biofilms, ce pour des concentrations comprises entre 2,5 et 5,0 mM. L'effet du tyrosol aux concentrations les plus élevées pourrait être dû à une toxicité directe sur les cellules fongiques plutôt qu'une inhibition des mécanismes de *quorum sensing*. Une synergie a été observée (*Cordeiro et al.*, 2015) dans certaines souches cliniques entre tyrosol et certains antifongiques (amphotéricine B, itraconazole, fluconazole).

II.2. Effet probiofilm du tyrosol

La sécrétion de tyrosol endogène est très importante durant les premiers stades de développement du biofilm (*Alem et al.*, 2006). Le tyrosol exogène augmente la formation des hyphes durant les premiers stades de développement du biofilm jusqu'à 6 heures. Par contre, l'influence du farnésol est plus importante au cours des étapes ultérieures du développement du biofilm. La diversité des protocoles expérimentaux rendent difficiles les comparaisons des travaux de la littérature entre eux et avec cette thèse.

II.3. Effet antibiofilm du farnésol

Ce travail a montré donc que le farnésol empêche la formation de biofilms pour des concentrations supérieures à 1 mM. Des auteurs (*Ramage et al.*, 2002) rapportent des concentrations inhibitrices de 300 μ M pour le farnésol lorsque ajouté dès le début de l'incubation des blastoconidies. En effet, selon ces auteurs, le farnésol inhibe le développement du biofilm de façon dépendante du temps : le farnésol ajouté au temps de l'adhésion initiale montre une capacité d'inhibition maximale ; cet effet diminue lors d'un ajout postérieur au temps de l'adhésion qui est de l'ordre de 1 à 2 heures. Des auteurs (*Ramage et al.*, 2002) ont relevé une absence de filaments et de pseudofilaments pour la concentration inhibitrice de 300 μ M : ces observations ont été confirmées par des observations microscopiques ponctuelles dans le cadre de notre travail. Selon la littérature et les résultats de cette thèse, les propriétés antibiofilm du farnésol semblent adaptées tant aux stratégies de prévention qu'aux stratégies de traitement. L'analyse de l'expression génique associée à la formation du biofilm de *C. albicans* en présence du farnésol a montré la sensibilité d'environ 274 gènes (104 gènes surexprimés et 170 gènes réprimés) en comparaison à celle d'un biofilm normal de *C. albicans*. Cependant, le mécanisme par lequel le farnésol empêche la formation du biofilm reste inconnu (*Cao et al.*, 2005).

II.4. Effet probiofilm du farnésol

De façon surprenante, ce travail a montré que le farnésol favorise la formation de biofilms pour des concentrations comprises entre 1 et 10 μ M. Les mêmes auteurs (*Ramage et al.*, 2002) déjà cités pour l'effet antibiofilm du farnésol, rapportent des biofilms plus riches en filaments pour des concentrations

inférieures à 30 μM . Le farnésol est connu pour augmenter l'incorporation d'acides aminés chez *C. albicans* à des concentrations inférieures à 45 μM (Braun, 2005). Un effet probiofilm par de faibles concentrations de farnésol a également été décrit pour des biofilms à *Staphylococcus aureus* alors que des concentrations plus importantes étaient antibiofilms (Kraus et al., 2015).

III. Contrôler les biofilms à *C. albicans*

Certaines protéines exocrines salivaires ont une action antimicrobienne et représentent la première défense biochimique de la cavité orale. Ces molécules exocrines utilisées seules montrent une activité inhibitrice parfois partielle, parfois limitée à certaines espèces microbiennes. La quantité de lysozyme salivaire est directement corrélée avec le nombre de *C. albicans*, aussi bien que pour la salive non stimulée que la salive stimulée (Yeh et al., 1997). Le lysozyme humain a un effet fongicide sur les champignons (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*) isolés à partir du mucus nasal chez des patients atteints de rhinite ou sinusite (Woods et al., 2011). Des milieux supplémentés en glucides augmentent la résistance de *C. albicans* en présence du lysozyme (Samaranayake et al., 1993). L'effet muramidase-like du lysozyme sur *C. albicans* a été mis en évidence par des techniques immunohistochimiques qui ont montré des dépôts de matériel dans la paroi des cellules de levures (Marquis et al., 1993). Des fragments de lysozyme perméabilise la paroi de *C. albicans* (Ibrahim et al., 2001). L'activité enzymatique du lysozyme est renforcée par d'autres protéines antimicrobiennes telles que la lactoperoxydase (Lee et al., 2010). L'acide hyaluronique montre une activité fongistatique mais non fongicide sur *C. albicans*, et possède un effet inhibiteur à la fois sur le lysozyme et le système peroxydase (Kang et al., 2011).

La lactoferrine et le lysozyme combiné n'ont pas d'effet synergique sur différentes espèces de *Candida* et sur différentes souches de *C. albicans* (Samaranayake et al., 1997). Des auteurs (Anil & Samaranayake, 2002) décrivent pour des souches cliniques de *C. albicans* et *C. tropicalis* une synergie *in vitro* entre des antifongiques (nystatine, amphotéricine B, fluconazole) et le lysozyme, mais pas la lactoferrine. Ces auteurs ont montré la même synergie pour des souches de *Candida* présentes sur des résines de dentier (Hibino et al., 2009). Deux études cliniques (Kirstilä et al., 1996 ; Gil-Montoya et al., 2008) réalisées sur des produits d'hygiène buccodentaire contenant de la lactoperoxydase, du lysozyme et de la lactoferrine d'origine animale n'ont pas montré d'effets objectifs chez des personnes âgées souffrant de bouche sèche malgré une sensation subjective d'amélioration. Cependant, la mise en place d'un système glucose / glucose-oxydase / thiocyanate / lactoperoxydase entraîne un effet antibiofilm de par l'addition du peroxyde d'hydrogène, substrat de la lactoperoxydase.

III.1. Effet antibiofilm du lysozyme

Les données exposées dans la section *résultats* démontrent un faible - mais significatif - effet du lysozyme sur la croissance planctonique de *C. albicans* pour une concentration supérieure à 300 µg/ml uniquement pour la souche de référence, mais pas pour les souches cliniques. En effet, la diminution de la croissance en milieu liquide de Sabouraud a représenté seulement $9,0 \pm 4,2\%$ et $5,3 \pm 2,5\%$ avec une concentration en lysozyme de 1000 et 300 µg/ml respectivement ; pour les isolats cliniques, une tendance similaire existait mais n'était pas statistiquement significative. On pourrait faire valoir que ce petit effet est plutôt dû à l'incorporation de cellules planctoniques dans la biomasse attachée

sur les côtés latéraux des puits de la microplaque, échappant donc à l'évaluation turbidimétrique. Dans les investigations réalisées, le lysozyme du blanc d'œuf a présenté un effet biphasique sur la formation de biofilm alors qu'il n'affectait que légèrement la croissance de levure testée par turbidimétrie. En effet, le lysozyme a agi en tant que promoteur de biofilm à la plus forte concentration testée (1000 µg/ml) et en tant qu'inhibiteur de la formation de biofilms à concentration plus faible (3 µg/ml) aussi bien pour la souche de référence ATCC 10231 que pour des souches cliniques isolées à partir de prothèses contaminées. L'effet inhibiteur du lysozyme a été observé pour des concentrations jusqu'à 30 µg/ml considéré comme physiologique dans la salive (*Stuchell & Mandel, 1983*), tandis que des doses non physiologiques supérieures à 100 µg/ml avaient un effet probiofilm. Le léger effet sur la mesure turbidimétrique pourrait donc être expliqué par l'effet probiofilm. Auparavant, des auteurs avaient montré que les cellules de *C. albicans* sont lysées par le lysozyme dans une plage de concentrations allant de 40 µg/ml à 5 mg/ml, indépendamment de la quantité de glucose, mais en absence de NaCl dans le milieu de culture (*Kamaya, 1970*). Le lysozyme limite la capacité de former un biofilm aux concentrations les plus faibles (3 - 30 µg/ml). Une autre étude (*Samaranayake et al., 2009*) a cité une gamme (6 - 100 µg/ml) de concentrations similaires pour un effet inhibiteur de la formation de biofilms sur de la résine. Au contraire, certains auteurs (*Silva et al., 2012*) n'ont pas montré de réduction *in vitro* de l'attachement de *Candida* sur de la résine immergée dans des solutions contenant du lysozyme, de la lactoferrine et le complexe glucose oxydase / lactoperoxydase. Ces observations divergentes sont compatibles avec une variabilité de la sensibilité des souches de *Candida* (*Iacono et al., 1980*). Les 3 modes d'action de lysozyme sur *C. albicans*, étudiés ou cités dans la littérature,

sont son activité muramidase, sa nature cationique capable de déstabiliser la membrane cellulaire (Marquis et al., 1982 ; Edgerton & Koshlukova, 2000) et sa propriété d'agglutination (Kamaya, 1969). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la formation de biofilms et son inhibition par le lysozyme purifié à partir des sécrétions exocrines, les chercheurs disposant plus facilement du lysozyme extrait de blanc d'œuf. Le lysozyme module la formation du biofilm lors de sa phase d'attachement sur deux supports différents : le polystyrène et la résine. A concentration supra-physiologique (1 mg/ml), la protéine favorise l'attachement de la levure sur les deux types de matériaux, tandis qu'à concentration physiologique (0,01 mg/ml), elle diminue le nombre de blastoconidies attachées sur les parois des puits en polystyrène. Cette diminution est statistiquement significative comparée au contrôle positif, ce qui démontre un effet inhibiteur du lysozyme sur ce support à la concentration physiologique de 10 µg/ml. Cet effet inhibiteur à faible concentration n'est pas observé pour la résine : la croissance est similaire à celle du contrôle positif. Ces expériences ont porté essentiellement sur l'effet préventif du lysozyme. L'effet curatif a été testé en ajoutant du lysozyme après vingt-quatre heures d'incubation sur un biofilm déjà formé, et ceci n'a montré aucun effet inhibiteur aux deux concentrations investiguées.

La littérature (Güneri et al., 2011) démontre l'efficacité antibactérienne de certains gels ou bains de bouche contenant des enzymes salivaires tel que le lysozyme. Ce travail n'envisage que *C. albicans* sans tenir compte de la diversité de la microflore formant *in vivo* des biofilms sur les prothèses. Ces études soulignent par contre l'absence d'activité antifongique pour ces mêmes produits. Les résultats obtenus dans ce travail confirment cette observation mais mettent en évidence sur les deux supports un effet probiofilm pour une concentration en

lysozyme supra-physiologique. Ceci n'avait pas été mis en évidence par les auteurs dans la mesure où leurs procédures investiguaient des inhibitions de croissance (tests de diffusion, ...). La question se pose donc quant à l'innocuité de ces produits dans le cadre du traitement de la sécheresse buccale ou des candidoses. En effet, les quantités mises dans certains de ces produits d'hygiène ne sont pas publiées. Selon les résultats obtenus, le lysozyme ne présenterait pas d'activité antifongique ; pire, des concentrations trop élevées favoriseraient la formation d'un biofilm. Enfin, la porosité ou la toxicité des différents types de résine impliquent une variabilité de supports tantôt favorables tantôt moins favorables à la formation de biofilms. Le travail a été réalisé sur un type de résine fabriquée de façon standardisée. La procédure de préparation modifie les possibilités d'attachement de *Candida* pendant les premières heures de formation du biofilm. La libération de monomères par la résine pourrait aussi moduler la croissance de biofilms.

III.2. Effet probiofilm du lysozyme

Un effet probiofilm a été attesté pour une souche de référence et pour 6 (sur 10) des isolats cliniques, sur deux supports différents, le polystyrène et la résine acrylique, par deux modèles expérimentaux différents (adhésion de *Candida* et production de biofilm). La production de biofilm fut évaluée par deux différentes procédures : coloration au cristal violet et comptage du nombre de CFU après ensemencement. En effet, le lysozyme a agi en tant que promoteur de biofilm à la plus forte concentration testée (1000 µg/ml) aussi bien pour la souche de référence ATCC 10231 que pour des souches cliniques isolées à partir de prothèses contaminées. Cette capacité de lysozyme pour augmenter la biomasse

attachée a été observée à haute - mais non physiologique - concentration. Ces résultats sont confirmés par l'évaluation de la cohésion du biofilm pendant 3 lavages successifs avec une solution saline. En présence de lysozyme 1 mg/ml, la turbidité du milieu de lavage n'a pas augmenté ce qui suggère une faible perte de cellules de levure par le biofilm. Des études anciennes avaient déjà mis l'accent sur l'agglutination ou la floculation de *Candida* par du lysozyme (à une concentration citée de 1 mg/ml) dans une solution non ionique sur des saprophytes d'air (*Friedberger & Hoder, 1932* cité par *Kamaya, 1969*), sur des suspensions bactériennes (*Webb, 1948 ; Salton, 1953*) ou sur des levures du genre *Candida* (*Kamaya, 1969*). La présence *in vivo* de lysozyme dans la pellicule exogène acquise sur la dent est bien documentée, mais il n'y a pas de données concernant l'effet de celui-ci sur le biofilm (*Edgerton & Levine, 1992*) ; on comprend dès lors que l'ordre d'ajout des réactifs influence la formation du biofilm (*Hamouda, 2013*). Cet effet probiofilm suggère de ne pas dépasser les concentrations physiologiques dans des produits d'hygiène. Des expériences complémentaires réalisées pour cette thèse n'ont pas montré d'effet du lysozyme sur des biofilms déjà formés que ce soit sur polystyrène ou sur résine. Par contre, nos expériences ont montré que c'est dans les premières heures de formation d'un biofilm (la phase d'adhérence) que le lysozyme joue un rôle activateur.

III.3. Effet antibiofilm de la lactoperoxydase

Afin d'évaluer directement l'effet des produits de la peroxydase, un procédé original a été mis au point pour éviter la présence de protéines enzymatiques potentiellement immunogènes dans la solution finale. De plus, la présence de lactoperoxydase - sans ses substrats - pourrait devenir un nutriment et ainsi

stimuler la croissance de certaines espèces bactériennes dans la cavité buccale (Fadel & Courtois, 2001). La préparation préalable des hypohalogéneux hors de la cavité orale évite la consommation du peroxyde d'hydrogène par les catalases microbiennes. Le procédé mis en place permet d'atteindre des concentrations en oxydants ($\text{OSCN}^-/\text{OI}^-$) létales pour *C. albicans* proches des concentrations d'hypothiocyanite observées dans la salive totale (Tenovuo, 1989). La solution d'ions hypohalogéneux élimine jusqu'à au moins 2×10^7 bl/ml en 5 min d'incubation. Même diluée 3 fois, son pouvoir inhibiteur reste intact *in vitro*. Après 5 semaines, le pouvoir oxydant résiduel d'une solution d' $\text{OSCN}^-/\text{OI}^-$ (55% de la concentration de départ) est suffisant pour continuer à inhiber une suspension de 10^4 blastoconidies par ml. Les deux substrats des peroxydases - thiocyanate et iodure - ont été testés indépendamment l'un de l'autre sur des suspensions de *Candida*. L'hypoiodite induit un taux de survie nul à une concentration plus basse que l'hypothiocyanite (Mavutukidi, 2008). Cependant, l'ion hypohalogéneux présent dans la cavité orale est l'hypothiocyanite plutôt que l'hypoiodite car le substrat à l'origine du premier est 1000 fois plus abondant que celui à l'origine du second : en effet le thiocyanate salivaire atteint des concentrations salivaires de l'ordre du mM tandis que l'iodure atteint des concentrations de l'ordre du μM . A concentration égale, la lactoperoxydase présente une plus grande affinité pour le thiocyanate que pour l'iodure (Dewèvre, 2007). Le mélange des deux substrats, thiocyanate et iodure, semble entraîner la formation d'un complexe oxydant plus stable dans le temps (Bosch et al. 2000, Bafort et al., 2014 ; Schlorke et al., 2016). Les concentrations en oxydants produites sont peu toxiques pour les cellules épithéliales de la bouche. Dans une petite série d'expériences, la solution de $\text{OSCN}^-/\text{OI}^-$ à $1000 \mu\text{M}$ augmente le pourcentage de mortalité des cellules

épithéliales présentes dans la salive de 20,0% en moyenne. Diluée 3 fois, cette solution garde une activité totale anti-*Candida* tout en diminuant la mortalité des cellules buccales d'environ 13,0%. Le fait que les cellules résistent à la toxicité peut s'expliquer par la présence de bactéries sur l'ensemble de leur surface, d'une part, en formant un biofilm protecteur, d'autre part grâce à une activité enzymatique détoxifiante de certaines espèces commensales (Courtois & Pourtois, 1996). Un rinçage de la prothèse dentaire après incubation *ex vivo* dans la solution d'oxydants limitera encore davantage ce risque. Quelques expériences isolées (Hauet, 2015) ont montré un effet bactéricide sur une espèce bactérienne cariogène (*Streptococcus mutans*), mais pas sur une espèce bactérienne commensale (*Streptococcus sanguis*). La concentration à 1000 μM a provoqué une inhibition de la formation des biofilms à *Streptococcus mutans* (Malashkina, 2016). D'autres travaux devront analyser les interférences de cette solution avec l'écologie microbienne orale. La solution d'hypohalogéneux stérilise une languette de résine lorsqu'elle est contaminée par plus de *C. albicans* que trouvé habituellement sur les prothèses des patients (données non montrées). Sur de la poudre de titane, la solution d'hypohalogéneux permet d'éliminer ~70% des biofilms à *Candida* (Hauet, 2015). Ces données permettent d'envisager un procédé simple pour la décontamination de prothèses dentaires. La facilité de la production de ces solutions permettra leur utilisation au domicile des patients édentés. Le temps de conservation de ces solutions avec leur activité candidacide constitue un autre avantage. Les solutions ont été préparées avec des tampons non stérilisés ; d'autres essais sont nécessaires pour remplacer ces solutions tampons par de l'eau de distribution.

IV. Mimer les mécanismes biologiques anti-*Candida*

L'hygiène des prothèses est difficile à obtenir de la part des patients ; les prothèses contaminées constituent une porte d'entrée des infections à *Candida*. L'incorporation de protéines des sécrétions exocrines dans des produits d'hygiène bucco-dentaire a été suggérée pour l'hygiène des prothèses chez les patients à risque. Il y a lieu de bien différencier le préventif du curatif : les protéines exocrines ne remplaceront pas les antifongiques, leur utilisation devant être réservée à l'hygiène chez des individus qui présentent des facteurs de risque tels que des maladies chroniques, une immunodéficience, une xérostomie ou le port régulier d'une prothèse amovible. Les antifongiques doivent être réservés aux candidoses : l'utilisation d'antifongiques pour la prévention est un non-sens vu l'augmentation des souches résistantes à ceux-ci.

Les peroxydases constituent le mécanisme antimicrobien le plus étudié, à l'origine des applications les plus abouties. Cependant, leur utilisation se confronte à la complexité du milieu oral. Depuis plusieurs décennies, les systèmes peroxydases ont été incorporés dans les produits d'hygiène buccale sur la base de tests *in vitro* contre des souches isolées à partir de la microflore orale, tandis que les données *in vivo* et des essais cliniques faisaient - et font encore - défaut pour prouver leur efficacité *in vivo* dans l'environnement oral. La dégradation de H₂O₂ par certaines bactéries et levures peut expliquer l'inefficacité *in vivo* des systèmes peroxydases qui utilisent H₂O₂ comme substrat. Des tests ont été réalisés *in vitro*, à l'aide d'un dentifrice (*Tenovuo*, 2002) contenant l'enzyme lactoperoxydase, du SCN⁻ et une séquence enzymatique (glucose / glucose oxydase) produisant au contact de l'air du H₂O₂. Les résultats ont révélé que ces dentifrices inhibent la croissance bactérienne de *S. mutans*, de *S. sobrinus* et de *Lactobacillus casei* sur

des milieux solides dans des boîtes de Petri. Or, *in vivo*, ces effets antimicrobiens ne se confirment pas. Cela mène à penser qu'il y a plusieurs paramètres qui peuvent interférer dans le milieu complexe qu'est la cavité orale. En effet, lors des cultures *in vitro*, le système peroxydase (SCN^- , H_2O_2 et lactoperoxydase) est confronté seul aux bactéries étudiées. Le milieu réactionnel ne représente pas la complexité du milieu oral tant de nombreuses espèces bactériennes et molécules salivaires peuvent réagir entre elles. Les hypohalogéneux produits par les peroxydases salivaires illustrent cette complexité. En effet, la production de ces oxydants nécessite deux substrats : le premier substrat, le thiocyanate, est sécrété par les glandes salivaires tandis que le second, le peroxyde d'hydrogène, est surtout produit par les micro-organismes à partir de glucose (en partie aussi par les glandes salivaires et les polynucléaires neutrophiles par d'autres voies métaboliques). Ainsi, le glucose augmente la multiplication bactérienne induisant une augmentation dans le milieu de H_2O_2 , qui enclenche la production d'hypohalogéneux par le système peroxydase, ...sauf si les germes exprimant la catalase, sont en nombre suffisant pour détoxifier le H_2O_2 . La transformation du peroxyde d'hydrogène en eau par les peroxydases ou par la catalase est bénéfique car le peroxyde d'hydrogène est délétère pour les cellules humaines (Tenovuo & Larjava, 1984). Il faut noter que le peroxyde d'hydrogène est un facteur limitant dans la réaction. En effet, ce dernier est à ce point vite consommé par une peroxydase ou dégradé par la catalase que sa concentration dans la cavité buccale est à l'état de trace (Pruitt *et al.*, 1986 ; Pruitt *et al.*, 1990). Les produits d'hygiène contenant de la lactoperoxydase tentent de mimer les activités peroxydases de la cavité orale dues aux sécrétions salivaires qui contiennent de la sialoperoxydase quasi identique (seule la glycosylation et les constantes

cinétiques sont différentes) et aux neutrophiles qui libèrent de la myéloperoxydase. Autre illustration de la difficulté de documenter l'effet d'une protéine antimicrobienne dans le milieu oral qui est complexe : l'influence du pH ambiant. Des études *in vitro* ont montré que l'effet antimicrobien des peroxydases est enregistré lorsque le pH est relativement bas, car le pK_a de la réaction varie autour de 5,2 - 5,4. La forme non ionisée (HOSCN) traverserait plus aisément la membrane bactérienne. Or, le pH de la cavité orale avoisine 7 : la molécule est alors principalement sous sa forme ionisée qui traverserait moins bien la membrane lipidique hydrophobe des bactéries et dépendrait de la présence de porines (De Spiegeleer *et al.*, 2005). Les peroxydases salivaires peuvent aussi transformer l'iodure (I⁻) en hypoiodite qui présente un rôle antimicrobien, particulièrement antifongique (Ahariz & Courtois, 2010b). Les bains de bouches à l'hypoiodite inhibent la croissance *in vivo* de la plaque dentaire (Vanden Abbeele *et al.*, 1996). Le fait de se brosser les dents avec un gel contenant un système peroxydasique empêche l'apparition d'aphtes car il ne contient pas de détergent comme le lauryl sulfate de sodium, contrairement aux dentifrices traditionnels (Hoogendoorn & Piessens, 1987). Le fluor exerce un effet inhibiteur sur la peroxydase salivaire. En effet, l'action inhibitrice du fluor est maximale aux alentours du pH 5, ce qui correspond à l'activité optimale de la peroxydase. Son effet inhibiteur diminue lorsque le pH augmente, elle est nulle à pH 7 (Vanden Abbeele *et al.*, 1995). D'autres études ont prouvé que la lactoperoxydase sans ses substrats (peroxyde d'hydrogène et thiocyanate) produit un effet paradoxal : elle favorise la croissance de certaines bactéries anaérobies parce que l'enzyme inactive devient alors un nutriment (Fadel & Courtois, 2001).

Les tests *in vitro* ont démontré l'efficacité de la solution d'oxydants pour stériliser une suspension de 10^6 levures par ml après une incubation de 5 min. On pouvait donc envisager l'utilisation *ex vivo* de la solution pour décontaminer les prothèses dentaires de patients se présentant à la consultation ou au département de gériatrie. Le dosage des oxydants par spectrophotométrie et la sensibilité de *C. albicans* ATCC 10231 furent préalablement réalisés sur chaque solution. Cela permet de contrôler les concentrations en oxydants formées, et donc une vérification préalable des propriétés de la solution. Le critère de succès choisi est une réduction du nombre de levures d'au moins 1 unité logarithmique sans nécessairement entraîner une éradication complète de *Candida* : ceci correspond à une réduction d'au moins 90% des CFU ramenées par écouvillonnage au temps initial. Selon ce critère de succès, 58,3% des prothèses répondaient favorablement. Cependant, une tendance générale à la baisse du nombre de colonies présentes après le trempage est toutefois à noter : le portage de *Candida* des prothèses contaminées trempées dans la solution active a été diminué de moitié dans 83,3% des cas. Ceci a été confirmé par un trempage des prothèses contrôles dans la solution d'ions hypohalogéneux pour offrir à ces patients la même chance de pouvoir décontaminer leur prothèse. Les réductions sont alors similaires à celles observées dans le groupe test : 60% avec le critère d'une unité logarithmique et 73,3% avec le critère d'une diminution de moitié. Cet effet candidacide est retrouvé sur les 3 espèces de *Candida* présentes sur les prothèses étudiées mais est cependant moindre sur les prothèses porteuses d'un grand nombre de colonies de *Candida* au temps initial. Les résultats rapportés dans les 2 groupes montrent donc clairement que la composition de la solution affecte le portage de *Candida* sur les prothèses dentaires. Après trempage dans la

solution le nombre résiduel de colonies de *Candida* est inférieur à une unité logarithmique dans 59,2% des cas en moyenne (groupe test 58,3% ; groupe contrôle 60,0%). Il est inférieur à la moitié du nombre initial dans 78,3% des cas en moyenne (groupe test 83,3% ; groupe contrôle 73,3%). La solution contrôle a permis une diminution du nombre de CFU d'au moins de moitié dans 26,7% des cas mais jamais une diminution de l'ordre d'1 unité logarithmique. Selon les informations recueillies par l'anamnèse de tous les patients, il apparaît que le portage de *Candida* n'est pas influencé par la procédure l'hygiène des prothèses. Cependant, la persistance d'un biofilm résiduel permet la recolonisation continue des prothèses. Par conséquent, des méthodes de nettoyage alternatives sont nécessaires pour améliorer l'élimination du biofilm. Si l'utilisation à long terme des préparations commerciales ne permet pas une élimination complète du portage de *Candida* sur les prothèses dentaires, il faut se poser la question de savoir si une solution d'hypohalogéneux peut contribuer à résoudre ce problème. Une investigation clinique ultérieure devra suivre une cohorte de patients qui décontamineraient leur prothèse chaque jour pendant plusieurs jours.

V. Prévenir ou traiter ?

Le développement de résistance aux antifongiques impliquent d'utiliser les antifongiques pour traiter. Le développement de méthodes alternatives basées sur la biologie des levures exige encore beaucoup d'études pour en arriver à utiliser les mécanismes du *quorum sensing* ou à mimer les sécrétions salivaires. Les études *in vitro* doivent distinguer la prolifération en milieu liquide de la formation de biofilms. En effet, l'organisation de la microflore en biofilm doit être considéré comme un facteur supplémentaire de la résistance aux antimicrobiens. Une

molécule peut limiter la capacité à former des biofilms sans avoir d'effet sur la croissance du micro-organisme en suspension, et *vice versa*. Une même molécule peut être à la fois probiofilm et antibiofilm en fonction de sa concentration.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de mettre au point des procédures sur plaque multi-puits pour tester l'effet de molécules anti-*Candida* sur leur croissance et sur la formation de biofilm. Ces procédures, testées pour les molécules du *quorum sensing*, le lysozyme et les hypohalogéneux, peuvent être utilisées pour évaluer l'effet de molécules à la fois sur la croissance des levures et sur leur capacité à produire des biofilms. Ce travail explore les possibilités de prévention des biofilms à *Candida albicans* par des molécules présentes chez l'hôte ou dans le mycète. Cette investigation démontre des actions sur les biofilms, non décrites dans la littérature scientifique. De hautes concentrations en molécules du *quorum sensing* et la mise en place du système peroxydase entraînent une limitation de la croissance, légère pour les molécules du *quorum sensing*, plus marquée pour les hypohalogéneux. Les mêmes molécules ont toutes les trois empêché la formation d'un biofilm pour des concentrations qui n'entraînaient soit pas (pour le lysozyme 30 µg/ml), soit que peu (pour le tyrosol 20 mM ou le farnésol 3 mM) ou bien entraînaient moins (pour les hypohalogéneux 250 - 500 µM) d'effet sur la croissance testée par turbidimétrie. Une même molécule peut présenter des effets diamétralement opposés selon la concentration utilisée : par exemple, pro-biofilm à faible concentration et anti-biofilm à plus forte concentration pour le farnésol, ou l'inverse pour le lysozyme. Les hypohalogéneux empêchent la formation de biofilm avant d'arrêter la croissance de *Candida*. Ce travail décrit enfin une procédure originale pour produire des d'hypohalogéneux telle que les solutions finales d'emploi ne contiennent plus ni l'enzyme nécessaire (la lactoperoxydase), ni ses substrats (H₂O₂, thiocyanate, iode). Cette procédure permet ainsi d'éviter toutes les relations complexes qui peuvent se nouer dans un biofilm sur une prothèse ou dans la cavité orale, dont par exemple la consommation de H₂O₂ par la catalase exprimée par certaines espèces microbiennes. Cette procédure permet de disposer ainsi d'une solution apte à décontaminer *ex vivo* des prothèses dentaires.

Ce travail permet d'ouvrir de nouvelles perspectives : il serait intéressant

- d'investiguer davantage de souches cliniques pour confirmer les données acquises,
- de transférer ces connaissances du laboratoire à la clinique, d'abord chez l'animal puis chez l'humain,
- de formuler un gel oral contenant des molécules du *quorum sensing* aux concentrations adéquates pour prévenir les biofilms sur les prothèses dentaires amovibles en résine,
- de combiner différentes protéines salivaires,
- de rechercher des éventuelles synergies antifongiques entre les molécules du *quorum sensing* et les protéines exocrines salivaires.

On peut conclure de la revue de la littérature que l'ajout de protéines antimicrobiennes salivaires n'a pas encore été démontré, de manière objective, utile à l'assainissement de la cavité orale et à la prévention des déséquilibres des écosystèmes bucco-dentaires menant à des pathologies. En effet, il y a très peu d'études cliniques réalisées. La plupart des études sont réalisées *in vitro*. Les résultats obtenus *in vitro* ne peuvent être considéré comme un argument pour leur efficacité dans le milieu oral. En effet, le milieu buccal est constitué de nombreuses protéines et micro-organismes. Une multitude de réactions non contrôlées - parfois même pas encore connues - implique une validation par des études cliniques. Des données démontrées *in vitro* ne sont pas forcément transposables *in vivo*. Lors des investigations *in vitro*, seuls les réactifs et produits sont présents dans la solution. L'environnement oral est bien plus complexe. Pour ces raisons, les résultats de l'étude clinique *ex vivo* représentent une première étape utile et prometteuse.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Ahariz M. Effet régulateur des peroxydases sur les biofilms oraux à *Candida albicans*. Thèse de doctorat. ULB, 2012.
- Ahariz M & Courtois P. *Candida albicans* biofilm on titanium: effect of peroxidase pre-coating. *Med Devices (Auckl)*, 3: 33-40, 2010a.
- Ahariz M & Courtois P. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypiodite. *Clin Cosmet Investig Dent*, 2: 69-78, 2010b.
- Ahariz M., Loeb I., Courtois P. Candidoses orales et prothèses dentaires. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 111: 74-80, 2010.
- Albuquerque P., Casadevall A. *Quorum sensing* in fungi--a review. *Med. Mycol.*, 50: 337-345, 2012.
- Alem M.A., Oteef M.D., Flowers T.H., Douglas L.J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in *quorum sensing* and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5: 1770-1779, 2006.
- Aune T.M. & Thomas E.L. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalysed oxidation of thiocyanate ion, *Eur. J. Biochem.*, 80: 209-214, 1977.
- Bafort F., Barthelemy J.P., Parisi O., Perraudin J.P., Jijakli H. Development of a colorimetric method for the dosage of OI^- anions and I_2 in aqueous media. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 79: 155-160, 2014.
- Beers R.F & Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195: 133-140, 1952.
- Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune & Stratton, New York, 1971.
- Blanco M.T., Pérez-Giraldo ., Blanco ., Morán F.J., Hurtado C., Gómez-García A.C. *In vitro* studies of activities of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by the turbidimetric method. *Antimicrob Agents Chemother.*, 36: 898-901, 1992.
- Blankenship J.R & Mitchell A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9: 588-594, 2006.
- Bosch E.H., van Doorne H., de Vries S. The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 215-224, 2000.
- Boucherit-Atmani Z., Seddiki S.M.L., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L., Kunkel D. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de Mycologie Médicale*, 21: 182-187, 2011.
- Brandtzaeg P & Mann W.V Jr. A comparative study of the lysozyme activity of human gingival pocket fluid, serum, and saliva. *Acta Odontol. Scand.*, 22: 441-455, 1964.

- Braun PC. The effect of farnesol on amino acid incorporation by a wild-type and cell-wall variant strain of *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.*, 51: 715-718, 2005.
- Budtz-Jørgensen E. Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 12: 170-185, 2000.
- Bürgers R., Schneider-Brachert W., Rosentritt M., Handel G., Hahnel S. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. *Clin Oral Investig*, 13: 293-299, 2009.
- Calderone R.A & Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, 9: 327-335, 2001.
- Cannon R.D & Chaffin W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10: 359-383, 1999.
- Cao Y.Y., Cao Y.B., Xu Z., Ying K., Li Y., Xie Y., Zhu Z.Y., Chen W.S., Jiang Y.Y. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 584-589, 2005.
- Carlsson J. Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J. Oral Pathol.*, 16: 412-416, 1987.
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.*, 183: 5385-5394, 2001a.
- Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich .S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J. Dent. Res.*, 80: 903-908, 2001b.
- Chardin H., Barsotti O., Bonnaure-Mallet M. Microbiologie en odonto-stomatologie. Maloine éd. (Paris, France), 2006.
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R. Tyrosol is a *quorum-sensing* molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 5048-5052, 2004.
- Cho T., Nagao Jun-ichi., Imayoshi R., Kaminishi H., Aoyama T., Nakayama H. *Quorum Sensing* and Morphological Regulation in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *J Oral Biosci*, 52: 233-239, 2010.
- Cole M., Hsu S., Baum B., Bowen W, Sierra L., Aquirre M., Gillespie G. Specific and nonspecific immune factors in dental plaque fluid and saliva from young and old populations. *Infect. Immun.*, 31: 998-1002, 1981.
- Cordeiro R.A., Teixeira C.E., Brilhante R.S., Castelo-Branco D.S., Alencar L.P., de Oliveira J.S., Monteiro A.J., Bandeira T.J., Sidrim J.J., Moreira J.L., Rocha M.F. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Res.*, 15: fov012, 2015.
- Cottier F & Mühlischlegel F.A. Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor. *FEMS Microbiol. Lett.*, 295: 1-9, 2009.

- Courtois Ph. *Candida* biofilms on oral biomaterials. in Pignatello R. *Biomaterials – Physics and chemistry*. Intech (Rjeka, Croatia), 475-490, 2011.
- Courtois P. & Pourtois M. Purification of NADH-hypothiocyanite-oxidoreductase in *Streptococcus sanguis*. *Biochem. Molec. Med.*, 57: 134-138, 1996.
- Cutler J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45: 187-218, 1991.
- Dardour I. Inhibition des biofilms à *Candida albicans*. Travail de Fin d'Etudes présenté à la Haute Ecole Francisco Ferrer (Bruxelles, Belgique), 2014.
- De Bernardis F., Sullivan P.A., Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med. Mycol.*, 39: 303-313, 2001.
- de Oliveira C.E., Gasparoto T.H., Dionísio T.J., Porto V.C., Vieira N.A., Santos C.F., Lara V.S. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont.*, 23: 158-159, 2010.
- Décanis N., Savignac K., Rouabhia M. Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human beta-defensin 2 production. *Cytokine*, 45: 132-140, 2009.
- Décanis N., Tazi N., Correia A., Vilanova M., Rouabhia M. Farnesol, fungal quorum-sensing molecule triggers *Candida albicans* morphological changes by downregulating the expression of different secreted aspartyl proteinase genes. *Open Microbiol J*, 5: 119-126, 2011.
- Derengowski L.S., Pereira A.L., Andrade A.C., Kyaw C.M., Silva-Pereira I. Propranolol inhibits *Candida albicans* adherence and biofilm formation on biotic and abiotic surfaces. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34: 619-621, 2009.
- De Spiegeleer P., Sermon J., Vanoirbeek K., Aertsen A., Michiels C.W. Role of porins in sensitivity of *Escherichia coli* to antibacterial activity of the lactoperoxidase enzyme system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3512-3518, 2005.
- Deveau A. & Hogan D. Linking *quorum sensing* regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods Mol. Biol.*, 692: 219-233, 2011.
- Dignani M.C., Solomkin J.S., Anaissie E.J. *Candida*. in Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A. eds. *Clinical Mycology*, Churchill Livingstone Elsevier, 2009.
- Douglas L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, 11: 30-36, 2003.
- Edgerton M. & Levine M.J. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent*, 68: 683-691, 1992.
- Edgerton M., Scannapieco F.A., Reddy M.S., Levine M.J. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect. Immun.*, 61: 2644-2652, 1993.
- Eisenberg R.J., Bowers G.M., Bergquist J.J. Lysozyme activity in gingival crevicular fluid. *J Baltimore Coll Dent Surg*, 32: 83-85, 1977.

- Elguezabal N., Maza J.L., Ponton J. Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis*, 10: 81-86, 2004.
- Epstein J.B., Truelove E.L., Izutzu K.T. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. *Rev. Infect. Dis.*, 6: 96-106, 1984.
- Ernst J.F. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146: 1763-1774, 2000.
- Fábián T.K., Hermann P., Beck A., Fejérdy P., Fábián G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci*, 13: 4295-4320, 2012.
- Fadel M & Courtois P. Inhibitory effect of lactoperoxidase-generated hypothiocyanite upon black pigmented anaerobe growth. *Int. J. Mol. Med.*, 8: 59-62, 2001.
- Ferguson D. Oral Bioscience. *Edinburgh: Churchill Livingstone*, 1999.
- Finkel J.S & Mitchell A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9: 109-118, 2011.
- Fleming A. Lysozyme. *Proc. R. Soc. Med.*, 26: 71-84, 1932.
- Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 93: 306-317, 1922.
- Gendreau L & Loewy Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*, 20: 251-260, 2011.
- Gil-Montoya J.A., Guardia-López I., González-Moles M.A. Evaluation of the clinical efficacy of a mouthwash and oral gel containing the antimicrobial proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in elderly patients with dry mouth: a pilot study. *Gerodontology*, 25: 3-9, 2008.
- Göcke R., Gerath F., von Schwanewede H. Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. *Clin Oral Investig*, 6: 227-235, 2002.
- Güneri P., Alpöz E., Epstein J.B., Çankaya H., Ateş M. *In vitro* antimicrobial effects of commercially available mouth-wetting agents. *Spec Care Dentist.*, 31: 123-128, 2011.
- Hannig M., Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*, 19: 29-64, 2006.
- Haut Ch. Production d'une solution candidacide d'ions hypohalogéneux. Travail de Fin d'Etudes présenté à la Haute Ecole Francisco Ferrer (Bruxelles, Belgique), 2015.
- Hamouda A. Effet anti-*Candida* du diazoxide et du lysozyme. Travail de Fin d'Etudes présenté à la Haute Ecole Francisco Ferrer (Bruxelles, Belgique), 2013.
- Hawser S.P & Douglas L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.*, 62: 915-921, 1994.
- Hazen K.C & Cutler J.E. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 24: 661-666, 1979.

- Hentzer M & Givskov M. Pharmacological inhibition of *quorum sensing* for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Investig.*, 112: 1300-1307, 2003.
- Hibino K., Samaranayake L.P., Hägg U., Wong R.W., Lee W. The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. *Arch Oral Biol.*, 54: 678-683, 2009.
- Hisajima T., Maruyama N., Tanabe Y., Ishibashi H., Yamada T., Makimura K., Nishiyama Y., Funakoshi K., Oshima H., Abe S. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiol. Immunol.*, 52: 327-333, 2008.
- Hogan D.A. Talking to themselves: autoregulation and *quorum sensing* in fungi. *Eukaryotic Cell*, 5: 613-619, 2006.
- Holmes A.R., Cannon R.D., Jenkinson H.F. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J. Ind. Microbiol.*, 15: 208-213, 1995.
- Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K.W. *Quorum sensing* in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2982-2992, 2001.
- Hornby J.M., Kebaara B.W., Nickerson K.W. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 2366-2369, 2003.
- Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7: 336-341, 2004.
- Ibrahim H.R., Thomas U., Pellegrini A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J. Biol. Chem.*, 276: 43767-43774, 2001.
- Ihalin R., Loimaranta V., Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch. Biochem. Biophys.*, 445: 261-268, 2006.
- Jabra-Rizk M.A., Shirtliff M., James C., Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res.*, 6: 1063-1073, 2006.
- Jackson S., Coulthwaite L., Loewy Z., Scallan A., Verran J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent.*, 112: 988-993, 2014.
- Jacobsen I.D., Wilson D., Wächtler B., Brunke S., Naglik J.R, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 10: 85-93, 2012.
- Josephy P.D., Eling T., Mason R.P. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J. Biol. Chem.*, 257: 3669-3675, 1982.
- Kamaya T. Flocculation phenomenon of *Candida albicans* by lysozyme. *Mycopathol Mycol Appl*, 37: 320-330, 1969.
- Kamaya T. Lytic action of lysozyme on *Candida albicans*. *Mycopathol Mycol Appl*, 42: 197-207, 1970.

- Katragkou A., McCarthy M., Alexander E.L., Antachopoulos C., Meletiadis J., Jabra-Rizk M.A., Petraitis V., Roilides E., Walsh T.J. *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 70: 470-478, 2015.
- Kim S., Kim E., Shin D.S., Kang H., Oh K.B. Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against *Candida albicans* dimorphism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 895-898, 2002.
- Klotz S.A. The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiol Lett.*, 120: 257-262, 1994.
- Koch C., Bürgers R., Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*, 30: 309-313, 2013.
- Kruppa M. *Quorum sensing* and *Candida albicans*. *Mycoses*. 52: 1-10, 2009.
- Kumamoto C.A & Vines M.D. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 113-133, 2005.
- Kuriyama T., Williams D.W., Lewis M.A. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol. Immunol.*, 18: 405-407, 2003.
- Lazar V. *Quorum sensing* in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. *Anaerobe*, 17: 280-285, 2011.
- Lazarin A.A., Zamperini C.A., Vergani C.E., Wady A.F., Giampaolo E.T., Machado A.L. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology*, 31: 25-33, 2014.
- Lingappa B.T., Prasad M., Lingappa Y., Hunt D.F, Biemann K. Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science*, 163: 192-194, 1969.
- Lo H.J., Köhler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90: 939-949, 1997.
- Mackay B.J. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of lysozyme in human parotid and submandibular-sublingual salivas. *J. Clin. Microbiol.*, 19: 844-848, 1984.
- Majerus P., Courtois P. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J. Biol. Buccale.*, 20: 241-245, 1992.
- Malashkina L. Comparaison de biofilms, bactérien et fongique. Travail de Fin d'Etudes présenté à la Haute Ecole Francisco Ferrer (Bruxelles, Belgique), 2016.
- Mansson-Rahemtulla B., Rahemtulla F., Baldone D.C., Pruitt K.M., Hjerpe A. Purification and characterization of human salivary peroxidase. *Biochemistry*, 27: 233-239, 1988.
- Marquis G., Montplaisir S., Garzon S., Strykowski H., Auger P. Fungitoxicity of muramidase. Ultrastructural damage to *Candida albicans*. *Lab. Invest.*, 46: 627-636, 1982.
- Marsh P., Martin M. Oral microbiology. Wright, Oxford (Grande-Bretagne), 1999.

- Masschalck B & Michiels C.W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 29: 191-214, 2003.
- Mavutukidi S. Evaluation d'un gel oral anti-*Candida*. Travail de Fin d'Etudes présenté à la Haute Ecole Francisco Ferrer (Bruxelles, Belgique), 2008.
- Mayahara M., Kataoka R., Arimoto T., Tamaki Y., Yamaguchi N., Watanabe Y., Yamasaki Y., Miyazaki T. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J Investig Clin Dent*, 5: 307-312, 2014.
- Mayer F.L., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4: 119-128, 2013.
- McCourtie J & Douglas L.J. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun.*, 32: 1234-1241, 1981.
- Mendes A., Mores A.U., Carvalho A.P., Rosa R.T., Samaranayake L.P., Rosa E.A.R. *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 1813-1815, 2007.
- Miller M.B & Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 165-199, 2001.
- Mitchell A.P. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1: 687-692, 1998.
- Morales D.K & Hogan D.A. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.*, 6: e1000886, 2010.
- Mosel D.D., Dumitru R., Hornby J.M., Atkin A.L., Nickerson K.W. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4938-4940, 2005.
- Moyes D.L., Richardson J.P, Naglik J.R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*, 6: 338-346, 2015.
- Mouton C., Robert J.-C. Bactériologie bucco-dentaire. Masson, Paris (France), 1994.
- Naglik J., Albrecht A., Bader O., Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol.*, 6: 915-926, 2004.
- Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 400-428, 2003.
- Naglik J.R., Moyes D.L., Wächter B., Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.*, 13: 963-76, 2011.
- Naglik J.R., Newport G., White T.C., Fernandes-Naglik L.L., Greenspan J.S., Greenspan D., Sweet S.P., Challacombe S.J., Agabian N. *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.*, 67: 2482-2490, 1999.

- Navarathna D.H., Hornby J.M., Krishnan N., Parkhurst A., Duhamel G.E., Nickerson K.W. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 75: 1609-1618, 2007.
- Nett J., Marchillo K., Spiegel C., Andes D. Development and validation of an *in vivo* *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect. Immun.*, 78: 3650-3659, 2010.
- Neville B.A., d'Enfert C., Bournoux M.E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res.* 15: 7, 2015.
- Nickerson K.W., Atkin A.L., Hornby J.M. *Quorum Sensing* in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3805-3813, 2006.
- Nikawa H & Hamada T. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* *in vitro*. *Arch. Oral Biol.*, 35: 571-573, 1990.
- Nikawa H., Nishimura H., Hamada T., Kumagai H., Samaranayake L. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopathologia*, 139: 87-91, 1997.
- Nikawa H., Nishimura H., Makihira S., Hamada T., Sadamori S., Samaranayake L. Effects of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*, 43: 139-143, 2000.
- Nishiyama Y., Nakaoka C., Hiratani T., Abe S., Uchida K., Yamaguchi H. Synergy of lysozyme and lanconazole on the morphology of *Candida albicans*. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 50: 41-49, 2001.
- Noble R.E. Salivary alpha-amylase and lysozyme levels: a non-invasive technique for measuring parotid vs submandibular/sublingual gland activity. *J Oral Sci*, 42: 83-86, 2000.
- Odds F. C. *Candida* and candidosis, a review and bibliography (Second Edition). Baillière Tindall (Saunders) (London-Philadelphia-Toronto-Sydney-Tokyo), 1988.
- Odds F.C & Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1923-1929, 1994.
- Oh K.B., Miyazawa H., Naito T., Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 4664-4668, 2001.
- Olsen I. Oral adhesion of yeasts. *Acta Odontol. Scand.*, 48: 45-53, 1990.
- Park S.E., Blissett R., Susarla S.M., Weber H.P. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. *J Prosthodont*, 17: 365-369, 2008.
- Phillips D.C. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.*, 215: 78-90, 1966.
- Powderly W.G. Oral fungal infections. *in* Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A. eds. *Clinical Mycology*, Churchill Livingstone Elsevier, 2009.
- Pruitt K., Kamau D., Miller K., Månsson-Rahemtulla B., Rahemtulla F. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase,

- human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase. *Anal. Biochem.*, 191: 278-286, 1990.
- Pruitt K., Tenovuo J., Månsson-Rahemtulla B., Harrington P., Baldone D. Is thiocyanate peroxidation at equilibrium *in vivo*? *Biochim. Biophys. Acta*, 870: 385-391, 1986.
- Radford D.R., Challacombe S.J., Walter J.D. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10: 99-116, 1999.
- Ramage G., Saville S.P., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5459-5463, 2002.
- Ramage G., Tomsett K., Wickes B.L., López-Ribot J.L., Redding S.W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 98: 53-59, 2004.
- Rodríguez Acosta E.J., da Silva P.M., Jacobina M., Lara V.S., Neppelenbroek K.H., Porto V.C. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. *J Prosthodont*, 24: 200-206, 2015.
- Rotrosen D., Calderone R.A., Edwards J.E., Jr. Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Rev. Infect. Dis.*, 8: 73-85, 1986.
- Saidi S., Luitaud C., Rouabhia M. *In vitro* synergistic effect of farnesol and human gingival cells against *Candida albicans*. *Yeast*, 23: 673-687, 2006.
- Sakalauskiene J., Surna A., Ivanauskiene E., Zekonis G., Gleiznys A. Secretory function of neutrophilic leucocytes of the patients with periodontal diseases. *Stomatologija*, 7: 90-94, 2005.
- Salton M.R. The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol Rev*, 21: 82-100, 1957.
- Salvatori O., Puri S., Tati S., Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *J. Dent. Res.*, 95: 365-371, 2016.
- Samaranayake L.P., McCourtie J., MacFarlane T.W. Factors affecting the *in-vitro* adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch. Oral Biol.*, 25: 611-615, 1980.
- Samaranayake L.P. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 73: 171-180, 1992.
- Samaranayake Y.H., MacFarlane T.W., Aitchison T.C., Samaranayake L.P. The *in vitro* lysozyme susceptibility of *Candida albicans* cultured in carbohydrate-supplemented media. *Oral Microbiol. Immunol.*, 8: 177-181, 1993.
- Samaranayake Y.H., Wu P.C., Samaranayake L.P., So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS*, 103: 707-713, 1995.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Wu P.C., So M. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS*, 105: 875-883, 1997.

- Schaller M., Borelli C., Korting H.C., Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48: 365-377, 2005.
- Schlörke D., Flemmig J., Birkemeyer C., Arnhold J. Formation of cyanogen iodide by lactoperoxidase. *J. Inorg. Biochem.*, 154: 35-41, 2016.
- Seneviratne C.J., Wang Y., Jin L., Abiko Y., Samaranyake L.P. *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics*, 8: 2936-2947, 2008.
- Seneviratne C.J., Wang Y., Jin L., Abiko Y., Samaranyake L.P. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics*, 10: 1444-1454, 2010.
- Shareck J & Belhumeur P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryotic Cell*, 10: 1004-1012, 2011.
- Shchepin R., Hornby J.M., Burger E., Niessen T., Dussault P., Nickerson K.W. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chem. Biol.*, 10: 743-750, 2003.
- Shepherd M.C., Poulter R.T.M., Sullivan P.A. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 579-614, 1985.
- Shirliff M.E., Krom B.P., Meijering R.A., Peters B.M., Zhu J., Scheper M.A., Harris M.L., Jabra-Rizk M.A. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 2392-2401, 2009.
- Städtler P & Höller H. Toothpastes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 30: 167-172, 1992.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40: 175-179, 2000.
- Stuchell R.N & Mandel I.D. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J. Dent. Res.*, 62: 552-554, 1983.
- Sudbery P., Gow N., Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, 12: 317-324, 2004.
- Susewind S., Lang R., Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses*, 58: 719-727, 2015.
- ten Cate J.M., Klis F.M., Pereira-Cenci T., Crielaard W., de Groot P.W. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J. Dent. Res.*, 88: 105-115, 2009.
- Tenovuo J. & Larjava H. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of [³H]-thymidine by human gingival fibroblasts cultured *in vitro*. *Arch. Oral Biol.*, 29: 445-451, 1984.
- Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis*, 8: 23-29, 2002.
- Thomas E.L., Jefferson M.M., Joyner R.E., Cook G.S., King C.C. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva. *J. Dent. Res.*, 73: 544-555, 1994a.

- Thomas E.L., Milligan T.W., Joyner R.E., Jefferson M.M. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect. Immun.*, 62: 529-535, 1994b.
- Tobgi RS, Samaranayake LP, MacFarlane TW. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to lysozyme. *Oral Microbiol. Immunol.*, 3: 35-39, 1988.
- van der Wielen P.A., Holmes A.R., Cannon R.D. Secretory component mediates *Candida albicans* binding to epithelial cells. *Oral Dis*, 22 : 69-74, 2016.
- Vanden Abbeele A., de Meel H., Courtois P., Pourtois M. Influence of a hypiodite mouth-wash on dental plaque formation *in vivo*. *Bull. Group Int. Sci. Stomatol. et Odontol.*, 39: 57-61, 1996.
- Vanden Abbeele A., de Meel H., Ahariz M., Perraudin J.P., Beyer I., Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*, 25: 222-228, 2008.
- Vukosavljevic D., Custodio W., Siqueira W.L. Salivary proteins as predictors and controls for oral health. *J Cell Commun Signal*, 5: 271-275, 2011.
- Webb B.C., Thomas C.J., Willcox M.D.P., Harty D.W.S., Knox K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J*, 43: 45-50, 1998.
- Westwater C., Balish E., Schofield D.A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic Cell*, 4: 1654-1661, 2005.
- Whiteway M & Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61: 529-553, 2007.
- Wu T & Samaranayake L. P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. *J. Med. Microbiol.*, 48: 711-720, 1999.
- Yoshijima Y., Murakami K., Kayama S., Liu D., Hirota K., Ichikawa T., Miyake Y. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*, 53: 221-226, 2010.
- Yu L.H., Wei X., Ma M., Chen X.J., Xu S.B. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56: 770-775, 2012.

ANNEXES

***Ex vivo* Yeast-Decontamination of Denture by H₂O₂/Iodide/Lactoperoxidase System: Need to Overpass the Microbial H₂O₂ Catabolism**

Sebaa S^{1,2}, Lybaert P¹, Boucherit-Otmani Z², Courtois Ph^{1,3}, Ahariz M¹

¹Laboratory of Physiology and Pharmacology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium. ²University of Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, Tlemcen, Algeria. ³Haute Ecole F. Ferrer, Brussels, Belgium

Abstract

Aim: To evaluate the H₂O₂ consumption by *Candida albicans* cells as a limitation for using H₂O₂ peroxidase systems in denture decontamination from yeasts.

Material and methods: Investigations were conducted on *C. albicans* ATCC 10231 and on clinical samples isolated from 7 dentures. Strains were grown aerobically at 37°C on Sabouraud-chloramphenicol agar. H₂O₂ degradation by yeast suspensions was spectrophotometrically evaluated at 230 nm and H₂O₂ production by glucose-oxidase was quantified by the lucigenin method. *Candida* susceptibility upon H₂O₂-peroxidase systems was tested on Sabouraud solid medium for different H₂O₂ supplies in the presence of iodide and lactoperoxidase.

Results: The rate of H₂O₂ consumption by *C. albicans* ATCC 10231 was 12.1 ± 2.7 nanomoles x min⁻¹ per 10⁶ blastoconidia (mean ± SD, N=8). Data from 7 wild strains (*C. albicans*) ranged from 5.5 to 22.3 nanomoles x min⁻¹ per 10⁶ cells (mean ± SD: 13.1 ± 5.1; median: 12.2). The survival rate of *C. albicans* ATCC 10231 in the presence of H₂O₂-KI-peroxidase over a period of 30 minutes was effectively shown to be dependent on blastoconidia count. Indeed, suspensions with 10⁸ blastoconidia per ml require a higher H₂O₂ intake for killing than suspensions with 10⁷ blastoconidia. *Ex vivo* denture decontamination confirmed the data obtained *in vitro*.

Conclusions: The presence of H₂O₂ as a substrate is critical for a peroxidase antifungal effect but could be removed by enzymes such as catalase from yeast cells themselves. H₂O₂ supply in peroxidase systems has to overpass its consumption by *Candida* cells themselves.

Key Words: *Candida*, *Catalase*, *Dentures*, *Hydrogen peroxide*, *Peroxidase*, *Yeast*

Introduction

Oral peroxidases have been known for several decades as innate non-immune factors, which are secreted by salivary glands (sialoperoxidase) or liberated from neutrophils (myeloperoxidase), and are able to control biofilm growth on oral surfaces [1,2]. The peroxidase substrates in the oral cavity are thiocyanate (SCN⁻), secreted in saliva, and hydrogen peroxide (H₂O₂), and foremost produced by some microorganisms such as streptococci. Peroxidase activity in the oral cavity produces the powerful oxidant hypothiocyanite (OSCN⁻), which is known to present antibacterial and antifungal effects *in vitro* [3-6]. Iodide is another possible substrate, *in vitro* as well, for oral peroxidases producing hypoiodite (OI⁻), which is characterized by an antimicrobial action at a lower concentration than OSCN⁻; nevertheless, iodide secretion in saliva is found to be marginal when compared to thiocyanate secretion [7]. Different authors have proposed the incorporation of peroxidase systems into oral care products to prevent oral and dental consequences of cariogenic, periodontopathic bacteria and yeast proliferation in oral biofilms, while others have proposed using peroxidase systems for patients with halitosis or dry mouth [8-14]. Nevertheless, few (if any) studies have demonstrated their efficiency by clinical trials, *a fortiori*, on a large scale [13]. Such investigations meet biological and clinical difficulties, which implies sophisticated designs and the cautious interpretation of data. Investigators need to test several control groups to evaluate 1°) the placebo effect due to the mechanical impact of brushing or rinsing, 2°) the presence of compounds as excipients and 3°) the stimulation of hygiene by the investigator's intervention [9,10,15]. Moreover, the

choice of biological markers can reveal or mask a real effect. For instance, peroxidase use may affect metabolic parameters such as ATP content without decreasing the microbial count [16]: taking into account one rather than the other can lead to reverse conclusions. Finally, transposition of *in vitro* data to *in vivo* situations must take into account the complexity of the oral environment with numerous microorganisms organized in biofilms, and not in suspension, and with numerous bacterial or salivary molecules [17,18]. Thereby, in the case of peroxidase, the presence of H₂O₂ is critical for the antimicrobial effects: this could be absent or removed by enzymes such as catalase from bacteria themselves [6].

The present study aims to investigate the role of *Candida* H₂O₂ catabolism as a limitation for using the H₂O₂-iodide-lactoperoxidase system in denture decontamination from yeasts and to highlight so the need of a physiological approach for developing new oral care products which copy saliva.

Material and Methods

Microorganisms

Yeasts were grown aerobically at 37°C on Sabouraud-agar with chloramphenicol and gentamycin (BD Diagnostics™, Erembodegem, Belgium). All *in vitro* investigations were conducted on a third subculture of *C. albicans* ATCC 10231 (Culti-Loops™, Oxoid™, Basingstoke, UK), suspended in Sabouraud broth (OXOID™ CM147, Basingstoke, UK), in phosphate buffer (0.1 M, pH 7 with 0.1 g/l glucose) or in distilled water. The suspension was approximately adjusted with a 5-McFarland standard and then to an absorbance of

0.800 at 600 nm before dilution for blastoconidia count or CFU count. For the *ex vivo* investigations on dentures, yeasts were isolated and identified on the basis of their colony aspect on CHROMagar™ medium [19], by chlamydoconidia formation on PCB agar and by API yeast identification system.

Peroxidase systems

Two different peroxidase systems were tested on biofilm formation: a hydrogen peroxide (H₂O₂)/lactoperoxidase (LPO, 1 U_{ABTS}/ml)/iodide (KI, 1.2 mM) system, generating hypiodite (OI⁻), and H₂O₂ / LPO (1 U_{ABTS}/ml) / thiocyanate (KSCN, 1.2 mM), producing hypothiocyanite (OSCN⁻). H₂O₂ was concomitantly produced by glucose-oxidase (GOD, from 12 mU/ml to 12 U/ml) and Glucose (G) at a concentration of 44.4 mM.

H₂O₂ assays

H₂O₂ degradation by yeast and H₂O₂ production by glucose-oxidase suspensions were evaluated by spectrophotometry at 230 nm and by chemiluminescence (lucigenin method), respectively. Both methods present limitations such as the interference of proteins and turbidity of *Candida* suspensions in the spectrophotometric readings at 230 nm, or the inhibition of chemiluminescence by ions, *inter alia* phosphate and salt ions. The spectrophotometric method [20] is based on H₂O₂ absorbance at 230 nm (extinction coefficient [21] in 0.1 M phosphate buffer pH 7: 0.071 mM⁻¹ x cm⁻¹); characteristics of the method are as follows: analytical range from 5 to 30 mM, coefficient of accuracy and of variation inferior to 1.5 and 5% respectively, initial H₂O₂ concentration of 10.2 mM. The chemiluminescence method [22] is based on the oxidation of lucigenin (20 μM) by H₂O₂ in an alkaline solution (8.3 mM Na₂CO₃ adjusted at pH 10.4) producing photon emission which was then measured on a bioluminometer LKB 1250 (LKB-Wallac™, Turku, Finland); characteristics of the method are as follows: analytical range from 0.1 to 4 mM, coefficient of accuracy and of variation inferior to 1.5 and 5%, respectively.

Mycological investigations

Microscopically, *C. albicans* in suspension was in the form of budding cells called blastoconidia (round 5 μm in diameter). *C. albicans* ATCC 10231 was adjusted up to 10⁸ blastoconidia / ml. All swabs from resin pieces or dentures were inoculated on Sabouraud agar with chloramphenicol and gentamycin (BD Diagnostics™, Erembodegem, Belgium), which were incubated for 2 days at 37°C before Colony Forming Unit (CFU) count was performed.

Biofilms on resin pieces

Acrylic resin pieces (thickness ~2 mm, size 25 mm x 5 mm) were processed according to the manufacturer's instructions and stored at 4°C in sodium azide 0,1 % (w/v) to test the effect of peroxidase systems *in vitro*. For biofilm production, each resin piece was washed 7 times in 4 ml sterile distilled water and immersed in 4 ml Sabouraud liquid medium with 50 μl of *C. albicans* ATCC 10231 suspension adjusted at 0.800 optical density on a Beckman™ DU®-65 spectrophotometer at 600 nm. After 3-days incubation at room temperature with continuous rotary agitation (Stuart® rotator/SB3, Staffordshire, UK) at 6 rpm, the liquid phase was aspirated and each resin piece transferred into a 15 ml Falcon® polypropylene conical tube (Becton Dickinson™, Franklin Lakes, NJ, USA). Resin pieces were then incubated at 37°C during 30 min in the presence of peroxidase systems (total volume: 4 ml). At the end of

incubation time, peroxidase solution was aspirated and resin pieces plated onto Petri dishes.

Dentures

Denture wearers were free of denture stomatitis or any other oral disease and were not exposed to antifungal or antibacterial medication. *Ex vivo* yeast decontamination by peroxidase systems was performed on a total of 23 maxillary complete dentures which were previously shown to be *Candida sp.* positive by swabbing the fitting surface of the denture. *Ex vivo* decontamination procedure consisted in diving denture in peroxidase solution during 30 minutes before a second swabbing.

Statistics

Data were analyzed through unpaired t-test of Student, ANOVA, Chi-square and Fischer's exact tests using the GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software™, San Diego, California, USA). Mean values were expressed with their related standard error of the mean, unless indicated otherwise.

Results

Candida count

Candida cell number in suspension was evaluated by blastoconidia count in a Thoma cell, by Colony Forming Unit (CFU) count on Sabouraud solid medium and by turbidimetry on a spectrophotometer at 600 nm. *Table 1* reports the data obtained by both counting procedures simultaneously performed on *C. albicans* suspensions from ATCC 10231 and wild strains after adjustment by turbidimetry at a 600 nm absorbance of 0.800. In ATCC 10231 suspensions, direct microscopic count of blastoconidia (bl) in a Thoma cell and CFU count after culture on Sabouraud solid medium were 21.42 ± 0.92 x 10⁶ bl/ml (N=12) and 13.00 ± 0.77 x 10⁶ CFU/ml (N=12) respectively: both procedures provided data which were highly significantly different (unpaired t-test, p<0.0001). In *C. albicans* isolated from dentures, microscopic and CFU counts were closer: 22.93 ± 1.14 x 10⁶ bl/ml (N=7) and 19.54 ± 1.37 x 10⁶ CFU/ml (N=7), respectively (unpaired t-test: NS, p=0.0814). Direct counting by microscopy in reference strain suspensions (adjusted at a 600 nm absorbance of 0.800) thus provided data which approximated those found in wild strain suspensions prepared in the same manner (unpaired t-test: NS, p=0.3243). However, CFU count in 0.800 adjusted suspensions is highly significantly lower in reference strain suspensions than in wild suspensions (unpaired t-test, p=0.0003). Consequently, the ratio of blastoconidia to CFU count was 1.72 ± 0.12 (N=12) for the reference strain and 1.21 ± 0.12 (N=7) for the wild strains: this difference is significant (unpaired t-test, p=0.0125).

Figure 1 shows the relationship between the absorbance at 600 nm and the number of blastoconidia present in the suspension as part of a rectangular hyperbola with the

Table 1. Evaluation of 2 different procedures for *Candida* count in H₂O suspension adjusted at a 600 nm absorbance of 0.800, from ATCC 10231 and wild strains. Count data are expressed as millions of blastoconidia cells or CFU per ml (mean ± SEM).

	Microscopic count (10 ⁶ cells/ml)	CFU count (10 ⁶ CFUs/ml)
ATCC 10231	21.42 ± 0.92 (N=12)	13.00 ± 0.77 (N=12)
Wild strains	22.93 ± 1.14 (N=7)	19.54 ± 1.37 (N=7)

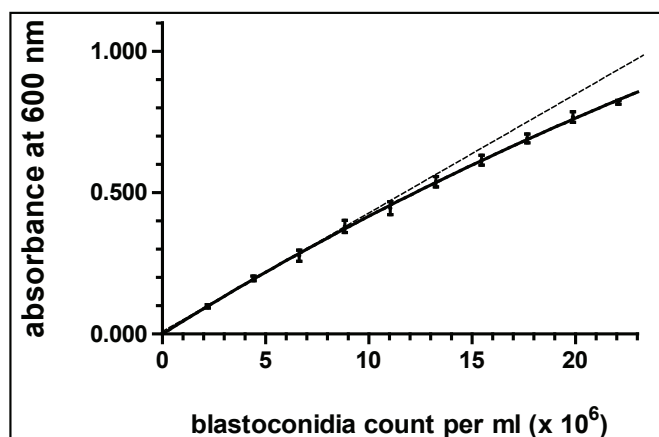


Figure 1. Relation between absorbance at 600 nm and *Candida blastoconidia* count (blastoconidia cell / ml $\times 10^6$). Error bars in this graph indicate the standard deviation ($N = 3$ from one *C. albicans* ATCC 10231 suspension).

equation $y = 4.5x / 98.7 + x$ ($r = 0.9985$). In these experiments ($N = 3$), a 20-fold dilution of a suspension containing 20×10^6 blastoconidia per ml decreased the 600 nm absorbance from 0.813 ± 0.007 to 0.049 ± 0.002 , that is to say by a ratio of 16.7. A supplementary set of experiments ($N = 6$) confirmed this ratio: a 20-fold dilution of *Candida* suspension decreased the suspension absorbance from 0.794 ± 0.007 to 0.048 ± 0.002 (ratio: 16.5).

Figure 2 shows the variation in blastoconidia number (expressed as the percentage of the initial value) after 30-180 minutes incubation in water versus Sabouraud broth. In water, blastoconidia number at 30 min fluctuated from $95.2 \pm 6.4\%$ of the initial amount ($N = 6$) and $113.9 \pm 8.1\%$ ($N = 6$) at 150 min. In broth, blastoconidia count varied between $107.0 \pm 5.2\%$ ($N = 6$) at 60 min and $131.3 \pm 10.4\%$ ($N = 6$) at 180 min. Data observed in water remained within the range of the mean ± 3 SEM for 180 min. Nevertheless, in broth, the count data remained within the same range for only 90 min.

Measuring H_2O_2 consumption by blastoconidia

Blastoconidia of *C. albicans* ATCC 10231 decreased the absorbance at 230 nm of different H_2O_2 solutions. **Figure 3a** (upper graph) shows that the H_2O_2 consumption by *C. albicans* ATCC 10231 blastoconidia is directly proportional to blastoconidia count. The equation of the fitted line is $y = 11.3x$ and the regression coefficient r is 0.9575. These results are representative of six independent experiments. **Figure 3b** (lower graph) illustrates the relation between the H_2O_2 consumption rate by yeast cells and its initial concentration, which can be assimilated to a rectangular hyperbola: $y = 138.6x / (123.7 + x)$, with a coefficient of regression r equaling 0.9940. The maximum rate (V_{max}) corresponded to a H_2O_2 concentration outside the superior analytical range of the spectrophotometric method (30 mM). The Lineweaver-Burk double-inverse plot linearized the rectangular hyperbola (fitting equation: $y = 0.78x - 0.01$; regression coefficient: $r = 0.9872$), where x-intercept corresponding to $-1/K_m$ and the y-intercept to $1/V_{max}$ allowed the calculation of an apparent K_m of 55.1 mM and a theoretical V_{max} of 70.6 nanomoles/min. The consumption rate of H_2O_2 increased from 5.7 nmol for 0.5×10^6 blastoconidia to 28.3 nmol for 2.5×10^6 blastoconidia.

H_2O_2 consumption rate by *C. albicans* ATCC 10231 was 12.1 ± 2.7 nanomoles \times min⁻¹ per 10^6 blastoconidia (mean \pm

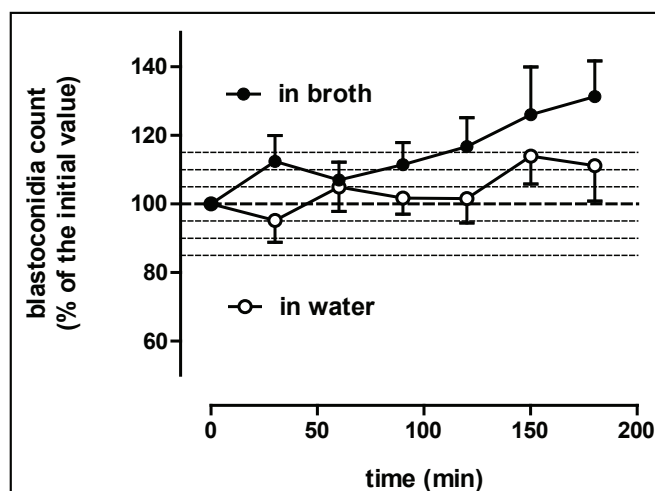


Figure 2. *Blastoconidia* survival rate in water versus *blastoconidia* growth in broth related to time (min). The data are expressed as the percentage of the initial value. Error bars in this graph indicate the standard error of the mean ($N = 6$).

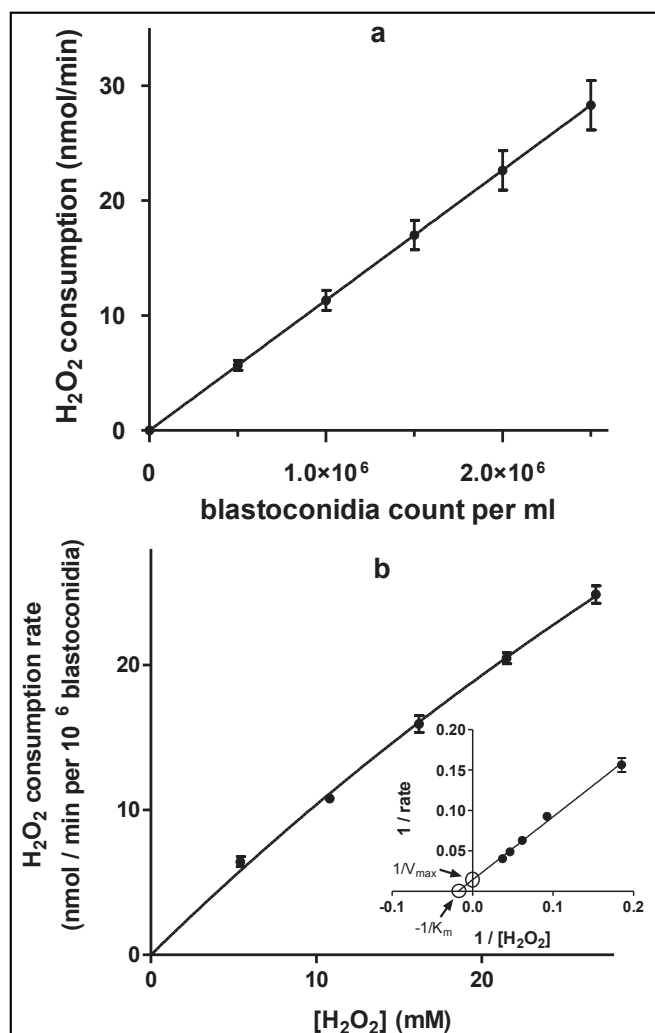


Figure 3. H_2O_2 consumption by yeast cells. Upper graph **a**: relationship between H_2O_2 disappearance rate and blastoconidia count. **b**: Lower graph: kinetic aspects of H_2O_2 consumption by yeast cells, with Lineweaver-Burk double inverse plot as insert.

SD, $N = 8$). Data from 7 *C. albicans* wild strains ranged from 5.5 to 22.3 nanomoles \times min⁻¹ per 10^6 cells (mean \pm SD: 12.1 ± 2.7 ; median: 12.2). This H_2O_2 consumption did not vary from one subculture to another. **Figure 4** compares the results obtained in three successive subcultures for 7 clinical strains of *C. albicans*: H_2O_2 consumption did not differ in 3 serial

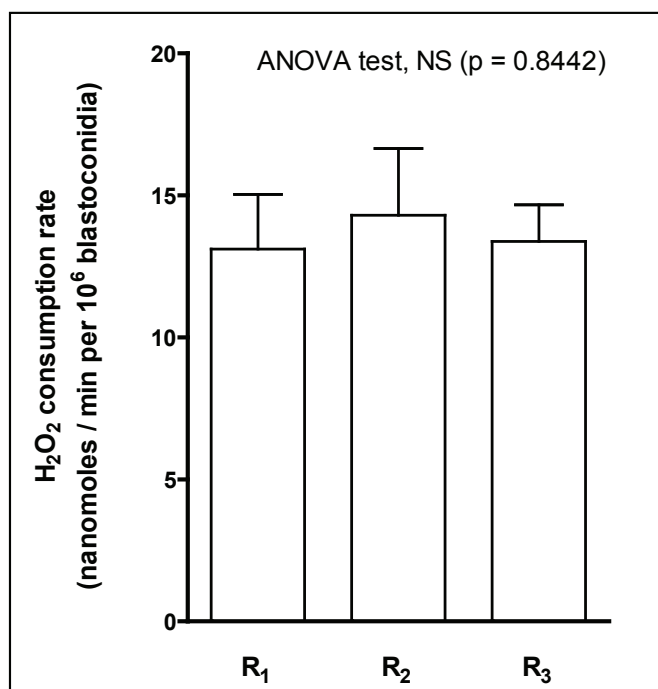


Figure 4. H₂O₂ consumption in 3 successive subcultures (R_{1,3}) of *Candida albicans* clinical isolates (N=7).

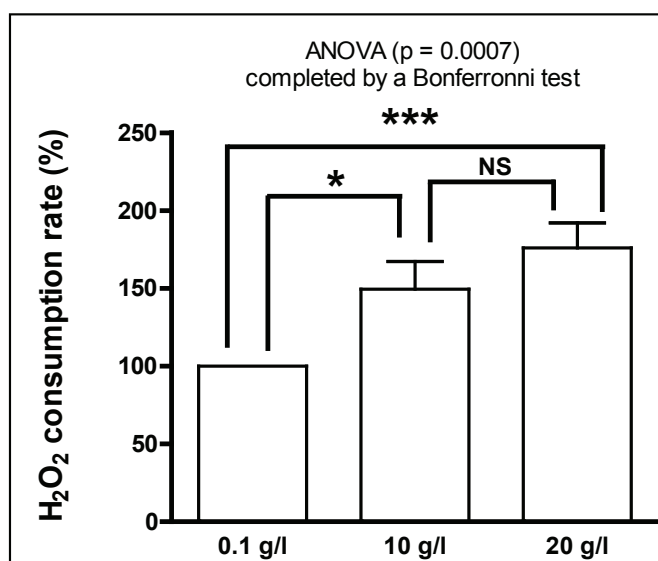


Figure 5. H₂O₂ consumption per minute by clinical *Candida albicans* isolates at 3 different concentrations of glucose. The data (mean \pm SEM) are expressed as the percentage of the value found at the lowest glucose concentration.

subcultures (ANOVA: $p=0.8442$, NS) averaging 13.1, 14.3 and 13.4 nmol/min per 10⁶ blastoconidia. Figure 5 shows the effect of glucose concentration in the reaction medium on H₂O₂ consumption by blastoconidia. Increasing the amount of glucose in the reaction mixture significantly multiplied the H₂O₂ consumption by blastoconidia. Indeed, the increase of glucose concentration from 0.1 g/l to 10 or 20 g/l multiplied H₂O₂ consumption by 1.5 and 1.8, respectively, in a significant manner (ANOVA complemented by a Bonferroni test: $p < 0.01$).

Measurement of H₂O₂ production by G/GOD

Table 2 reports data concerning the H₂O₂ production by GOD (1.2 U/ml and 12 U/ml) after 30-min incubation in H₂O at 37°C. As expected, at 37°C, 12 U/ml GOD activity induced a stronger production of H₂O₂ (1.04 \pm 0.04 μ mol/ml, N=7) than 1.2 U/ml solution (0.45 \pm 0.02 μ mol/ml, N=7): the impaired

Table 2. H₂O₂ concentration reached after a 30 min-incubation of glucose (44.4 mM) glucose oxidase (1.2 versus 12.0 U/ml) in distilled water at 37°C. H₂O₂ was assayed by the lucigenin method.

	GOD (1.2 U/ml)	GOD (12.0 U/ml)
mean value \pm SEM (μ mol/ml) CV (%)	0.45 \pm 0.02	1.04 \pm 0.04
	14.2	10.5

t-test showed a highly significant difference ($p < 0.0001$). Figure 6a-b examines the production of H₂O₂ in an aqueous medium by GOD in the absence of peroxidase LPO as a function of GOD activity (upper graph 6a) and as a function of time (lower graph 6b). In the presence of 44.4 mM glucose, increasing GOD activity in a manner of geometric progression from 12 mU/ml to 12 U/ml multiplied H₂O₂ production by a factor of nearly 15 (after 30 min at 37°C).

Detoxification of H₂O₂ by catalase

Figure 7 illustrates the inhibition of *C. albicans* ATCC 10231 growth in liquid medium (monitored by turbidimetry at 600 nm) in the presence of the glucose (155 mM)/glucose oxidase (12 U/ml) system after incubation for 5 hours. The absorbance at 600 nm was 0.170 \pm 0.004 (N=6) in the control suspensions but absorbance was only 0.033 \pm 0.002 (N=6) in the presence of G/GOD (12 U/ml). The addition of catalase (5000 U/ml) to G/GOD solution removed this inhibitory effect: the absorbance is then equal to 0.185 \pm 0.007 (N=6) after 5-hours of incubation. In the presence of G/GOD without catalase, growth inhibition was statistically significant (ANOVA completed by Bonferroni test $p < 0.001$) from the control and G/GOD/catalase conditions. Figure 8 reports the survival rate of planktonic yeast cells in the presence of the G/GOD/KI/LPO system as a function of the amount of GOD-produced H₂O₂ during 30-min of incubation. The system was then evaluated using 2 different *Candida* suspensions: one containing 10⁷ blastoconidia per ml, and the other containing 10⁸ blastoconidia per ml.

The first suspension was very sensitive to the peroxidase system, while the second was more resistant. Figure 8 presents the mean values of 7 independent experiments.

Effect of G/GOD/KI/ peroxidase system on *in vitro* preformed *Candida*-biofilms

Figure 9 compares the candidacidal effect of hydrogen peroxide, hypothiocyanite and hypiodite enzymatically produced at 37°C or room temperature. Two different amounts of GOD (1.2 and 12 U/ml) were evaluated. Only hypiodite produced by a peroxidase system at 37°C containing 12 U of GOD per ml reduced the *Candida* number harvested from biofilms on resin foils down to at least 2 log units (Kruskal-Wallis test complemented by a post-test of Dunns: $p < 0.01$). Figure 10 shows *Candida* blastoconidia adherent on resin foils after 3 washings.

Ex vivo investigations

Table 3a illustrates the effect of G (8 mg/ml)/GOD (1.2 U/ml) versus the G (8 mg/ml) / GOD (1.2 U/ml) / KI (0.2 mg/ml)/LPO (1 ABTS U/ml) system in *ex vivo* denture decontamination at room temperature. The colony count after swabbing showed a decrease of at least 1 logarithmic unit in 1 out of 5 cases after denture immersion in G/GOD solution and in 2 out of 5 cases after immersion in the G/GOD/KI/LPO mixture, when compared with the control swabbing before decontamination. A Chi-square test ($p=0.4762$) failed to show any significant difference between the groups. Table

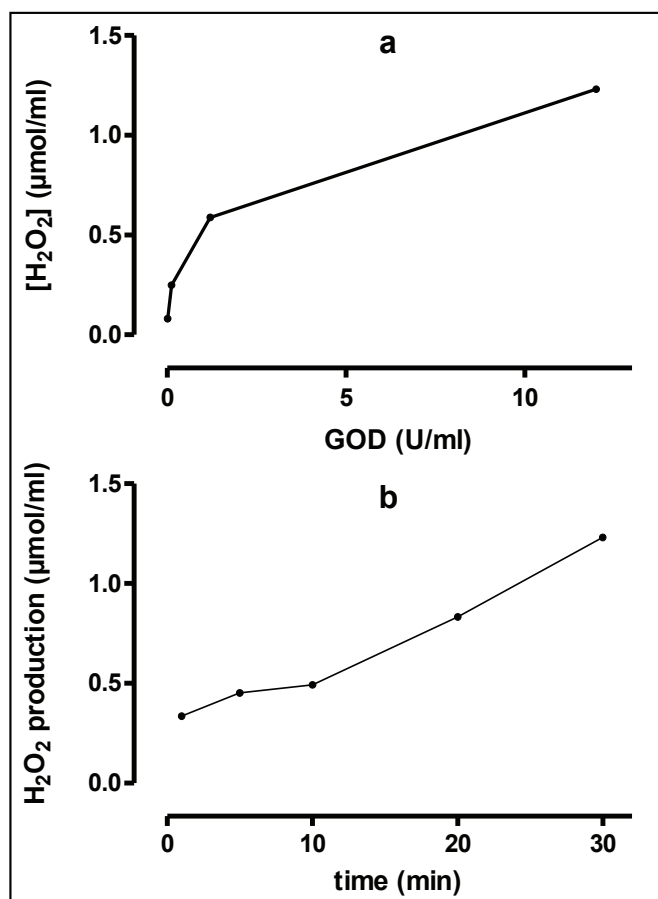


Figure 6. Upper graph **a)** H₂O₂ (µmol/ml) produced by G/GOD at different GOD activities after a 30-min incubation. **b).** Lower graph: time course of H₂O₂ production (µmol/ml) in the presence of 12 U/ml GOD activity.

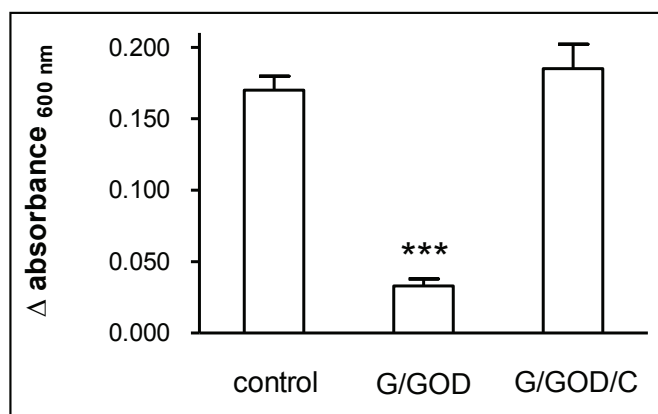


Figure 7. Effect of catalase (C) on the inhibition of yeast growth by the G/GOD system at 12 U/ml GOD after a 5-hour incubation.

3b illustrates the effect of 30-min of incubation at 37°C in the presence of a lactoperoxidase system similar to the first one except for a higher GOD activity (12 U/ml). After swabbing, the CFU count showed a decrease of at least 1 logarithmic unit in 6 out of 6 cases when the dentures were immersed in the solution, while incubation in water caused no significant change. A Chi-square test (p=0.0005) confirmed a highly significant difference.

Discussion

For several decades, peroxidase systems have been incorporated in oral hygiene products on the basis of *in vitro* testing against strains isolated from oral microflora, while *in vivo* data and clinical trials are still lacking to prove their

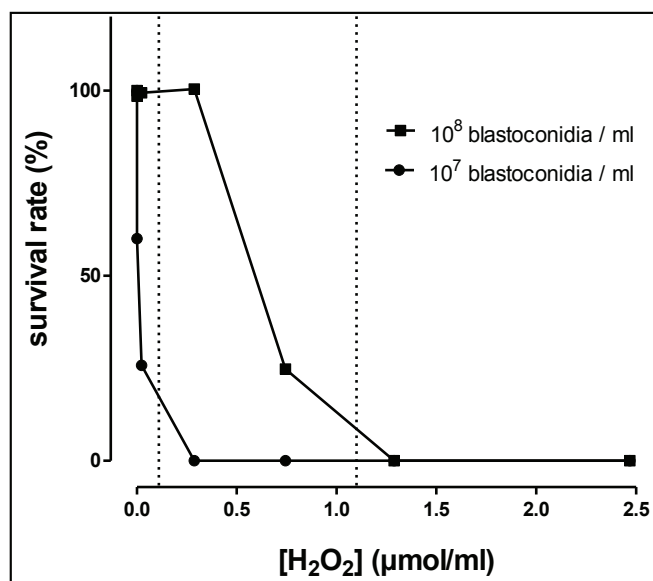


Figure 8. *C. albicans* ATCC 10231 blastoconidia survival (%) as a function of H₂O₂ (mM) in 2 yeast suspensions containing respectively 10⁷ (●) and 10⁸ (■) blastoconidia/ml. Dotted lines indicate theoretical detoxification cut-off inferred from measuring the H₂O₂ consumption per min by blastoconidia in Figure 3 data.

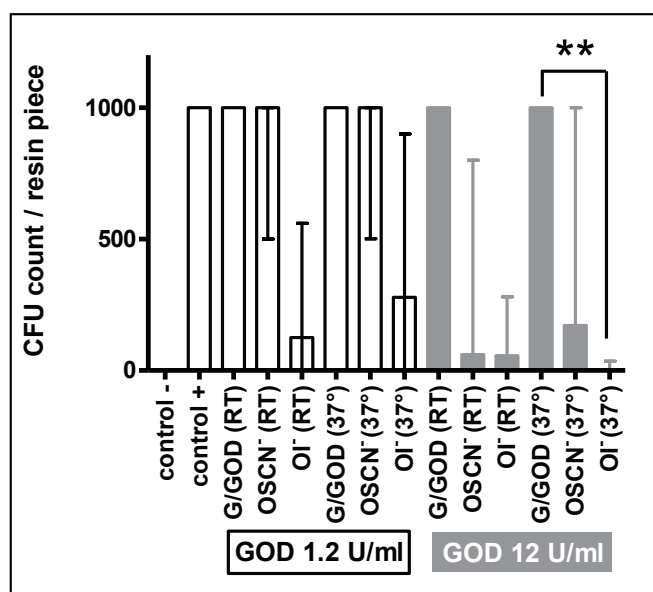


Figure 9. Decontamination of resin foils upon preformed *Candida*-biofilm by peroxidase systems after a 30 minutes incubation at 37°C. The height of the columns corresponds to the median values and bars to the lower and upper limit rounded to 1000 CFU. Statistical test: Kruskal-Wallis complemented by a post-test de Dunns (**=p < 0.01).

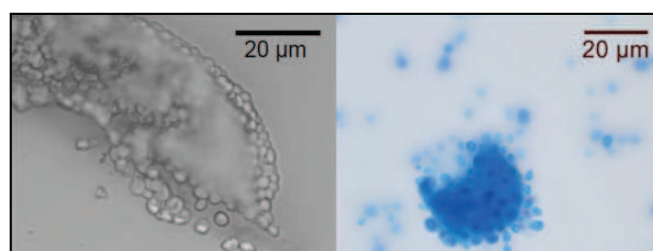


Figure 10. *Candida* blastoconidia on a resin granule (magnification: 400 x). Left: direct examination; right: Blue Cotton staining.

in vivo efficiency in the oral environment. H₂O₂ degradation by some bacteria and yeast (unless a critical cut-off level of abundance is overpassed) can explain the *in vivo* inefficiency of peroxidase systems which need H₂O₂ as a substrate.

Table 3. Ex vivo decontamination of dentures by KI-lactoperoxidase system.
3a (upper part): G/GOD/KI/L versus G/GOD at room temperature; 3b
(lower part): G/GOD/KI/LPO versus H₂O at 37°C.

	G/GOD	G/GOD/KI/LPO
reduction	1	2
no reduction	4	3
total	5	5
Chi-square: p=0.4762 (N=10), NS Fisher's exact test: p=1.0000 (N=10), NS		
	H ₂ O	G/GOD/KI/LPO
reduction	0	6
no reduction	6	0
total	6	6
Chi-square: p=0.0005 (N=6) Fisher's exact test: p=0.0022 (N=6)		

Moreover, oral microflora biofilm mode of life is presented as an additional factor of resistance to antimicrobials.

Evaluation of procedures

This study investigated the balance between a H₂O₂ donor system and the H₂O₂-detoxification power in *C. albicans* strains submitted to the H₂O₂/SCN⁻/I/LPO system. It aimed to validate *Candida* count procedures and to evaluate yeast survival rate under different experimental conditions dictated by chemical (pH, inhibitors...), enzymatic (optimal pH, substrates concentration, kinetic aspects...) and bacteriological (sterility, growth conditions...) requirements. The optimal pH for biofilm formation and for GOD activity covers a comparable wide acidic range of 4.0-7.0 and 5.0-6.5, respectively [23,24]. CFU count (sometimes) provides results that are slightly inferior to blastoconidia count, probably because budding cells and aggregated cells are distinctly counted under a microscope, but both initiated single colony forming units on Petri dishes. *C. albicans* isolates survived in water without growth for at least 2 hours, allowing the preparation of different reaction media for investigations, while the same strain started to grow after 90 minutes when these cells were re-suspended in fresh broth. All of the experiments were performed on a third sub-culture: H₂O₂ consumption was shown to remain stable in 3 serial subcultures (ANOVA, NS, p=0.8442). In the absence of peroxidase, G/GOD produced enough H₂O₂ to reduce *Candida* growth when GOD activity was 12 U/ml (Figure 7), but H₂O₂-degrading enzyme activities (foremost catalase and glutathione peroxidase) were able to reverse this anti-*Candida* effect. In the presence of a peroxidase sequence (with KI or KSCN substrate), no H₂O₂ could be measured, implying that the anti-*Candida* effect of peroxidases systems is due to the products (OI⁻/OSCN⁻) of peroxidase activity and not due to the H₂O₂ provided. At a H₂O₂ concentration that is not effective against *Candida*, the addition of peroxidase with a substrate to H₂O₂ donors makes the combination antifungal; the beneficial effect of such a mixture has already been described [1,4,6,25]. Evaluation of H₂O₂ production and consumption depended on the reaction medium composition: proteins which absorb in the UV spectrum make the chemiluminescence method more suitable for H₂O₂ production measurement, while phosphate buffer ions and salts impede chemiluminescence, making the spectrophotometric method more appropriate for H₂O₂ consumption measurements. Whole fungal cells caused a manageable turbidity that was compatible with spectrophotometry, but inconvenient for lucigenin chemiluminescence. Interestingly, both procedures for H₂O₂

measurement used in this investigation were sensitive enough to fulfill the objectives of this study.

In vitro investigations

The rate of H₂O₂ consumption by *C. albicans* ATCC 10231 (12.1 ± 2.7 nanomoles x min⁻¹ per 10⁶ blastoconidia, mean ± SD, N=8) was found to be close to that obtained from 7 clinical strains which ranged from 5.5 to 22.3 nanomoles x min⁻¹ per 10⁶ cells. Increasing the glucose concentration from 0.1 to 10 or 20 g/L multiplied the rate of H₂O₂ disappearance by a factor of 1.5 and 1.8, respectively: this observation supports the probability of fluctuation in the oral environment, where glucose depends on alimentary intakes. Analysis of H₂O₂ consumption by blastoconidia indicated that the rate of disappearance obeys Michaelis-Menten laws, with an apparent K_m calculated by the double-reciprocal Lineweaver-Burk plot. This investigation did not envisage further the molecular pathways leading to H₂O₂ decrease in a medium containing *C. albicans* blastoconidia which were known to be catalase-positive. The presence of catalase in *C. albicans* can be related to the high H₂O₂ concentration (from 4 to 88 mM quoted in the literature [25]) required to inhibit clinical isolates. Previous studies [26-28] have demonstrated a protective role of catalase upon H₂O₂ in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by studying the association of catalase-positive and -negative strains. These authors concluded on a group protection effect rather than an individual effect allowing catalase-negative bacteria to survive in the presence of H₂O₂-producing micro-organisms when left in aggregates such as biofilms. In this study, planktonic *Candida* inhibition by the peroxidase system has been shown to be effective when the GOD-produced H₂O₂ concentration was superior to the capacities of yeast suspensions to metabolize it. Moreover, this study reported that the KI/peroxidase system became efficient with regard to *Candida* biofilm preformed on resin foils in comparison to the mere G/GOD sequence when a higher GOD activity was supplemented (from 1.2 to 12 U/ml) and when the enzyme solution was incubated at 37°C versus room temperature, as this contributed to increasing the enzyme activity as well. A previous investigation had already demonstrated a higher efficacy for hypoiodite than for hypothiocyanite produced by the SCN⁻/peroxidase system [29].

Ex vivo investigations

A previous paper [15] investigated the different species usually found on dentures. Swabbing of the palatal side of the prosthesis was yeast-positive in 66 out of 87 subjects (75.9%) while the adjacent mucosal surface was positive in 72.4% of cases; 68.2% of subjects simultaneously showed contamination of both denture and mucosa. The 3 species mainly isolated were *C. albicans* (77.9% of yeast-positive subjects), *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* (44.1 and 19.1% of swabs respectively). The contaminated maxillary dentures were shown heavily colonized (more than 50 CFU) in 90.9% cases and more than one yeast species was found in 50.0% of contaminated dentures. Moreover, other studies [30] reported that denture wearers often develop denture stomatitis linked to *C. albicans* contamination, what could be prevented by adequate prosthesis care.

In the present investigation, the data obtained *in vitro* were used to define suitable conditions to decontaminate *Candida*-

positive dentures by immersing them in a solution containing the G/GOD/KI/LPO system at 37°C for 30 min. The dentures were swabbed before and after a 30-min immersion in the enzyme solution at 37°C. Data were compared with those obtained after immersion in G/GOD alone or in water. The G/GOD (1.2 U/ml) and KI/lactoperoxidase systems were ineffective at room temperature. In contrast, a reduction superior to one logarithmic unit was always observed when the GOD activity was 12 U/ml in a G/GOD/KI/LPO system incubated at 37°C.

Conclusion

To be efficient, H₂O₂ supply in peroxidase systems has to overpass its consumption by *Candida* cells themselves. The survival rate of *C. albicans* ATCC 10231 in the presence of H₂O₂/KI/peroxidase for 30 minutes was effectively shown to be dependent on yeast capacity to decrease H₂O₂ levels. Similarly, *ex vivo* denture decontamination by the peroxidase system is possible with higher GOD activities that are able

to overpass H₂O₂ diversion by oral biofilms. These data have to be considered as a base to develop further clinical studies on a larger scale, illustrating well the need to deepen the knowledge of the physiological oral complexity before developing oral care products which copy saliva.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the *Xenophilia* Funds (Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium). The authors thank M. Fadel who validated *Candida* count procedures in the frame of a postdoctoral training abroad in our laboratory. The authors also thank Z. Nasr, a student at the Haute Ecole F. Ferrer (Brussels, Belgium) who contributed to H₂O₂ measurement in the frame of her Baccalaureate thesis, G. Vegh for his technical help in microscope management and Pr M. Stas, MD PhD, for her review of the manuscript.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

References

- Ihalin R, Loimaranta V, Tenovuo J. Origin, structure and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006; **445**: 261-268.
- Ahariz M, Courtois P. *Candida albicans* biofilm on titanium: Effect of peroxidase pre-coating. *Medical Devices*. 2010; **3**: 33-40.
- Carlsson J. Salivary peroxidase: An important part of our defense against oxygen toxicity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1987; **16**: 412-416.
- Lenander-Lumikari M. Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H₂O₂ system. *Oral Microbiology and Immunology*. 1992; **7**: 315-320.
- Garcia-Mendoza A, Liébana J, Castillo AM, de la Higuera A, Piédrola G. Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide. *Journal of Medical Microbiology*. 1993; **39**: 434-439.
- Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infection and Immunity*. 1994; **62**: 529-535.
- Ferguson D. Oral Bioscience. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1999.
- Städler P, Höller H. Toothpastes. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*. 1992; **30**: 167-172.
- Hatti S, Ravinda S, Satpathy A, Kulkarni RD, Parande MV. Biofilm inhibition and antimicrobial activity of a dentifrice containing salivary substitutes. *International Journal of Dental Hygiene*. 2007; **5**: 218-224.
- Shin K, Yaegaki K, Murata T, Ii H, Tanaka T, Aoyama I, Yamauchi K, Toida T, Iwatsuki K. Effect of a composition containing lactoferrin and lactoperoxidase on oral malodor and salivary bacteria: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial. *Clinical Oral Investigations*. 2011; **15**: 485-493.
- Van Steenberghe D, Van den Eynde E, Jacobs R, Quirynen M. Effect of a lactoperoxidase containing toothpaste in radiation-induced xerostomia. *International Dental Journal*. 1994; **44**: 133-138.
- Kirstilä V, Lenander-Lumikari M, Söderling E, Tenovuo J. Effects of oral hygiene products containing lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin on the composition of whole saliva and on subjective oral symptoms in patients with xerostomia. *Acta Odontologica Scandinavica*. 1996; **54**: 391-397.
- Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Diseases*. 2002; **8**: 23-29.
- Gil-Montoya JA, Guardia-López I, González-Moles MA. Evaluation of the clinical efficacy of a mouthwash and oral gel containing the antimicrobial proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in elderly patients with dry mouth: A pilot study. *Gerodontology*. 2008; **25**: 3-9.
- Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008; **25**: 222-228.
- Gallez F, Fadel M, Scruel O, Cantraine F, Courtois P. Salivary biomass assessed by bioluminescence ATP assay related to (bacterial and somatic) cell counts. *Cell Biochemistry and Function*. 2000; **18**: 103-108.
- Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Advances in Dental Research*. 1997; **11**: 110-126.
- Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *Journal of Dental Research*. 2008; **87**: 900-914.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; **32**: 1923-1929.
- Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1952; **195**: 133-140.
- Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune & Stratton, New York. 1971.
- Yamaguchi S, Kishikawa N, Ohya K, Ohba Y, Kohno M, Masuda T, Takadate A, Nakashima K, Kuroda N. Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species. *Analytica Chimica Acta*. 2010; **665**: 74-78.
- Krom BP, Cohen JB, McElhaney Feser GE, Cihlar RL. Optimized candidal biofilm microtiter assay. *Journal of Microbiological Methods*. 2007; **68**: 421-423.
- De Baetselier A, Vasavada A, Dohet P, Ha-Thi V, De Beukelaer M, Erpicum T, De Clerck L, Hanotier J, Rosenberg S. Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: Scale up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology*. 1991; **9**: 559-561.
- Larsen B, White S. Antifungal effect of hydrogen peroxide on catalase-producing strains of *Candida* spp. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 1995; **3**: 73-78.
- Ma M, Eaton JW. Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992; **89**: 7924-7928.
- Elkins JG, Hassett DJ, Stewart PS, Schweizer HP, McDermott

TR. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; **65**: 4594-4600.

28. Stewart PS, Roe F, Rayner J, Elkins JG, Lewandowski Z, Ochsner UA, Hassett DJ. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; **66**: 836-838.

29. Ahariz M, Courtois P. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite. *Journal of Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. 2010; **2**: 69-78.

30. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics*. 2011; **20**: 251-260.

Dose-dependent effect of lysozyme upon *Candida albicans* biofilm

SARRA SEBAA^{1,2}, NICOLAS HIZETTE¹, ZAHIA BOUCHERIT-OTMANI² and PHILIPPE COURTOIS^{1,3}

¹Laboratory of Physiology and Pharmacology, Université Libre de Bruxelles, B-1070 Brussels, Belgium;

²Laboratory of Antibiotics Antifungals: Physico-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, University of Aboubekr Belkaid-Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria; ³Haute Ecole F. Ferrer, B-1070 Brussels, Belgium

Received August 9, 2016; Accepted December 7, 2016

DOI: 10.3892/mmr.2017.6148

Abstract. The present study investigated the *in vitro* effect of lysozyme (0-1,000 $\mu\text{g/ml}$) on *Candida albicans* (*C. albicans*) biofilm development. Investigations were conducted on *C. albicans* ATCC 10231 and on 10 clinical isolates from dentures. Strains were cultured aerobically at 37°C in Sabouraud broth. Yeast growth was evaluated by turbidimetry. Biofilm biomass was quantified on a polystyrene support by crystal violet staining and on acrylic surfaces by counts of colony forming units. Lysozyme affected biofilm formation to a greater extent than it affected growth. For the ATCC 10231 reference strain, lysozyme acted as a biofilm promotor on polystyrene at the highest concentration tested (1,000 $\mu\text{g/ml}$, non-physiological). When the reference strain was investigated on acrylic resin support, lysozyme acted as a significant biofilm promotor on rough resin, but less on smooth resin. The attached biomass in the presence of physiological concentrations of lysozyme (10-30 $\mu\text{g/ml}$) was significantly decreased compared with the hypothetical value of 100% using a one-sample *t*-test, but a comparison between the different lysozyme conditions using analysis of variance and post hoc tests did not reveal significant differences. In 10 wild strains, different patterns of biofilm formation on polystyrene were observed in the presence of lysozyme. Some strains, characterized by large amounts of biofilm formation in the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, were poor biofilm producers at low concentrations of lysozyme. In contrast, some strains that were poor biofilm producers with a high lysozyme concentration were more inhibited by low concentrations of lysozyme. The present study emphasizes the need to develop strategies for biofilm control based on *in vitro* experiments, and to implement these in clinical trials prior to approval of hygiene products enriched with exocrine proteins, such as lysozyme. Further studies will extend these investigations to other *Candida* species, and to fungi and bacteria present in oral biofilms.

Introduction

Candida albicans (*C. albicans*), a commensal yeast in the oral cavity, can incorporate into biofilms that form on denture surfaces (1,2), leading in some cases to mucosal infections referred to as denture stomatitis (3-5).

Lysozyme, an antimicrobial protein present in exocrine secretions (6) and in phagocytes (7), contributes along with other innate non-immune factors in saliva to the control of the oral microflora, thereby preserving health of the mucosa and the dental surfaces (3,8,9). The antimicrobial action of lysozyme is mediated through its muramidase activity (10) which catalyzes the hydrolysis of N-acetyl-muramic/N-acetyl-glucosamine bonds in peptidoglycans composing the cell wall in Gram-positive bacteria (11). Lysozyme in the oral cavity comes from the salivary glands, particularly the submandibular and sublingual glands (12,13), and from neutrophils arriving in the oral environment through gingival fluid in the healthy mouth (14) or crevicular fluid in periodontitis (15,16). Physiological lysozyme concentrations in saliva range from 1 to 57 $\mu\text{g/ml}$ (17).

Previous studies have investigated the effect of lysozyme on *C. albicans* blastoconidia (3,18), but the mechanisms of action remain unclear. The three modes of action of lysozyme on *C. albicans* are its muramidase-like activity (19,20), its cationic nature capable of destabilizing the cell membrane (21), and its agglutination property (22). Although no peptidoglycan substrate for muramidase activity exists in *C. albicans*, lysozyme-induced wall-like material deposits between its chitin wall and its cell membrane have been observed by electron microscopy (19). Synergistic action of lysozyme with other salivary proteins has been suggested by several authors as a mechanism of action towards *C. albicans*, and some oral care products already combine lysozyme with lactoferrin and lactoperoxidase (23-25). Indeed, *in vitro* investigations have shown that *C. albicans* susceptibility to lysozyme increases when combined with peroxidase (26,27) but not with lactoferrin (28), while hyaluronic acid inhibits the lysozyme effect on *C. albicans* (27,29). Lysozyme also enhances the activity of antimycotic drugs such as polyenes and azoles (30-33).

A lower excretion of antimicrobial proteins in saliva has been demonstrated to promote *C. albicans* growth in the oral cavity (34). The *in vitro* effect of lysozyme on *C. albicans* biofilms remains controversial: certain studies demonstrated no beneficial effect of artificial saliva-containing lysozyme and

Correspondence to: Dr Philippe Courtois, Laboratory of Physiology and Pharmacology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium
E-mail: philippe.courtois@ulb.ac.be

Key words: *C. albicans*, biofilm, dentures, lysozyme, yeast

other salivary proteins on yeast adhesion to acrylic resin (35), while others demonstrated a preventive role for lysozyme with respect to *C. albicans* biofilm formation on dentures (33). To the best of our knowledge, no studies have explored the link between *C. albicans* biofilm formation and lysozyme agglutination properties, previously described at 1 mg/ml concentration (22). The aim of the present *in vitro* study was to investigate whether lysozyme modulates *C. albicans* biofilm production when present in physiological concentrations, by triggering distinct mechanisms, namely inhibition and aggregation.

Materials and methods

Microorganisms. Yeasts were grown aerobically at 37°C on Sabouraud agar with 0.4 g/l chloramphenicol and 0.04 g/l gentamycin (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA). All *in vitro* investigations were conducted on a third subculture of *C. albicans* ATCC 10231 (Oxoid; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) suspended in Sabouraud broth (cat. no. CM147; Oxoid™; Thermo Fisher Scientific, Inc.) or in distilled water. The suspension was adjusted to 1-20x10⁶ blastoconidia per ml by dilution, following a blastoconidia count using a Thoma cell counting chamber (Marienfeld™, Lauda-Königshofen, Germany). Wild strains were isolated by swabbing from dentures and identified on the basis of their colony aspect on CHROMagar™ medium (BD Diagnostics), by chlamydoconidia formation on BT™ Rice Extract agar (BD Diagnostics) and by the API yeast identification system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Lysozyme. Lysozyme from chicken egg white was purchased from Sigma-Aldrich; Merck Millipore (Darmstadt, Germany) with a molecular mass of 14,307 kDa and an isoelectric point of 11.35. Final concentrations in reaction media ranged from 3-1,000 µg/ml (0.2-70 µM).

Biofilm production. Yeast biofilms were prepared in polystyrene flat bottom 96-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) by seeding 2x10⁶ yeast cells per well and incubating at 37°C for 24 h in liquid Sabouraud medium with increasing concentrations of lysozyme (3-1,000 µg/ml in 250 µl total volume per well). Yeast growth was evaluated by spectrophotometry at 600 nm on a Packard SpectraCount microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and the attached biomass was quantified by crystal violet staining following washing in 0.9% NaCl and fixation in 100% methanol. For a set of 4 experiments, 125 µl from each well was transferred directly after incubation into a new 96-well plate, washed in 0.9% NaCl and evaluated by spectrophotometry at 600 nm. Data were compared with untreated control. Negative controls, namely wells without any yeast seeded, attested to the absence of accidental cross-well contamination during handling. Controls with 25 µg/ml amphotericin B (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Inc.) assessed the efficiency of a reference antifungal drug.

Crystal violet staining. Biofilm biomass was evaluated by crystal violet staining [procedure adapted from (36)]. Following aspiration of the well contents and three washes

with sterile 0.9% NaCl (250 µl per well), the attached biomass was fixed with 250 µl 100% methanol (Sigma-Aldrich; Merck Millipore) for 15 min. Biofilms were then stained by the addition of 2% Hucker crystal violet solution for 5 min and rinsed under running tap water and dried. Crystal violet dye in the biofilm was solubilized in 2 M acetic acid (250 µl per well) for 30 min. The absorbance of each well was measured at 600 nm on a Packard SpectraCount microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Absorbance readings >2 were determined by diluting samples 10-fold in 2 M acetic acid, then measuring the absorbance and multiplying by 10.

***C. albicans* adhesion onto resin pieces.** Acrylic resin (Palapress, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) pieces (2.56x18.30±0.10x4.60±0.10 mm) were produced by a conventional muffle formatting method similar to that used for removable denture manufacturing; one side was polished (smooth surface) and the other was not (rough surface). Acrylic pieces were stored at 4°C in 0.1% (w/v) sodium azide. For biofilm production, each resin piece was transferred to a Falcon polypropylene 15 ml conical bottom tube (BD Biosciences), washed three times with 4 ml sterile distilled water for 5 min at room temperature with gentle stirring at 3 rpm (SB3 Stuart Rotator Holder, Bibby Scientific, Stone, Staffordshire, UK), rinsed in Sabouraud liquid medium for 5 min, and finally immersed in 4 ml fresh Sabouraud medium containing a *C. albicans* ATCC 10231 suspension (10⁵ blastoconidia per ml) and lysozyme (10 or 1,000 µg/ml). Controls were performed without lysozyme. Following incubation for 4 h at 37°C with continuous rotary agitation at 3 rpm to prevent cells from sedimentation, the liquid phase was aspirated and each resin piece was transferred into a new clean Falcon tube by sliding. Resin pieces were then washed three times in sterile 0.9% NaCl. Swabs from each surface (rough or smooth) were serially seeded onto four different Petri dishes containing Sabouraud solid medium with 0.4 g/l chloramphenicol and 0.04 g/l gentamycin, in order to recover the adherent yeast cells. All plates processed from resin pieces were incubated for 48 h at 37°C before a colony forming unit (CFU) count was performed.

Fluorescence staining assay. Fresh solutions of fluorescein diacetate (FDA; 5 mg/ml in acetone) and ethidium bromide (EB; 5 mg/ml in PBS) were separately diluted 100-fold in PBS and then mixed at a 1:1 ratio. Fluorescent reagent and *C. albicans* biofilm suspended in PBS were mixed at a 1:1 ratio and incubated for 15 min at 37°C prior to microscopic examination (Leica DM2000; Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany). Green-fluorescence was considered as a marker of living cells and orange as dead cells. As a control, the assay was conducted with *C. albicans* ATCC 10231 blastoconidia before and after a 30 min incubation at 80°C, which resulted in 100% live and dead cells, respectively.

Statistical analysis. Data were analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test, one-sample t-test, unpaired Student's t-test, analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test, two-way ANOVA, the Mann-Whitney test, the Wilcoxon signed rank test, and the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post hoc test using GraphPad

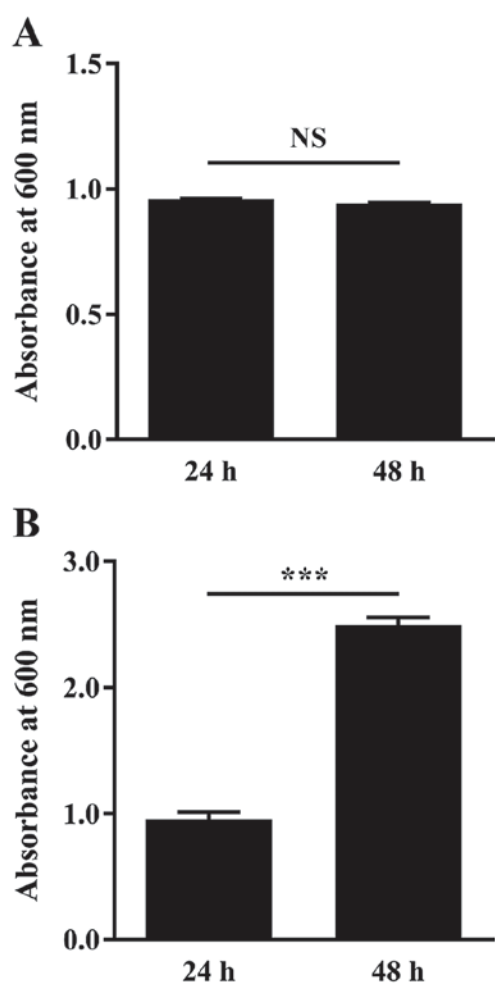


Figure 1. Effect of cultivation time (24 vs. 48 h at 37°C) on *Candida albicans* ATCC 10231 evaluated by (A) turbidimetry and (B) biofilm production (attached biomass) which was evaluated by crystal violet staining. Data are expressed as the mean \pm standard error (n=16 in one independent experiment). NS, not significant and ***P<0.001, with comparisons indicated by lines.

Prism version 7.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean, unless indicated otherwise. P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

C. albicans ATCC 10231 biofilm formation on polystyrene. In a preliminary experiment, *C. albicans* ATCC 10231 was cultured at 37°C for 24 and 48 h, then Sabouraud broth turbidity and attached biomass were measured by absorbance at 600 nm and crystal violet staining, respectively. Turbidity absorbance measurements were 0.958 ± 0.003 following incubation for 24 h and remained similar following 48 h incubation (0.941 ± 0.005 ; Fig. 1A). However, measurements of the attached biomass were significantly increased, by 2.6-fold, at 48 h compared with 24 h (P<0.0001; Fig. 1B).

The effect of various concentrations of lysozyme (0-1,000 $\mu\text{g/ml}$) on *C. albicans* ATCC 10231 growth in Sabouraud liquid medium was measured next (Fig. 2). Lysozyme concentrations $\geq 300 \mu\text{g/ml}$ significantly reduced

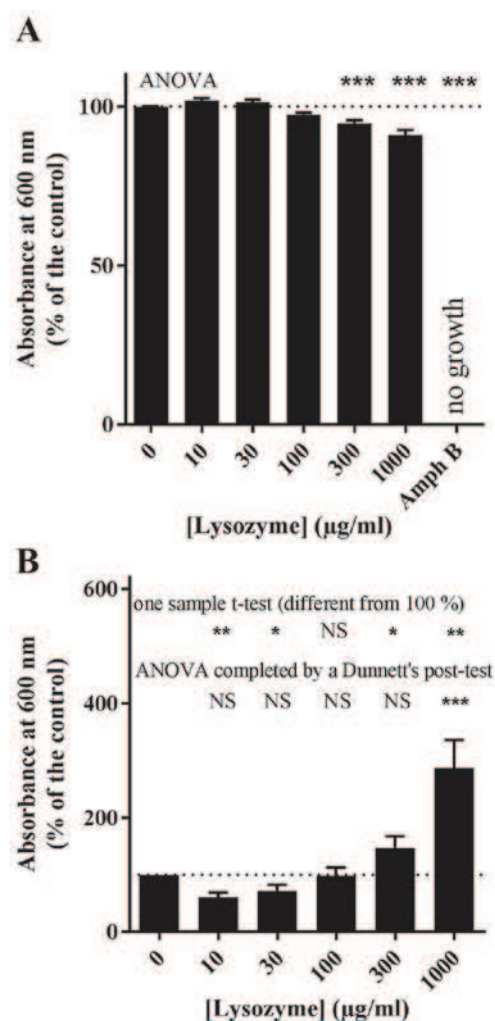


Figure 2. Effect of lysozyme on *Candida albicans* ATCC 10231 growth. Yeast cells were grown at 37°C for 24 h in the presence of 0, 10, 30, 100, 300 or 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme. Amph B treatment (25 $\mu\text{g/ml}$) was used as a negative growth control. (A) Growth was measured by turbidimetry. (B) *In vitro* biofilm formation was evaluated by crystal violet staining. Data are expressed as the mean \pm standard error (n=7-10 independent experiments, 8 technical replicates each). NS, not significant, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Dunnett's post-test compares each column with control without lysozyme. Amph B, amphotericin B.

C. albicans growth compared with the untreated control (P<0.0001); a reduction of 5.3 ± 0.9 and $9.0 \pm 1.6\%$ relative to the untreated control was measured at 300 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of lysozyme, respectively (Fig. 2A). Lysozyme concentrations <100 $\mu\text{g/ml}$ had no effect on *C. albicans* growth compared with the untreated control (Fig. 2A). Amphotericin B (25 $\mu\text{g/ml}$) completely prevented growth and, consequently, the formation of biofilms (Fig. 2A). Fig. 2B illustrates the effect of lysozyme treatment on *C. albicans* ATCC 10231 biofilm formation in 96-well plates. Lysozyme produced a significant biphasic effect on biofilm formation (Fig. 2B), despite its relatively limited effect on yeast growth (Fig. 2A). Lysozyme acted as a biofilm promotor at the highest concentration tested (1,000 $\mu\text{g/ml}$), but as a biofilm limiting factor at the lowest concentrations (10-30 $\mu\text{g/ml}$). At 1,000 $\mu\text{g/ml}$, the attached biomass averaged $286.8 \pm 49.0\%$ relative to the control, however, at 10 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, the attached biomass was $60.9 \pm 8.3\%$ relative to the control (Fig. 2B). An ANOVA analysis with Dunnett's multiple comparison test and a

Table I. Effect of lysozyme on *Candida albicans* ATCC 10231 attached biomass.

A, All reagents added at time zero							
Lysozyme ($\mu\text{g/ml}$)	0	3	10	30	100	300	1,000
% (mean \pm SEM)	100.0 \pm 2.5	81.1 \pm 4.1	98.4 \pm 4.1	124.6 \pm 10.3	482.4 \pm 25.4	923.6 \pm 33.8	958.2 \pm 21.1
N	16	8	8	8	8	8	8
P-value (vs. 0 $\mu\text{g/ml}$)	-	0.8786	0.9999	0.7064	<0.0001	<0.0001	<0.0001
B, Culture medium renewal and lysozyme addition after 2 h pre-incubation							
Lysozyme ($\mu\text{g/ml}$)	0	3	10	30	100	300	1,000
% (mean \pm SEM)	100.0 \pm 6.0	60.1 \pm 1.6	81.8 \pm 4.1	73.5 \pm 11.1	106.8 \pm 10.0	118.0 \pm 6.8	141.3 \pm 10.7
N	16	8	8	8	8	8	8
P-value (vs. 0 $\mu\text{g/ml}$)	-	0.0013	0.2950	0.0533	0.9643	0.3081	0.0008

Attached biomass of *C. albicans* ATCC 10231 was evaluated following a 48 h incubation at 37°C in 96-well plates with 0, 3, 10, 30, 100 or 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme. Evaluation was performed by two different experimental designs: (A) Lysozyme addition at time zero, and (B) culture medium renewal with the addition of lysozyme following a 2 h preincubation of *C. albicans* cells. Data are expressed as the mean % of the control (\pm standard error). Statistical analysis was performed by analysis of variance, followed by Dunnett's multiple comparisons post hoc test.

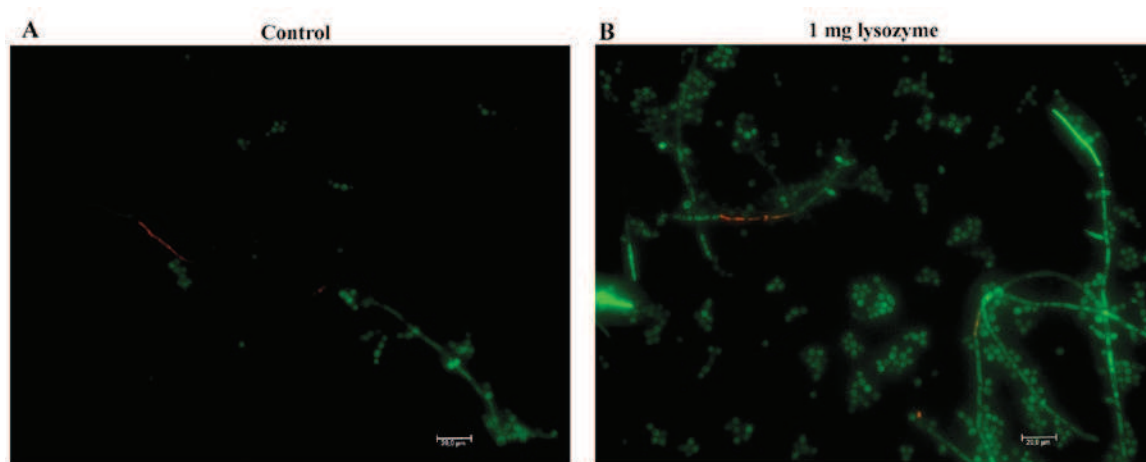


Figure 3. Fluorescence fluorescein diacetate/ethidium bromide staining of *Candida albicans* ATCC 10231 biofilms harvested from the bottom of wells following incubation (A) without lysozyme or (B) with 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme. Green indicates living cells and orange indicates dead cells.

one-sample *t*-test confirmed the biofilm promoting effect of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme ($P < 0.001$ and $P = 0.004$, respectively; Fig. 2B). The attached biomass in the presence of 10–30 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme was significantly different from the control by one-sample *t*-test ($P = 0.0059$ and $P = 0.0371$, respectively; Fig. 2B), but analysis by ANOVA did not reveal significant differences (Fig. 2B).

Fig. 3 illustrates the characteristics of *C. albicans* biofilms harvested from the bottom of the wells following incubation with 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme. Microscopic examination revealed that the majority (>95%) of *C. albicans* cells (blastoconidia with some hyphal structures) were live as in the control without lysozyme (Fig. 3). *C. albicans* ATCC 10231 attached biomass was evaluated by 2 different experimental designs following 48 h incubation at 37°C in 96-well plates: Direct addition of lysozyme at time zero (Table IA), as

previously performed for the 24 h observations displayed in Figs. 2 and 3; and culture medium renewal with the addition of lysozyme following a 2 h preincubation of *C. albicans* cells to allow time for adherence (Table IB). Independent of the incubation time (24 vs. 48 h), addition of lysozyme to planktonic cells resulted in an increase in attached biomass compared with the untreated control, with the increase being higher after 48 h (Table I). Treatment with 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme resulted in a 9.6-fold increase in attached biomass compared with control ($P < 0.0001$; Table IA). When biofilm production was examined following *C. albicans* pre-adherence, a less significant 1.4-fold increase in attached biomass was observed in the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme compared with control ($P = 0.0008$; Table IB), while lysozyme at physiological concentrations (<30 $\mu\text{g/ml}$) always reduced biomass (Table I).

Biofilm formation on polystyrene by *C. albicans* wild strains. The effect of lysozyme on 10 wild *C. albicans* strains isolated from different dentures was then examined by turbidimetric growth and biofilm evaluation. No significant effect of lysozyme (0-1,000 $\mu\text{g/ml}$) on the growth of wild strains in Sabouraud liquid medium was observed, apart from a slight but non-significant decrease at 1,000 $\mu\text{l/ml}$, which was the highest concentration tested (Fig. 4A). Amphotericin B (25 $\mu\text{g/ml}$) completely prevented the growth of yeast and biofilm formation (data not shown), similar to the results for the reference strain (Fig. 2A). The effect of lysozyme (0-1,000 $\mu\text{g/ml}$) on the ability of the wild strains to form biofilms on 96-well plates was subsequently assessed (Fig. 2B). The results demonstrated variable patterns of biofilm formation (Fig. 4B). Some strains demonstrated large quantities of biofilm production in the presence of a high lysozyme concentration (1,000 $\mu\text{g/ml}$) but poor biofilm production at low concentrations (Fig. 4B). Other strains that exhibited poor biofilm production with a high lysozyme concentration were further inhibited by weak concentrations (3-30 $\mu\text{g/ml}$; Fig. 4B). Only one wild strain out of ten was inhibited by lysozyme in a dose-dependent manner (Fig. 4B). Overall, in the 10 clinical strains isolated from dentures, the attached biomass following incubation with 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme ranged from 36.1 to 3825.0% compared with untreated controls (mean, 548.4%; median, 191.4%; non-Gaussian distribution; Fig. 4B). However, at 3 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, the attached biomass ranged from 26.3 to 114.8% compared with untreated controls (mean, 73.8%; median, 73.8%; Gaussian distribution; Fig. 4B). Thus, the inhibitory effect of lysozyme was observed when this was added in concentrations consistent with its physiological range. The non-physiological concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ significantly enhanced biofilm production in six strains out of 10 compared with control (Fig. 4B).

The difference in the attached biomass between the two tested lysozyme concentrations (10 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$) was significant for both the reference (Fig. 2B) and the clinical (Fig. 4B) strains (Mann Whitney test, $P < 0.0001$ and $P = 0.0185$, respectively). The increase in the amount of biofilm in the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme was not significant in clinical strains (Mann Whitney test, $P = 0.1425$) but was significant in the reference strain (Mann Whitney test, $P = 0.0013$) when compared with control without lysozyme. In contrast, the decrease in attached yeast in the presence of 3 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme compared with untreated controls was significant in 8 out of 10 clinical strains (Mann Whitney test, $P = 0.0230$). Again, the inhibitory effect of lysozyme was observed in concentrations lower than 30 $\mu\text{g/ml}$, which is considered as the physiological concentration in saliva, while non-physiological concentrations above 100 $\mu\text{g/ml}$ enhanced biofilm production in 6 strains out of 10.

Lysozyme effect on *C. albicans* biofilm cohesion. Biofilm cohesion was examined by turbidity variation in wells where *C. albicans* ATCC 10231 cells were cultured for 24 h at 37°C and subsequently washed three times with sterile 0.9% NaCl (Fig. 5). As a control, wells were inoculated with cultures in Sabouraud broth and immediately processed without incubation. In the absence of incubation (and thus without biofilm

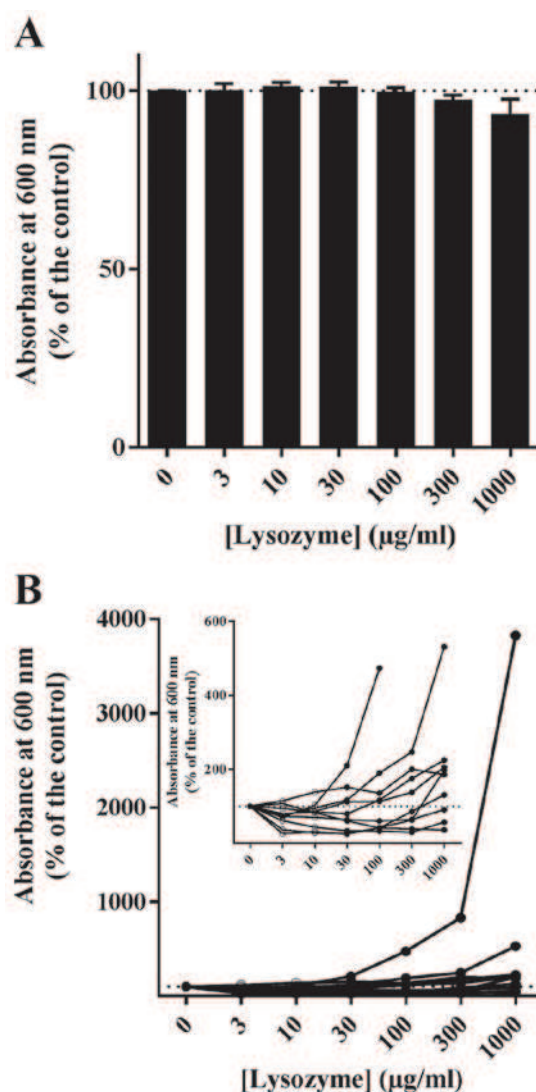


Figure 4. Effect of lysozyme on growth of wild *Candida albicans* strains. Ten wild *C. albicans* strains were grown for 24 h at 37°C with 0, 10, 30, 100, 300 or 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme ($n=8$ for each condition). (A) Growth was measured by turbidimetry, with results plotted as the mean value for all ten wild strains examined \pm standard error. (B) *In vitro* biofilm formation was measured by crystal violet staining. Results are plotted separately for each strain examined.

formation), the turbidity underwent a gradual decrease to a residual turbidity of $1.7 \pm 0.7\%$ relative to the initial supernatant (Fig. 5A). The turbidity of the incubated samples was $627.4 \pm 144.4\%$ relative to the control after the first washing; turbidity after the second and third washes was 316.3 ± 59.7 and $230.4 \pm 23.6\%$ of that of the culture medium, respectively (Fig. 5A). The effect of lysozyme on cell detachment during the washing process was further examined (Fig. 5B). In the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, the progress of the washing liquid turbidity was similar to the control without lysozyme (Fig. 5B). However, in the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, the turbidity following washes was not much greater than the supernatant (Fig. 5B). A two-way ANOVA analysis showed that the washing steps and the lysozyme concentration significantly affected the turbidity of the liquid ($P < 0.0001$; Fig. 5B). However, the washing steps did not have the same effect at the two concentrations of lysozyme (10 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$,

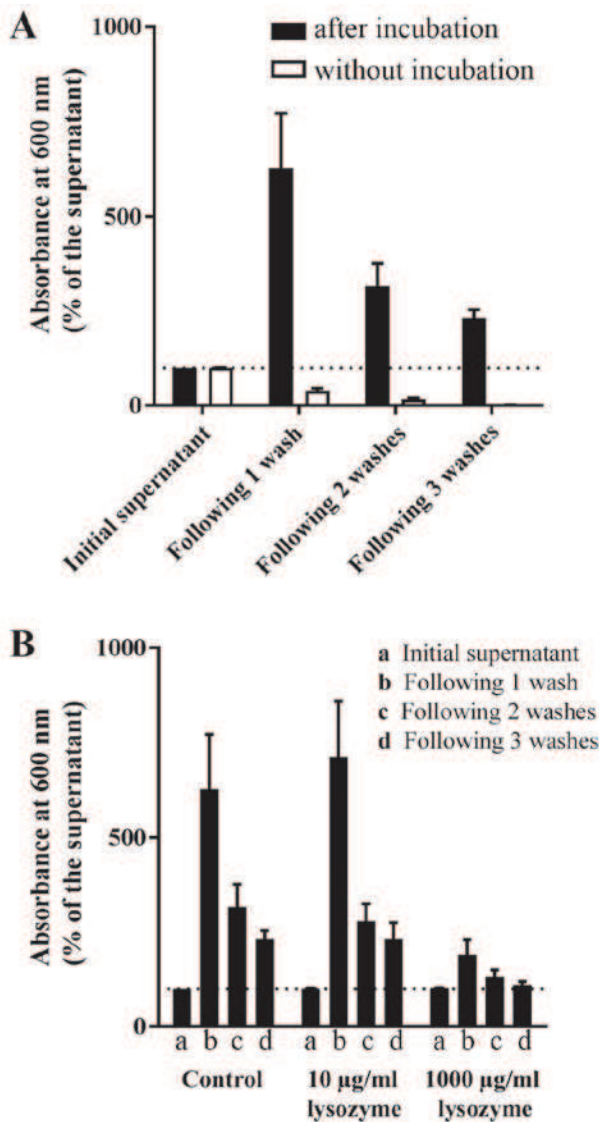


Figure 5. Effect of lysozyme on *Candida albicans* ATCC 10231 biofilm cohesion. (A) *C. albicans* ATCC 10231 cells were cultivated for 24 h at 37°C and subsequently washed three times with sterile 0.9% NaCl. Absorbance at 600 nm was measured at each step of the washing process. Black columns represent yeast suspensions following 24 h cultivation at 37°C; white columns represent the control, where wells were measured from fresh suspension in liquid Sabouraud following no incubation. (B) Absorbance at 600 nm after each wash was measured in yeast cultured in 0, 10 or 1,000 µg/ml of lysozyme (n=4 independent experiments). Data are expressed as the mean ± standard error of the percentage relative to the absorbance of the initial supernatant (n=4 independent experiments, 8 technical replicates per condition).

respectively) as shown by the two-way ANOVA analysis for interaction between factors (P=0.0101; Fig. 5B).

C. albicans adhesion on resin. The effect of 10 and 1,000 µg/ml lysozyme on the ability of *C. albicans* to adhere to resin pieces (before and after surface polishing) was examined following 4 h of incubation at 37°C (Fig. 6). A Kolmogorov Smirnov test revealed that the data did not conform to a Gaussian distribution. Lysozyme at 1,000 µg/ml resulted in a mean increase of 10- (P=0.0469) and 15.7-fold (P=0.0781) relative to untreated controls for the rough side (median 312.3% of the control) and the smooth side (median 184.0% of the control) of the resin foil, respectively (Fig. 6). Lysozyme at 10 µg/ml did not lead

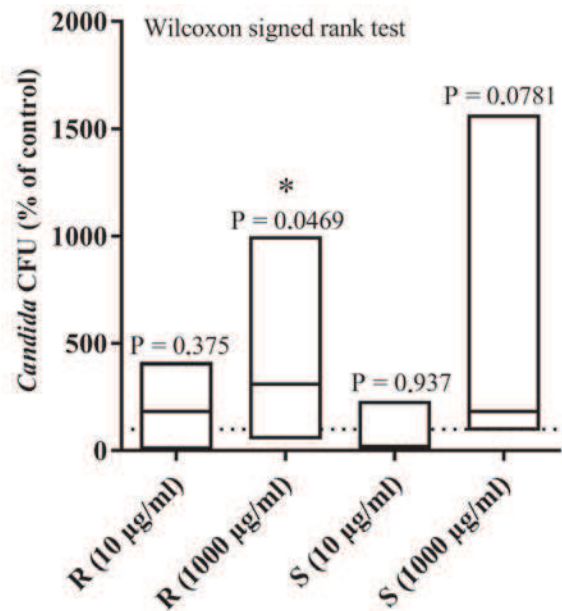


Figure 6. *Candida albicans* ATCC 10231 adhesion on resin. Yeast adhesion was measured by CFU counts following immersion of acrylic resin foils, with both a rough and smooth surface, in contaminated Sabouraud broth containing lysozyme (10 or 1,000 µg/ml) for 4 h at 37°C. Columns correspond to data range with median (n=7 independent experiments). *P<0.05 vs. control without lysozyme. CFU, colony forming units; R, rough surface; S, smooth surface.

to significant changes in the attached yeast cell count: 4.1-fold for the rough side (median 184.0% of the control) and 2.3-fold for the smooth side (median 19.8% of the control). Analysis of the results by the Wilcoxon signed rank test demonstrated that the high lysozyme concentration (1,000 µg/ml) resulted in significant changes in adherence to the rough resin (P=0.0469), while the effect on the smooth resin was close to significant (P=0.0781). Finally, in the absence of lysozyme, polishing negatively affected *C. albicans* adherence to the acrylic surface, as the CFU count on the smooth resin corresponded to 40.8±7.9% of that observed on the paired rough resin (P=0.0247).

Discussion

Previous investigations have demonstrated that the effect of lysozyme can differ from one bacterial species to another and even within the same bacterial species (37); susceptibility to lysozyme is also dependent on the monitored parameter (growth, viability, cell lysis). In the present study, investigations of *C. albicans* wild strains isolated from dentures revealed several, non-consistent patterns of susceptibility to lysozyme. To the best of our knowledge, no previous studies have focused on biofilm formation and its inhibition by lysozyme from exocrine secretions. In the present study, egg white lysozyme produced a biphasic effect on biofilm formation, while it slightly affected yeast growth tested by turbidimetry. In the *C. albicans* ATCC 10231 reference strain, lysozyme acted as a biofilm promotor at the highest concentration tested (1,000 µg/ml), but as a biofilm limiting factor at the lowest concentration (10 µg/ml). In the clinical strains isolated from contaminated dentures, a variety of responses

to lysozyme were observed, with no apparent uniform pattern. The inhibitory effect of lysozyme was observed at concentrations $<30 \mu\text{g/ml}$, which are physiological concentrations in saliva (17), while non-physiological doses $>100 \mu\text{g/ml}$ enhanced biofilm growth. The different results on polystyrene vs. resin are not necessarily attributable to the material itself, since a different method of attached biomass evaluation was used for each material (crystal violet staining vs. CFU counts following seeding, respectively). However, because of crystal violet adsorption on resin pieces in the absence of *C. albicans* cells (data not shown), a different method had to be employed. Although less sensitive than a colorimetric assay, CFU counts on Petri dishes presented the advantage of confirming the viability of attached biomass without additional manipulation.

Pro-biofilm effect of lysozyme on *C. albicans*. In the present study, a pro-biofilm property for lysozyme was suggested in different strains, on two different support materials (polystyrene, widely used in the laboratory, and acrylic resin, widely used in the fabrication of dentures), by two different experimental designs (*C. albicans* adhesion to the material surface and biofilm production), and by two different biofilm production assessments (crystal violet staining and CFU counts). Lysozyme capacity to increase attached biomass was observed at high but non-physiological concentrations. The FDA/EB staining assay revealed that the majority of cells attached in the presence of 1 mg/ml lysozyme were alive. The pro-biofilm property of lysozyme on *C. albicans* ATCC 10231 is more pronounced when added simultaneously with the *C. albicans* cells, suggesting a crucial role in the adherence phase of the biofilm formation. The pro-biofilm effect was also confirmed by the assessment of biofilm cohesion during three successive washes with saline. In the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, the turbidity of the washing media did not increase, which suggests low yeast cell loss by the biofilm. Previous studies have focused on the agglutination or flocculation power of lysozyme (at a cited concentration of 1 mg/ml) in non-ionic solutions upon air saprophytes (22), bacterial suspensions (38) or *C. albicans* yeasts (22). The presence of lysozyme in the *in vivo* acquired exogenous pellicle on teeth is well documented but no data concerning its effect on biofilm formation exist to date (39). The present study demonstrated an increase in *C. albicans* adherence in six out of ten wild *C. albicans* strains when higher concentrations of lysozyme were present, suggesting that the use of high concentrations on lysozyme in oral care products may be unfitting. Intra-species variability in lysozyme susceptibility has also previously been demonstrated in bacteria (37).

Anti-biofilm effect of lysozyme on *C. albicans*. In the present study, low concentrations of lysozyme ($<30 \mu\text{g/ml}$) resulted in a reduction in the attached biomass. At a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, biofilm reduction on polystyrene was observed in *C. albicans* ATCC 10231 and in 3 out of 10 clinical strains investigated. The anti-biofilm effect was not observed for the reference strain on either a rough ($P=0.375$) or smooth ($P=0.937$) resin support. However, a previous study has demonstrated that a similar concentration range of lysozyme (6-100 $\mu\text{g/ml}$) significantly inhibited *C. albicans* biofilm formation on an acrylic resin surface (33). In contrast, a

separate study demonstrated no significant reduction in *C. albicans* attachment on acrylic resin disks immersed in a solution containing lysozyme, lactoferrin and glucose oxidase complex/lactoperoxidase (35). These conflicting observations are consistent with the present study, where the susceptibility of *C. albicans* wild strains to lysozyme differed from one another.

Inhibitory effect of lysozyme upon C. albicans growth.

The present study demonstrated a significant effect of egg white lysozyme on yeast growth at lysozyme concentrations $>300 \mu\text{g/ml}$ for the reference strain, but not for the wild strains. The growth reduction effect on *C. albicans* ATCC 10231 in Sabouraud liquid medium upon exposure to 1,000 and 300 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme was 9.0 ± 1.6 and $5.3\pm 0.9\%$, respectively, compared with control. In the clinical isolates, a similar mild reduction was observed but was not statistically significant. It is possible that this small effect may be due to the incorporation of planktonic cells into the attached biomass on the lateral sides of the microplate wells, thus escaping the photometric evaluation. The effect on the turbidimetric measurement can then be explained by the pro-biofilm property of the lysozyme. Previously, *C. albicans* cells have been observed to be lysed by lysozyme (in a concentration range from 40 to 5,000 $\mu\text{g/ml}$) independently of the amount of glucose present, but this effect was prevented by the addition of NaCl to the culture medium (40).

The present study demonstrated differing effects of lysozyme upon *in vitro C. albicans* biofilm formation dependent on its concentration: anti-biofilm at physiological concentrations and pro-biofilm with concentrations $>300 \mu\text{g/ml}$. The present study thus indicates that the concentration of active compounds should be stated in oral care products. In addition, the present study illustrates the challenges of comprehensively understanding the complex relationships between oral microflora and salivary antimicrobial systems. As well as careful and detailed reporting, new tools should be developed to study the relationship between the microbiome and its exocrine environment, taking into account the diversity of antimicrobial factors and the concentration of each. The present study emphasizes the necessity of developing strategies for biofilm control based on *in vitro* experiments, and to implement them in clinical trials prior to the incorporation of exocrine proteins, such as lysozyme, into hygiene products. Further studies should extend these investigations to other *Candida* species, and to fungi and bacteria present in oral biofilms, using a more global approach.

Acknowledgements

The present study was supported by a grant (grant no. BRIC-12/143) from the *Xenophilia* Funds (Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium). The authors thank P. Keyzer for manufacturing the acrylic pieces and Professor M. Stas for her review of the manuscript.

References

1. Radford DR, Challacombe SJ and Walter JD: Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 99-116, 1999.

2. Courtois Ph: *Candida* biofilms on oral biomaterials. In: Biomaterials-Physics and chemistry. Pignatello R (ed.) Intech, Rijeka, pp475-490, 2011.
3. Epstein JB, Truelove EL and Izutzu KT: Oral candidiasis: Pathogenesis and host defense. *Rev Infect Dis* 6: 96-106, 1984.
4. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW and Knox KW: *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* 43: 45-50, 1998.
5. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL and Redding SW: Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 53-59, 2004.
6. Fleming A: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 93: 306-317, 1922.
7. Gordon S, Todd J and Cohn ZA: In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 139: 1228-1248, 1974.
8. Vukosavljevic D, Custodio W and Siqueira WL: Salivary proteins as predictors and controls for oral health. *J Cell Commun Signal* 5: 271-275, 2011.
9. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P and Fábíán G: Salivary defense proteins: Their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci* 13: 4295-4320, 2012.
10. Phillips DC: The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci Am* 215: 78-90, 1966.
11. Masschalck B and Michiels CW: Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 29: 191-214, 2003.
12. MacKay BJ, Goodman H, Cox D, Grossbard BL, Iacono VJ and Pollock JJ: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of lysozyme in human parotid and submandibular-sublingual salivas. *J Clin Microbiol* 19: 844-848, 1984.
13. Noble RE: Salivary alpha-amylase and lysozyme levels: A non-invasive technique for measuring parotid vs submandibular/sublingual gland activity. *J Oral Sci* 42: 83-86, 2000.
14. Brandtzaeg P and Mann WV Jr: A comparative study of the lysozyme activity of human gingival pocket fluid, serum and saliva. *Acta Odontol Scand* 22: 441-455, 1964.
15. Eisenberg RJ, Bowers GM and Bergquist JJ: Lysozyme activity in gingival crevicular fluid. *J Baltimore Coll Dent Surg* 32: 83-85, 1977.
16. Sakalauskiene J, Surna A, Ivanauskiene E, Zekonis G and Gleiznys A: Secretory function of neutrophilic leucocytes of the patients with periodontal diseases. *Stomatologija* 7: 90-94, 2005.
17. Stuchell RN and Mandel ID: A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J Dent Res* 62: 552-554, 1983.
18. Woods CM, Hooper DN, Ooi EH, Tan LW and Carney AS: Human lysozyme has fungicidal activity against nasal fungi. *Am J Rhinol Allergy* 25: 236-240, 2011.
19. Marquis G, Montplaisir S, Garzon S, Strykowski H and Auger P: Fungitoxicity of muramidase. Ultrastructural damage to *Candida albicans*. *Lab Invest* 46: 627-636, 1982.
20. Marquis G, Garzon S, Strykowski H and Auger P: Cell walls of normal and lysozyme-damaged blastoconidia of *Candida albicans*: Localization of surface factor 4 antigen and vicinal-glycol staining. *Infect Immun* 59: 1312-1318, 1991.
21. Edgerton M and Koshlukova SE: Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res* 14: 16-21, 2000.
22. Kamaya T: Flocculation phenomenon of *Candida albicans* by lysozyme. *Mycopathol Mycol Appl* 37: 320-330, 1969.
23. Tenovuo J: Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Dis* 8: 23-29, 2002.
24. Gil-Montoya JA, Guardia-López I and González-Moles MA: Evaluation of the clinical efficacy of a mouthwash and oral gel containing the antimicrobial proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in elderly patients with dry mouth: A pilot study. *Gerodontology* 25: 3-9, 2008.
25. Güneri P, Alpöz E, Epstein JB, Çankaya H and Ates M: In vitro antimicrobial effects of commercially available mouth-wetting agents. *Spec Care Dentist* 31: 123-128, 2011.
26. Lee JY, Kim YY, Chang JY, Park MS and Kho HS: The effects of peroxidase on the enzymatic and candidacidal activities of lysozyme. *Arch Oral Biol* 55: 607-612, 2010.
27. Cho MA, Kim YY, Chang JY and Kho HS: Interactions between hyaluronic acid, lysozyme, and the glucose oxidase-mediated lactoperoxidase system in enzymatic and candidacidal activities. *Arch Oral Biol* 58: 1349-1356, 2013.
28. Samaranyake YH, Samaranyake LP, Wu PC and So M: The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS* 105: 875-883, 1997.
29. Kang JH, Kim YY, Chang JY and Kho HS: Influences of hyaluronic acid on the anticandidal activities of lysozyme and the peroxidase system. *Oral Dis* 17: 577-583, 2011.
30. Collins MS and Pappagianis D: Lysozyme-enhanced killing of *Candida albicans* and *Coccidioides immitis* by amphotericin B. *Sabouraudia* 12: 329-340, 1974.
31. Nishiyama Y, Nakaoka C, Hiratani T, Abe S, Uchida K and Yamaguchi H: Synergy of lysozyme and itraconazole on the morphology of *Candida albicans*. *J Electron Microsc (Tokyo)* 50: 41-49, 2001.
32. Anil S and Samaranyake LP: Impact of lysozyme and lactoferrin on oral *Candida* isolates exposed to polyene antimycotics and fluconazole. *Oral Dis* 8: 199-206, 2002.
33. Samaranyake YH, Cheung BP, Parahitiyawa N, Seneviratne CJ, Yau JY, Yeung KW and Samaranyake LP: Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 54: 115-126, 2009.
34. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E and Ozaki T: Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 32: 586-594, 2003.
35. Silva MP, Chibebe Junior J, Jorjão AL, Machado AK, Oliveira LD, Junqueira JC and Jorge AO: Influence of artificial saliva in biofilm formation of *Candida albicans* in vitro. *Braz Oral Res* 26: 24-28, 2012.
36. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B and Svabic-Vlahovic M: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40: 175-179, 2000.
37. Iacono VJ, MacKay BJ, DiRienzo S and Pollock JJ: Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. *Infect Immun* 29: 623-632, 1980.
38. Salton MR: Cell structure and the enzymic lysis of bacteria. *J Gen Microbiol* 9: 512-523, 1953.
39. Edgerton M and Levine MJ: Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent* 68: 683-691, 1992.
40. Kamaya T: Lytic action of lysozyme on *Candida albicans*. *Mycopathol Mycol Appl* 42: 197-207, 1970.