



HAL
open science

Neoscytalidium dimidiatum et huiles essentielles : vers une nouvelle piste thérapeutique ?

Anaëlle Cuntzmann

► **To cite this version:**

Anaëlle Cuntzmann. Neoscytalidium dimidiatum et huiles essentielles : vers une nouvelle piste thérapeutique ?. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931828

HAL Id: hal-01931828

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931828>

Submitted on 23 Nov 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2017

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE

du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 22 décembre 2017

Par **Anaëlle Cuntzmann**

née le 21 juillet 1990

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR en
PHARMACIE**

***Neoscytalidium dimidiatum* et huiles essentielles :
Vers une nouvelle piste thérapeutique ?**

Membres du Jury

Président :	Pr. Christophe GANTZER	Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
Juges :	Pr. Marie MACHOUART	Faculté de Médecine, Université de Lorraine
		Directrice de thèse
	Pr. Jean-Luc SCHMUTZ	Faculté de Médecine, Université de Lorraine
	Dr. Florence MENIGOT	Pharmacien d'Officine, Villers-les-Nancy

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2017-2018**

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsables de la filière Officine

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAFOULET

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsables de la filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Responsable Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Raphaël DUVAL

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Responsable de la Communication

Marie-Paule SAUDER

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

François DUPUIS

Responsable ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Alain NICOLAS

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POUCHON

Anne ROVEL

Gabriel TROCKLE

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Hématologie, Biologie cellulaire</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Loïc REPPPEL [☞]	82	<i>Biothérapie</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Reine EL OMAR [☞]	86	<i>Physiologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

⇒ En attente de nomination

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Christophe GANTZER, Président du jury,
PU, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (UMR 7564),
Faculté de Pharmacie de Nancy, Université de Lorraine :

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance.

À Madame le Professeur Marie MACHOUART, Directrice de thèse,
PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine - Service de Parasitologie-
Mycologie, CHRU de Nancy :

Un énorme merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour ton aide précieuse et tes conseils, ta disponibilité, ta patience et ta gentillesse, je n'aurais pas espéré trouver meilleure directrice de thèse que toi.

À Monsieur le Professeur Jean-Luc SCHMUTZ,
PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine - Service de Dermatologie,
CHRU de Nancy :

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer au jury de soutenance. Je vous exprime ici mon plus profond respect.

À Madame le Docteur Florence MENIGOT,
Docteur en pharmacie, Faculté de Pharmacie de Nancy, Université de Lorraine :

Mes remerciements les plus sincères pour votre participation à mon jury de soutenance et par ce biais pour votre soutien dans mon travail.

À mes parents, qui m'ont toujours soutenue et poussée à donner le meilleur de moi-même.
J'en suis arrivée là aujourd'hui grâce à vous.

À mon frère, mon exemple, pour toutes les heures de maths et physiques que tu as passé à t'arracher les cheveux avec moi.

À ma sœur qui, malgré la distance, a toujours su être présente.

À Jihane. Merci aux pas de danse qui nous ont mis sur le chemin l'un de l'autre. Merci de me soutenir depuis ce jour et d'être là pour moi. Je t'aime.

Ainsi qu'à **toute ma famille** pour leur amour et leur soutien.

À Claire, Momo et Fanny, à notre amitié sans égale et sans limites, pour avoir toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Les mots ne sont pas assez forts pour décrire l'importance que vous tenez dans ma vie.

À Alex, mon pilier. Je n'ai pas besoin de l'écrire, tu sais déjà l'importance de notre amitié à mes yeux et à quel point je te suis reconnaissante d'être là. Merci aussi pour toutes les rencontres et belles amitiées qui ont découlées de la notre : **Nico, Cec, Arnaud, Steph, Lumi, Doudouche, Renaud, Mat, Anne-so, Amin** et tous les autres. Et bien sur mention spéciale pour **Suz** avec qui ça a été comme une évidence, une amitié aussi vraie que rapide.

À Camo, avec toi, les mots n'ont jamais été nécessaires, un seul regard et on s'est toujours comprises. Il a suffi d'un portail bloqué et d'une valise pour lancer notre amitié. C'est un sacré vide de ne plus t'avoir dans les parages.

À Fan, notre rencontre devait être écrite quelque part. Merci pour ce voyage extraordinaire, pour ces 4 mois à sillonner les contrées asiatiques et bien sûr pour ton amitié (qui a franchi toutes les étapes en 4 mois).

À Flo, ma strasbourgeoise nancéenne préférée, pour tous les moments partagés, en lorraine ou en alsace, et bien d'autres à venir. Et à **Manon**, en souvenir de ce voyage New-Yorkais inoubliable.

A tous les autres internes que j'ai eu la chance de rencontrer à l'internat ou sur Nancy, vous avez rendu ces deux années inoubliables.

Plus particulièrement du côté des biologistes :

À **Bribs**, pour ton amitié sans failles et tous les moments partagés, à l'internat, au ski, sur Strasbourg. Toujours là quand on a besoin de toi. Et bien sûr à **Charlotte** qui me concurrence pour parler sans arrêt, mais on t'aime justement pour ça. (Bzzzzz)

À **Hélène**. L'internat sans toi, ça n'aurait pas été pareil. Tu sais que quoi qu'il arrive, je serai toujours là pour toi.

À **Lauriane** et **Mathilde**. Un simple stage a suffi pour construire une belle amitié, qui malgré la distance (et les vagues de chaleur), s'est chaque jour amplifiée.

À **Nico G**, mon « presque » voisin, toujours dispo pour un apéro ou un petit repas après le boulot histoire de refaire le monde.

À **Alain**, pour tes précieux conseils, aussi bien au travail, qu'en œnologie ou dans la vie de tous les jours. Et bien sûr, petite pensée à notre groupe avec **Nico M**. Ça a été un vrai plaisir de partager cette expérience avec vous.

À **Brice**, mon bras cassé préféré, une des personnes les plus intelligentes mais les moins raisonnables que je connaisse.

À **Charles**, fac, internat, les années passent... Moi qui pensais passer ma thèse avant toi, je crois que de nous tous tu auras presque tout fait en premier.

Sans oublier les belles rencontres strasbourgeoises, notamment **Phil** et **Nico** ainsi que **tous les autres biologistes ou futurs bio** que j'ai eu la chance de rencontrer, pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

Et bien sûr, **Merci à toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie** du CHRU de Nancy, pour avoir supporté les odeurs d'huiles essentielles pendant un certain nombre de mois.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

TABLE DES MATIERES

I. Introduction	18
A. Présentation du genre <i>Scytalidium</i> spp	18
1. Généralités	18
2. Taxonomie	19
3. Répartition mondiale.....	21
4. Clinique.....	21
5. Diagnostic	24
a) Examen direct.....	24
b) Culture et examen microscopique.....	25
(1) <i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	25
(2) <i>Scytalidium hyalinum</i>	25
6. Prise en charge thérapeutique	26
B. Antifongiques et <i>Scytalidium</i> spp. dans la littérature scientifique	27
C. Huiles essentielles	34
1. Généralités	34
a) Origine	34
b) Historique	35
c) Méthodes d'extraction.....	36
d) Composition	38
(1) Définition du chémotype	38
(2) Chémotypes principalement rencontrés dans les HE	38
(a) Les alcools.....	38
(b) Les aldéhydes.....	39
(c) Les oxydes terpéniques.....	39
(d) Les éthers.....	39
(e) Les terpènes.....	39
(f) Les cétones et les lactones.....	40
(g) Les esters	40
e) Effets indésirables et toxicité des huiles essentielles.....	40
f) Critères de qualité	41
D. Huiles essentielles et champignons dans la littérature scientifique.....	41
E. Objectifs du travail présenté.....	44
II. Matériels et méthodes.....	45
A. Souches étudiées.....	45
B. Choix des huiles essentielles	46
C. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des HE.....	49
1. Aromatogramme	49
a) Principe	49
b) Protocole détaillé.....	50
(1) Taille de l'inoculum fongique.....	50
(2) Disques et inoculum d'HE.....	51
2. Microdilution en plaque.....	52
a) Principe	52
b) Protocole détaillé.....	53
(1) Microdilution en plaques : adaptation aux huiles essentielles.....	53
(a) Tests de solubilisation.....	53
(b) Préparation des plaques	54
(c) Ensemencement des plaques	56

III. Résultats-interprétations	57
A. Aromatogrammes	57
1. Taille de l'inoculum fongique	57
2. Disques et volumes d'huiles essentielles	58
3. Profils des aromatogrammes obtenus	59
a) Essais préliminaires.....	59
b) Résultats des aromatogrammes obtenus pour toutes les huiles essentielles	62
c) Aromatogrammes des 4 HE sélectionnées sur nos souches de <i>N. dimidiatum</i>	66
B. Microdilution en plaques	70
a) Tests de solubilisation des HE dans le Tween-RPMI.....	70
b) Détermination des CMI pour l'HE de Sarriette et de Giroflier	71
IV. Discussion-conclusion générale	74

TABLE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Illustration de la conidiogénèse de <i>Scytalidium</i> spp. (d'après Moisissures, dermatophytes, levures, du prélèvement au diagnostic, Chabasse <i>et al.</i> 2008)	18
<u>Figure 2</u> : Arbre phylogénétique établi par Phillips <i>et al.</i> (2013)	20
<u>Figure 3</u> : Répartition géographique de <i>N. dimidiatum</i> et <i>S. hyalinum</i> (d'après Lacroix <i>et al.</i> , 2002)	21
<u>Figure 4</u> : Syndrome « deux pieds une main » A. Une hyperkératose plantaire bilatérale, B. Une hyperkératose palmaire unilatérale, C. Agrandissement d'une des plantes, D. Agrandissement de la paume droite (d'après Machouart <i>et al.</i> , 2013)	22
<u>Figure 5</u> : Caractéristiques des scytalidioses (ongles). A. Onychomycose sous-unguéale du gros orteil droit avec onycholyse évoluant en onychodystrophie. B. Onychomycose sous-unguéale et latérodistale avec hyperkératose sous-unguéale de l'ongle du gros orteil droit. C. Onychomycose dystrophique totale du troisième doigt droit. (d'après Machouart <i>et al.</i> , 2013)	23
<u>Figure 6</u> : Illustration d'un examen direct positif à filaments mycéliens septés dans des squames cutanées (objectif x 40)	24
<u>Figure 7</u> : Illustration de cultures de <i>N. dimidiatum</i> et <i>S. hyalinum</i> (A et B) et d'un examen microscopique de celles-ci (C et D) (d'après Machouart <i>et al.</i> , 2010)	26
<u>Figure 8</u> : Mortalité cumulée de souris neutropéniques infectées par <i>N. dimidiatum</i> souche FMR 9383 (A) et FMR 9354 (B) et traitées par 1,2 mg/kg d'amphotéricine B (AMB), 60 mg/kg de posaconazole (PSC) et 60 mg/kg de voriconazole (VRC). (Traitement débuté à J-1 post-infection et continué pendant 7 jours).....	31
<u>Figure 9</u> : Coupes histo-pathologiques des reins de souris neutropéniques infectées par <i>N. dimidiatum</i> . (1) groupe contrôle non traité : éléments fongiques associés à une réponse inflammatoire. (2) groupe traité par amphotéricine B ou par voriconazole : absence d'éléments fongiques et de réponse inflammatoire (3) groupe traité par voriconazole : quelques éléments fongiques sans réponse inflammatoire	32
<u>Figure 10</u> : Principe de la distillation par entrainement à la vapeur d'eau (d'après http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com , consulté le 06/05/17).....	37
<u>Figure 11</u> : Aromatogramme réalisé avec l'HE de Giroflier et <i>N. dimidiatum</i> . Les conditions de réalisation de ce test sont les suivantes : 100 µl d'inoculum fongique d'une suspension à 0,5 Mc Farland, utilisation d'un disque de 6 mm de diamètre imprégné de 10 µl d'HE pure. La boîte est incubée à 37°C, cette observation est faite à 48h de pousse	49
<u>Figure 12</u> : Schéma d'une plaque de microdilution utilisée pour déterminer la CMI d'un antifongique vis-à-vis de deux souches fongiques : la première cupule pour laquelle aucune	

croissance fongique n'est visible correspond à cette valeur : ici le puits 9 pour la souche 1 et 10 pour la souche 2. (ATF : antifongique).....52

Figure 13 : Schéma de la plaque utilisée pour évaluer une gamme de 10 dilutions d'HE sur une même plaque. Les souches sont testées en doublon. Les puits en vert sont les contrôles de stérilité (RPMI + Tween ou DMSO selon le protocole), les puits en rouge sont les témoins de pousse (RPMI + Tween ou DMSO + souche)54

Figure 14 : Schéma de la plaque utilisée pour évaluer une même concentration d'HE par plaque sur plusieurs souches. Les souches sont toujours testées en doublon. Les puits en vert sont les contrôles de stérilité (RPMI + Tween ou DMSO selon le protocole), les puits en rouge sont les puits ensemencés (RPMI + souche + Tween ou DMSO)55

Figure 15 : Aromatogrammes réalisés avec la souche *N. dimidiatum* CBS 125615 et observés après 48 et 72 heures de croissance à 37°C, pour un inoculum fongique de 100 µl et 200 µl quantifié à 0.5 Mac Farland. La croissance du champignon à 24h étant trop peu développée, elle ne permet pas de déterminer un halot.....57

Figure 16 : Aromatogrammes obtenus avec une culture de *N. dimidiatum* (souche CBS 125616) pour un disque de 9 mm, avec un inoculum fongique de 100 µL à 0,5 MacF et un volume de 10 µL d'HE de Géranium (à gauche) et de Tea tree (à droite).....58

Figure 17 : Aromatogrammes réalisés avec *N. dimidiatum* en utilisant des disques de 6 mm, un inoculum fongique de 100 µL à 0,5 Mac Farland et un volume de 10 µL d'HE d'Origan, de Cannelier de ceylan et de Giroflier respectivement59

Figure 18 : Aromatogrammes obtenus avec les HE de Tea tree, Thym, Géranium, Niaouli (A) et Litsée citronné (B) sur la souche *N. dimidiatum* CBS 125616 pour un inoculum d'HE de 10 µL et des disques de 6 mm à 48h (A) ou 72h (B) (aucune pousse n'est observée avec l'HE de litsée citronné à 48h).....60

Figure 19 : Aromatogrammes obtenus avec les HE de Thym, Géranium, Niaouli, Tea tree et Litsée citronné (inoculum 10 µL, disques 6 mm) sur une souche d'*Aspergillus fumigatus* (ref laboratoire : 21186669) pour une lecture à 48h (A) et 72h (B)61

Figure 20 : Aromatogrammes à J3 pour l'HE de Giroflier et Origan63

Figure 21 : Illustration des tests de solubilisation des HE (de gauche à droite Tea tree, Géranium, Litsée citronné, Niaouli et Cyprès) au Tween 20. Rapports 9-1 (A), 8-2 (B), 7-3 (C) et 6-4 (D).70

Figure 22 : Illustration de la croissance fongique en microplaques avec une pousse totale dans le puits de gauche et une absence de pousse dans celui de droite vu du dessus (A) et vu du dessous (B).....71

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Résultats des CMI obtenues <i>in vitro</i> avec l'amphotéricine B, l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole, la terbinafine et la caspofungine vis-à-vis des souches de <i>N. dimidiatum</i> et <i>S. hyalinum</i> (d'après Lacroix et Feuilhade de Chauvin, 2008).....	28
Tableau II : Evaluation de l'activité <i>in vitro</i> de plusieurs antifongiques vis-à-vis de souches de <i>N. dimidiatum</i> et <i>S. hyalinum</i>	29
Tableau III: Tableau répertoriant les valeurs de CMI50 de 7 antifongiques vis-à-vis de 6 souches de <i>Neoscytalidium</i> sp.....	29
Tableau IV : Liste des 20 HE testées dans notre étude, et précision des dénominations scientifiques, familles botaniques, parties distillées, situations géographiques, chémotypes majoritaires (>5%) et numéros de lots	47
Tableau V : Rapports entre les volumes de RPMI et de Tween 20 à utiliser pour solubiliser au mieux l'huile essentielle (D'après la publication d'Edris <i>et al.</i> , 2012).....	53
Tableau VI : Moyennes des diamètres obtenus à partir des aromatogrammes réalisés pour la souche <i>N. dimidiatum</i> (CBS 125618).....	63
Tableau VII : Moyennes des diamètres obtenus à partir des aromatogrammes pour <i>A. fumigatus</i> (souche de référence 21186669)	64
Tableau VIII : Diamètres d'inhibition obtenus sur 11 souches de <i>N. dimidiatum</i> avec l'HE de Sarriette	66
Tableau IX : Diamètres d'inhibition obtenus pour 11 souches de <i>N. dimidiatum</i> avec l'HE de Giroflier	67
Tableau X : Diamètres d'inhibition obtenus pour 14 souches de <i>N. dimidiatum</i> avec l'HE de Litsée citronné.....	67
Tableau XI : Diamètres d'inhibition obtenus pour 14 souches de <i>N. dimidiatum</i> avec l'HE d'Origan	68
Tableau XII : Numéro des puits correspondant à la CMI de l'HE testée (respectivement Sarriette ou Giroflier), c'est à dire le premier puits pour lequel aucune croissance fongique n'est visible et ce pour l'ensemble des souches de <i>N. dimiditaum</i> de notre collection.....	72

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Af :	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AMM :	Autorisation de mise sur le marché
ATF :	Antifongique
CLSI :	Clinical & Laboratory Standards Institute
HE :	Huiles essentielles
Nd :	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
PDQ® :	Physician Data Query
Sh :	<i>Scytalidium hyalinum</i>

L'onychomycose est une atteinte de l'ongle due à un champignon microscopique. Cette infection est favorisée par des facteurs comme l'humidité et la chaleur mais elle reste toutefois bénigne. Ce type d'infection est caractérisé par une prise en charge thérapeutique de plusieurs mois, indispensable pour éradiquer le champignon et nécessite une bonne compliance du patient. Actuellement, un panel de traitements, aussi bien topiques que systémiques, sont préconisés et listés dans les recommandations de la société française de dermatologie et sont disponibles en officine. Ceci inclut notamment des vernis à base d'antifongiques comme l'amorolfine, le ciclopirox ou le bifonazole ou des traitements oraux à base de terbinafine, par exemple.[1]

Ces dernières décennies sont le témoin d'une véritable frénésie autour de la notion de « bien-être », motivée par les effets délétères des comportements humains qui conduisent à la pollution et au stress, et à plus grande échelle aux conséquences néfastes sur notre qualité de vie. Pour la population, ceci représente une réelle motivation à changer les habitudes pour s'orienter vers des pratiques à visée thérapeutique dites alternatives ou parfois qualifiées de médecines douces. Ainsi, cet intérêt marqué pour les substances naturelles, plus respectueuses de la flore et de la faune, et parfois mieux tolérées par l'organisme, représente un véritable fait de société. Pour certains, ce sont de nouvelles habitudes de vie à adopter, pour d'autres, c'est avant tout un phénomène de mode. Et ceci ne touche pas uniquement le domaine médical. L'agriculture biologique s'impose chaque jour un peu plus du côté de l'alimentation et la cosmétique n'est pas non plus mise de côté. Les médecines douces ne sont pourtant pas une nouveauté et même si leur utilisation augmente de manière croissante et s'installe dans les mœurs, elles peinent encore à s'intégrer pleinement en médecine et à prouver, malgré l'augmentation du nombre d'études scientifiques, un réel potentiel thérapeutique. Cependant, il ne faut pas oublier que derrière l'utilisation de ces traitements peut se cacher bien des abus, dérives et dangers, en l'absence des compétences requises pour leur utilisation. L'accès très simple à l'information, notamment par internet, ne dispense pas de l'avis des professionnels de santé et le terme « médecines douces » ne signifie pas dénué d'action ou d'effets toxiques et indésirables.

Parmi ces nouvelles pratiques thérapeutiques, l'aromathérapie démontre petit à petit son efficacité dans bien des domaines comme par exemple en infectiologie [2] ou encore pour une utilisation anti-inflammatoire ou antalgique.[3] Le potentiel thérapeutique des huiles essentielles (HE) couvrirait ainsi un large panel de pathologies, allant du traitement d'une

simple verrue ou d'un rhume à l'association à des chimiothérapies. En effet, sur le site de l'institut national américain du cancer, il est possible de trouver un dossier : « Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board. Aromatherapy and Essential Oils (PDQ®) » traitant de ce sujet et régulièrement mis à jour à propos de l'avancée des recherches dans ce domaine. Il est cependant indispensable de rappeler, qu'à ce jour, les huiles essentielles ne doivent être utilisées qu'en complément et non en remplacement de la chimiothérapie, avec accord du médecin référent. Dans le cadre de notre travail, le domaine de la dermato-mycologie nous intéresse plus particulièrement. La littérature actuelle regorge de publications et chapitres d'ouvrages concernant les champignons et leurs traitements par des HE dont certains seront présentés dans la suite de ce travail. Il est également très simple de trouver dans les rayons de la plupart des officines des associations d'HE pour traiter les onychomycoses. Ainsi, l'huile essentielle de Tea tree est déjà largement connue pour ses vertus antifongiques.[4] La question d'une réelle efficacité de ces HE dans ce domaine, notamment d'un point de vue scientifique se pose donc.

Dans ce travail, une revue de la littérature met tout d'abord en lumière les travaux scientifiques les plus rigoureux et pertinents concernant l'efficacité thérapeutique des HE sur les champignons responsables d'onychomycoses. Nous avons ainsi constaté, qu'en termes d'évaluation *in vitro* de l'efficacité des HE sur les champignons, il n'existe aucune étude faisant référence. Nous nous sommes donc fixés comme objectif de mettre en place une méthode, la plus standardisée possible, pour évaluer l'efficacité de ces produits sur les champignons. Pour ce faire, le choix de notre modèle d'étude s'est porté sur une moisissure responsable d'onychomycoses, *Neoscytalidium dimidiatum*. En effet, ce champignon présente un profil de résistance aux traitements conventionnels des onychomycoses ce qui en fait un candidat intéressant pour le développement potentiel d'un nouveau traitement par les HE. D'autre part, de par ses caractéristiques culturelles, cette moisissure est d'exploitation assez aisée pour travailler à la mise en place de nouveaux protocoles, comparativement aux dermatophytes, dont les cultures sont plus lentes et exigeantes. Nous présenterons plus en détails ce champignon dans l'introduction de ce travail, en résumant les données bibliographiques les plus récentes le concernant. Nous aborderons ensuite les HE, selon une approche générale comprenant leurs caractéristiques globales. Après avoir présenté les objectifs détaillés de notre travail, nous décrirons alors la méthodologie pratique suivie. Enfin les résultats que nous avons obtenus seront discutés de manière à apporter une ouverture sur les perspectives futures à envisager suite à ce travail.

I. Introduction

A. Présentation du genre *Scytalidium* spp.

1. Généralités

Les champignons sont des organismes eucaryotes hétérotrophes qui possèdent un noyau bien individualisé entouré d'une membrane nucléaire. Ils se composent d'un appareil végétatif, le thalle ou mycélium, organisé en filaments mycéliens plus ou moins ramifiés et souvent cloisonnés. La reproduction peut être sexuée ou asexuée (majoritairement) et donne naissance à des spores. Ces micromycètes peuvent vivre de manière saprophyte (le champignon est indépendant des autres êtres vivants, il se nourrit de matières organiques en décomposition), commensale (le champignon vit en dépendance vis-à-vis d'un hôte mais à bénéfice non réciproque pour ce dernier), opportuniste (le champignon se développe sur des terrains immunodéprimés) ou comme pathogènes. Par exemple, les moisissures sont des champignons opportunistes, et donc pathogènes dans certaines conditions uniquement, tandis que les dermatophytes isolés de lésions sont toujours pathogènes.

Les champignons du genre *Scytalidium* spp. sont des moisissures ascomycètes. Par définition, un ascomycète possède un thalle levuriforme ou septé dont la reproduction sexuée est assurée de manière endogène par production d'ascospores contenues dans un asque. En parallèle, la conidiogénèse, ou reproduction asexuée, joue un rôle important dans l'identification du champignon. Ainsi, *Scytalidium* spp. présente une conidiogénèse de mode thallique arthritique et plus spécifiquement de type holoarthrique. La formation des conidies (ou spores) se déroule ainsi à partir d'éléments préexistants du thalle : celles-ci se forment à partir de la fragmentation progressive et rétrograde des filaments mycéliens et se différencient en éléments cubiques ou rectangulaires, les arthrospores.[5]

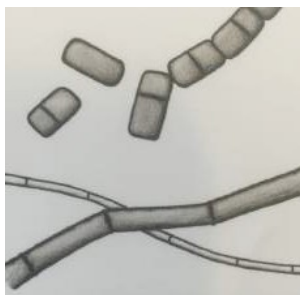


Figure 1 : Illustration de la conidiogénèse de *Scytalidium* spp. (d'après Moisissures, dermatophytes, levures, du prélèvement au diagnostic, Chabasse *et al.* 2008)

Parmi les champignons du genre *Scytalidium* spp., deux espèces présentent une affinité particulière pour la kératine dont ils se nourrissent et sont dites kératinophiles. Ces deux espèces, retrouvées chez l'Homme, sont *Scytalidium dimidiatum* (récemment renommé *Neoscytalidium dimidiatum*) et *Scytalidium hyalinum*. *S. dimidiatum*, comme la plupart des autres espèces de *Scytalidium*, est une espèce phytopathogène, isolée du sol, des arbres fruitiers comme les bananiers, les citronniers ou encore les figuiers. A l'inverse, *S. hyalinum*, n'a jamais été, jusqu'à présent, isolé de l'environnement ou de plantes malades.[6]

2. Taxonomie

La taxonomie du genre *Scytalidium* spp. ne cesse d'évoluer depuis leur découverte, avec plusieurs changements de noms, raison pour laquelle les connaissances sur ce groupe de champignons restent floues. *S. dimidiatum* est décrit initialement en Egypte en 1933 par Natrass sous l'appellation « *Hendersonula toruloidea* », considéré comme un agent de flétrissement des rameaux d'arbres fruitiers.[7] Campbell et Mulder décrivent en 1977, *S. hyalinum*, variant blanc de *S. dimidiatum* et responsable des mêmes lésions cliniques que ce dernier. [8] Sutton et Dyko ré-examinent les espèces appartenant au genre *Hendersonula*. *H. toruloidea* devient alors *Nattrassia mangiferae*, qui correspond à la reproduction asexuée de *S. dimidiatum*. Crous *et al.* affirment en 2006 le caractère polyphylétique de *S. dimidiatum* et le renomment *Neoscytalidium dimidiatum*, le rapprochant de la famille des Botryosphaeriaceae.[9] D'autre part, Madrid *et al.* rappellent en 2009, que dans le travail de Crous, il est proposé que *Nattrassia mangiferae* soit considéré au final comme une espèce différente de *N. dimidiatum* sans le stade anamorphe caractérisé par des arthroconidies.[10] Des études taxonomiques plus récentes suggèrent ensuite que *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* seraient conspécifiques, c'est à dire qu'ils appartiendraient à la même espèce. Madrid *et al.* suggèrent ainsi un nouveau nom pour *S. hyalinum* : *Neoscytalidium dimidiatum* var. *hyalinum*. Cette proposition est réactualisée par Phillips *et al.* en 2013 qui proposent de renommer ce champignon *Neoscytalidium hyalinum*. [11] A l'heure actuelle, c'est le terme de *Scytalidium hyalinum* et non *Neoscytalidium hyalinum* que l'on retrouve le plus souvent dans la littérature.

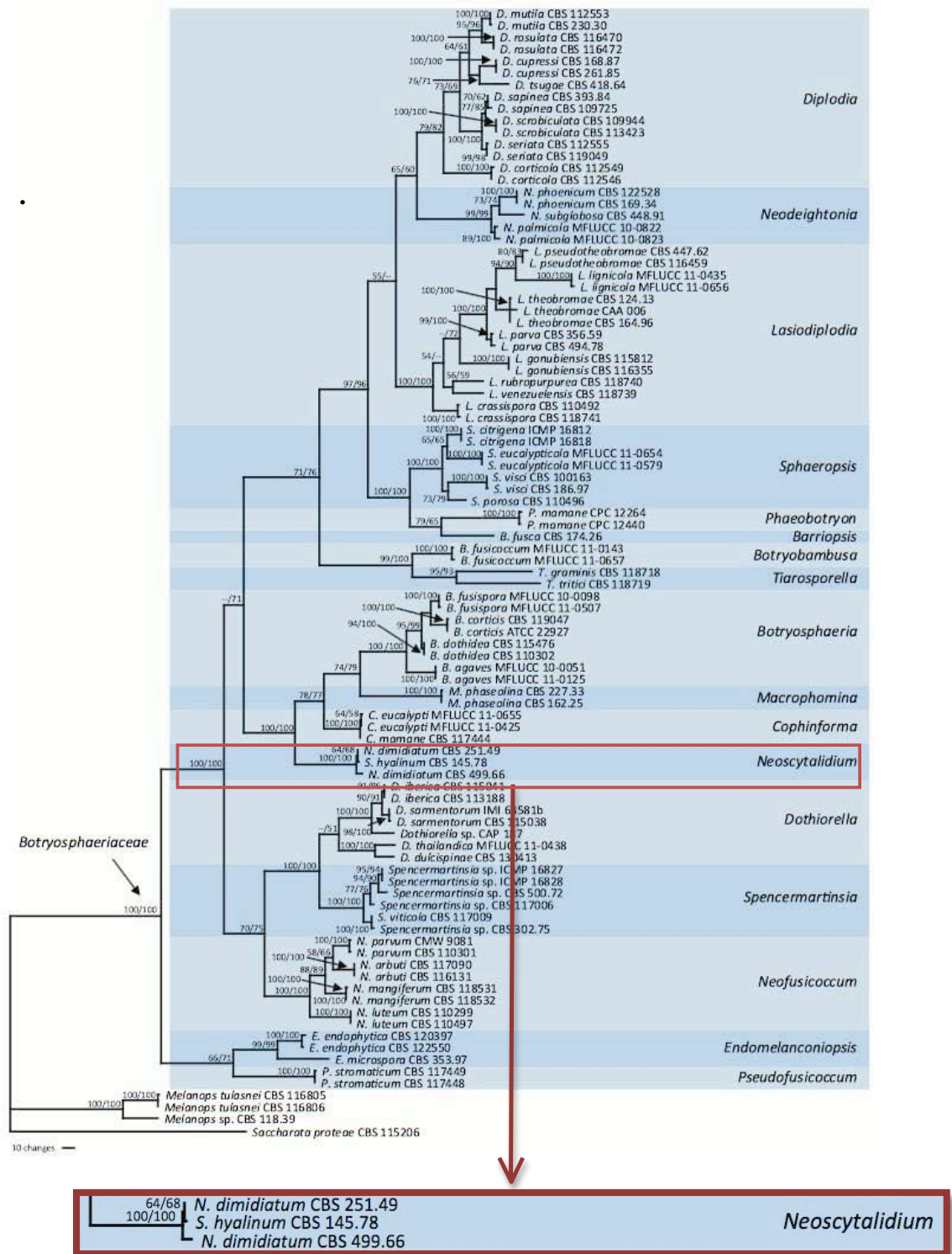


Figure 2 : Arbre phylogénétique établi par Phillips *et al.* (2013)

De nouvelles espèces sont aussi décrites comme *Neoscytalidium orchidacearum*, mis en évidence en Thaïlande sur une feuille d'orchidée morte, mais peu d'études existent encore sur ces dernières.[12]

3. Répartition mondiale

Ces champignons sont endémiques des zones tropicales et sub-tropicales (Afrique, Amérique du Sud, Antilles, Inde et Asie). Ce sont les agents majoritaires d'onychomycoses dans ces régions, ils représentent environ 40% des dermatomycoses. A l'inverse, dans les pays tempérés comme la France, l'espèce principalement retrouvée dans les mycoses des ongles est un dermatophyte, *Trichophyton rubrum*. Il existe une disparité dans la répartition géographique des deux espèces *N. dimidiatum* et *S. hyalinum*. *S. hyalinum* est davantage présent dans les Antilles, l'Amérique du Sud et l'Afrique de l'Est alors que *N. dimidiatum* se retrouve plutôt en Asie, aux alentours de l'océan indien et en Afrique Centrale.

L'immigration et les voyages sont la cause d'une augmentation de l'isolement de ces champignons dans les zones tempérées.[13]



Figure 3 : Répartition géographique de *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* (d'après Lacroix *et al.*, 2002)

4. Clinique

L'atteinte clinique causée par *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* est superficielle, principalement unguéale et cutanée. La transmission se fait directement ou indirectement *via* le sol ou les plantes contaminés. Les lésions sont comparables à celles induites par les dermatophytes. C'est pourquoi ces deux espèces de *Scytalidium* spp. sont apparentées au groupe des « pseudo-dermatophytes ».[14] Les atteintes se localisent essentiellement aux pieds (plantes, espaces interdigitaux et ongles) et moins souvent aux mains. L'atteinte des plantes est associée à une hyperkératose importante, pour les ongles, l'atteinte est distale sous-unguéale.

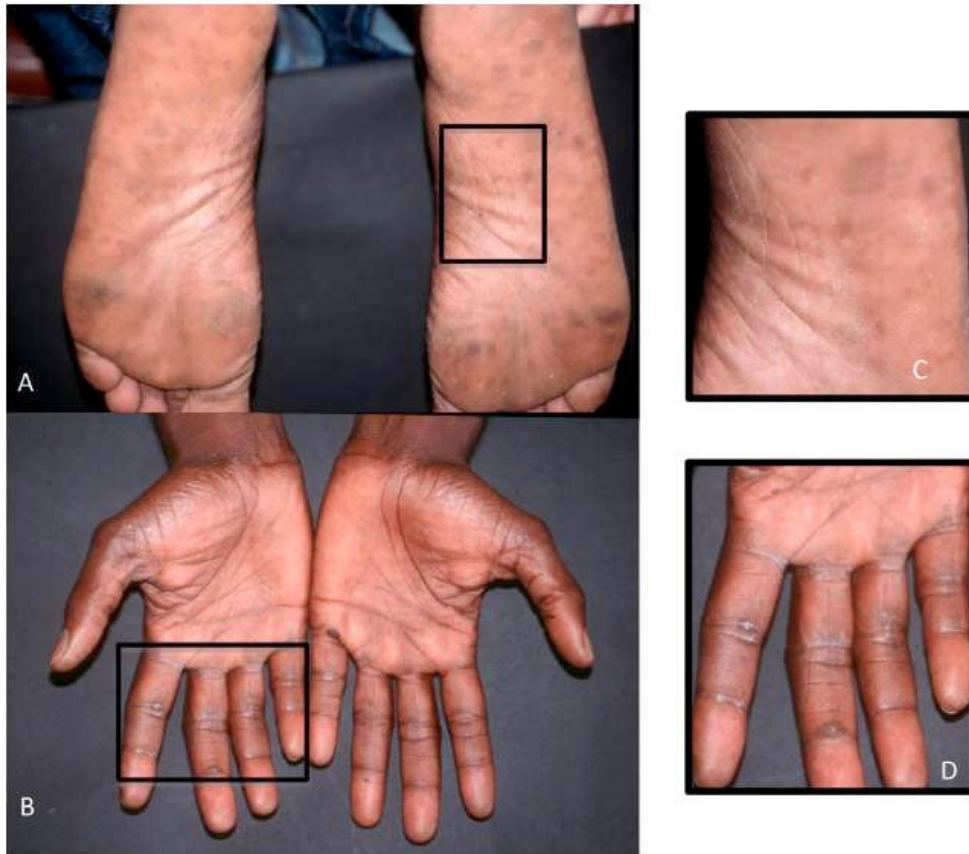


Figure 4 : Syndrome « deux pieds une main » A. Une hyperkératose plantaire bilatérale, B. Une hyperkératose palmaire unilatérale, C. Agrandissement d'une des plantes, D. Agrandissement de la paume droite (d'après Machouart *et al.*, 2013)



Figure 5 : Caractéristiques des scybalidioses (ongles). A. Onychomycose sous-unguéale du gros orteil droit avec onycholyse évoluant en onychodystrophie. B. Onychomycose sous-unguéale et latérodistale avec hyperkératose sous-unguéale de l'ongle du gros orteil droit. C. Onychomycose dystrophique totale du troisième doigt droit. (d'après Machouart *et al.*, 2013)

Les manifestations cliniques des infections à *S. hyalinum* et *N. dimidiatum* sont identiques. Il est important de reconnaître ces infections dans la mesure où elles ne répondent pas à la plupart des antifongiques conventionnels. L'atteinte systémique est possible mais rare, notamment dans le cas de patients immunodéprimés.[15, 16, 17]

5. Diagnostic

Le diagnostic d'une infection superficielle à *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* repose sur plusieurs critères. Tout d'abord l'aspect clinique, tel qu'il a été décrit précédemment, permet d'orienter le diagnostic. A la suite de l'observation clinique, le site concerné est prélevé par grattage des squames cutanées ou de l'ongle atteint. Puis, l'examen direct est réalisé au microscope et permet d'apprécier si le prélèvement comporte des éléments fongiques ou non. Enfin, la détermination du genre et de l'espèce fongique en cause reposera sur la culture des squames.[5]

a) Examen direct

Réalisé à partir des squames prélevées et observées directement au microscope, dans une goutte de noir chlorazole, cet examen oriente sur la présence ou non d'un champignon en précisant s'il s'agit d'une levure ou d'un filament. Dans le cas d'un filament, le caractère septé ou non de ce dernier peut également être observé. Cependant, il n'est pas possible de conclure à la présence d'un champignon du genre *Scytalidium* spp. uniquement sur l'examen direct.

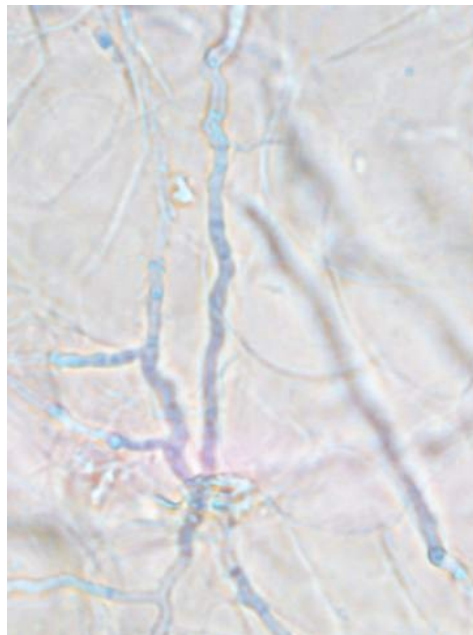


Figure 6 : Illustration d'un examen direct positif à filaments mycéliens septés dans des squames cutanées (objectif x 40)

b) Culture et examen microscopique

Comme pour la grande majorité des moisissures, la croissance de ce champignon est rapide et extensive sur milieu de Sabouraud sans actidione, en 3 à 7 jours. Bien qu'ils présentent les mêmes signes cliniques, *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* diffèrent par leurs aspects culturels.

(1) Neoscytalidium dimidiatum

Macroscopiquement, les jeunes colonies de *N. dimidiatum* en culture sont tout d'abord blanches puis grises claires et enfin noires, en 2 à 3 jours, sur milieu de Sabouraud incubé à 30°C. Le verso présente un intense pigment noir qui diffuse dans toute la gélose. La texture est plutôt duveteuse ou floconneuse et le développement aérien est important.

Du point de vue microscopique, des filaments fins, réguliers, septés et hyalins sont d'abord observés. Puis, au bout de quelques jours, des filaments plus larges apparaissent, à paroi épaisse et de couleur brune. Ces derniers se fragmentent ensuite en arthrospores uni- ou bicellulaires.

(2) Scytalidium hyalinum

Les cultures de *S. hyalinum* sont caractérisées par des colonies blanches qui peuvent devenir grisâtres en vieillissant. Le revers de la culture reste cependant pâle. L'aspect est plutôt laineux et le développement aérien important.

Au niveau microscopique, il n'y a pas de filaments pigmentés en brun mais uniquement des filaments hyalins, qui vont eux aussi avec le temps, se dissocier en arthrospores uni- ou bicellulaires.

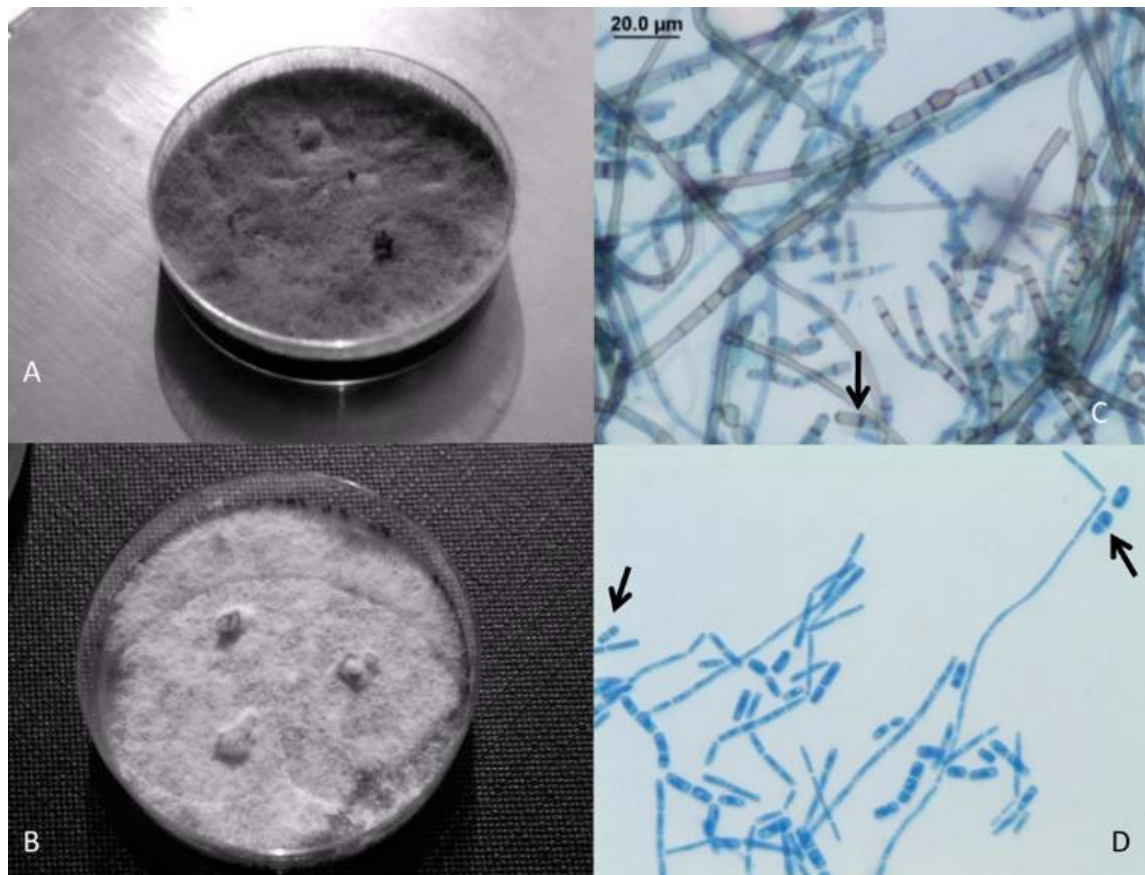


Figure 7 : Illustration de cultures de *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* (A et B) et d'un examen microscopique de celles-ci (C et D) (d'après Machouart *et al.*, 2010)

6. Prise en charge thérapeutique

Bien que le caractère majoritairement superficiel des atteintes à *Scytalidium spp.* ne positionne pas celles-ci parmi les infections préoccupantes du point de vue de la clinique et du pronostic, leur prise en charge reste toutefois difficile. En effet, ces moisissures sont particulièrement résistantes aux traitements antifongiques, aussi bien locaux que systémiques, et ce malgré des résultats plutôt encourageants *in vitro*. Bien sûr, d'autres facteurs entrent en compte dans la prise en charge de ces infections, notamment la compliance au traitement mais aussi, en ce qui concerne les onychomycoses, l'épaisseur de la tablette unguéale, véritable barrière à traverser pour les traitements. La terbinafine, connue par exemple comme antifongique de référence des dermatophytes, semble peu active sur les *Scytalidium spp.*

En 2014, M. Feuilhade de Chauvin publie un article général sur le traitement des onychomycoses et préconise, pour les scytalidioses, l'excision de la zone infectée mécaniquement ou chimiquement, un séchage, une inondation par de l'amphotéricine B orale sur toute une journée. En cas d'échec (surtout en présence d'un panaris), le recours à la chirurgie est vivement recommandé.[18] D'un point de vue plus pratique, les Dr. Desbois et Quist, respectivement mycologue et dermatologue au CHU de Fort-De-France en Martinique nous ont transmis leur façon de prendre en charge les scytalidioses. Pour les ongles, un traitement par Locéryl® vernis est prescrit une fois par jour au lieu d'une fois par semaine dans les dermatophytoses, associé à des soins de podologie. Si l'ongle est épais, un pré-traitement à l'urée est préconisé durant 20 jours avant d'appliquer le Locéryl®. Pour les espaces inter-orteils et les plantes, la Fungizone® doit être appliquée deux fois par jour localement pendant plusieurs mois. La formule locale de cette dernière étant retirée du marché, les praticiens de la Martinique proposent de la remplacer soit par la forme orale à appliquer localement soit par un azolé, à appliquer toujours plus souvent que prescrit avec une extrême régularité jusqu'à négativation des prélèvements de contrôle, voire au-delà. Ce protocole, bien qu'exigeant une grande compliance des patients, a donné de bons résultats pour nos collègues Martiniquais. Par ailleurs, découper l'ongle le plus possible, là où il est altéré par le champignon est une mesure mécanique qui fait partie du traitement et d'ailleurs l'optimise. [6] Ce protocole pratique n'a pas fait l'objet d'optimisation ou de rédaction de référentiel.

De nombreux articles traitent de la prise en charge de cette infection par les autres antifongiques mis sur le marché, nous en présenterons quelques uns dans le paragraphe suivant.

B. Antifongiques et *Scytalidium* spp. dans la littérature scientifique

Dans la littérature, plusieurs études ont ainsi été réalisées pour évaluer l'efficacité de différentes molécules contre les *N. dimidiatum* et *S. hyalinum*.

En 2007, Dunand *et al.* testent, *in vitro*, l'efficacité du posaconazole sur 12 souches de *Scytalidium* (7 *N. dimidiatum* et 5 *S. hyalinum*) par la méthode du E-test. Tous les isolats montrent des concentrations minimales inhibitrices (CMI) basses, inférieures ou égales à 0,25 mg/ml. Aucune CMI de référence n'est définie concernant cette molécule et son action sur les

pseudo-dermatophytes. Toutefois, par comparaison avec d'autres espèces fongiques (moisissures et levures) et par déduction de la concentration plasmatique en posaconazole attendue *in vivo*, l'auteur en conclut que ce principe actif pourrait être une bonne alternative thérapeutique dans les scytalidioses. Aucune étude n'a cependant été menée à ce jour pour étendre l'AMM de cet antifongique aux scytalidioses.[19]

En 2008, Lacroix et Feuilhade de Chauvin évaluent l'activité antifongique de l'amphotéricine B, l'itraconazole, le posaconazole, le voriconazole, la caspofungine ainsi que de la terbinafine sur 17 souches de *N. dimidiatum* et 15 souches de *S. hyalinum*, et ce, toujours *in vitro* mais cette fois-ci par la méthode du CLSI M38-A.

Tableau I : Résultats des CMI obtenues *in vitro* avec l'amphotéricine B, l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole, la terbinafine et la caspofungine vis-à-vis des souches de *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* (d'après Lacroix et Feuilhade de Chauvin, 2008)

Species (no. of isolates tested)	Antifungal agent	MIC (mg/L)		
		range	50% ^a	90% ^b
<i>S. dimidiatum</i> (17)	amphotericin B	0.06–1	0.5	0.5
	itraconazole	<0.03 to >16	4	>16
	voriconazole	<0.03 to 0.5	0.125	0.25
	posaconazole	0.125–2	2	2
	terbinafine	0.125–0.5	0.25	0.5
	caspofungin	0.06–8	0.5	8
<i>S. hyalinum</i> (15)	amphotericin B	0.06–1	0.25	0.5
	itraconazole	0.125–4	1	1
	voriconazole	<0.03 to 0.25	0.06	0.125
	posaconazole	0.06–1	0.5	1
	terbinafine	0.06–2	0.5	1
	caspofungin	0.125–8	0.5	1

^aMIC at which at least 50% of isolates are inhibited.

^bMIC at which at least 90% of isolates are inhibited.

Cette étude conclut à une supériorité du voriconazole par rapport aux autres molécules puisque cet antifongique présente la CMI la plus basse pour les deux espèces. A noter dans cette étude la CMI basse obtenue pour la terbinafine pourtant connue pour son inefficacité *in vivo* sur *N. dimidiatum*. Il est par ailleurs difficile de comparer les CMI du posaconazole avec celles obtenues dans l'article précédent puisque la technique utilisée n'est pas la même. Et il est à nouveau difficile de tirer des conclusions étant donné qu'il n'existe pas de cut-off pour ces molécules en ce qui concerne les *Scytalidium*. [20] A noter que, bien que *N. dimidiatum* et *S. hyalinum* présentent les mêmes résistances au niveau clinique, *N. dimidiatum* obtient globalement des CMI plus élevées *in vitro*. Ceci pourrait être en lien avec la présence d'un pigment, la mélanine, qui donne sa couleur noire à *N. dimidiatum*. [21]

En 2009, Madrid *et al.* évaluent la sensibilité à l'amphotéricine B, le posaconazole, le voriconazole, le ravuconazole, la terbinafine, l'anidulafungine et la micafungine sur 24 souches de *Scytalidium* (22 *N. dimidiatum* et 2 *S. hyalinum*) par un protocole adapté de la méthode du CLSI. [10]

Tableau II : Evaluation de l'activité *in vitro* de plusieurs antifongiques vis-à-vis de souches de *N. dimidiatum* et *S. hyalinum*

ST (no. of isolates tested)	MIC range (geometric mean) (µg/mL)						
	AMB	PCZ	VCZ	RCZ	MFG	ANI	TRB
ST1 (1)	0.25/-	4/-	4/-	32/-	8/-	2/-	0.125/-
ST2 (1)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	2/-	1/-	0.5/-
ST3 (2)	0.125-0.5/0.25	0.06-0.25/0.12	0.06-0.125/0.08	0.125-0.125/0.125	2-4/2.82	0.25-1/0.5	0.125-0.5/0.25
ST4 (18)	0.125-0.5/0.34	1-32/12.7	0.5-4/2.07	8-32/21.7	4-32/8.31	0.25-4/1.16	0.25-2/0.82
ST5 (2)	0.25-0.5/0.35	2-4/2.82	0.5-1/0.70	8-16/11.31	0.25-0.5/0.35	0.25-2/0.70	1-2/1.41
Total (24)	0.125-0.5/0.32	0.06-32/6.15	0.06-4/1.37	0.125-32/11.31	0.25-32/5.49	0.25-4/1.05	0.125-2/0.70

ST, sequence type; MIC, minimum inhibitory concentration; AMB, amphotericin B; PCZ, posaconazole; VCZ, voriconazole; RCZ, ravuconazole; MFG, micafungin; ANI, anidulafungin; TRB, terbinafine.

Les CMI les plus intéressantes sont observées pour l'amphotéricine B. Ces dernières ainsi que celles de la terbinafine sont en accord avec les résultats de l'étude de Lacroix et Feuilhade de Chauvin. Les CMI du voriconazole sont inférieures à celles du posaconazole et du même ordre de grandeur que l'anidulafungine, de la famille des échinocandines.

Dans le rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des Mycoses Invasives et des Antifongiques (CNRMA) établi en 2015, des cut-offs ont été établis pour 6 souches de *Neoscytalidium* sp. La méthode utilisée est celle des microdilutions en plaques suivant les protocoles de référence de l'EUCAST. Les valeurs suivantes sont disponibles pour 7 antifongiques :

Tableau III: Tableau répertoriant les valeurs de CMI50 de 7 antifongiques vis-à-vis de 6 souches de *Neoscytalidium* sp.

	Valeurs CMI50 (µg/ml)						
	AMB	ITR	VRZ	PSZ	CAS	TER	MCF
<i>Neoscytalidium</i> sp. (n=6)	0,12	≥ 8	0,12	0,5	0,5	0,5	0,06

AMB : amphotéricine B ; ITR : itraconazole ; VRZ : voriconazole ; PSZ : posaconazole ; CAS : caspofungine ; TER : terbinafine ; MCF : micafungine.

Mis à part dans le cas de l'itraconazole et de la terbinafine, les valeurs des CMI50 entre *N. dimidiatum* et *A. fumigatus* sont relativement proches dans ce rapport (données détaillées non rapportées ici). Mais de manière générale, les valeurs de CMI répertoriées dans la littérature sont assez divergentes. Cette différence est liée à plusieurs facteurs, notamment celui de la méthode utilisée qui pourtant est identique dans plusieurs articles et suit les mêmes recommandations. Plusieurs explications sont possibles, par exemple des facteurs liés à la taille et la constitution de l'inoculum fongique lui-même ou encore le nombre de souches mises à disposition pour l'établissement des valeurs de CMI (ici 6 pour *Nd* contre 231 pour *Af*).

Toutes les études ci-dessus sont réalisées *in vitro* et l'absence de corrélation des données obtenues *in vivo* et *in vitro* est un phénomène bien connu en mycologie. Des études complémentaires *in vivo* sont donc nécessaires afin de préciser l'action antifongique de ces molécules sur ces champignons. Cependant, la plupart des publications retrouvées, dont certaines sont présentées ci-dessous, ne traitent que d'atteintes systémiques à *N. dimidiatum* mais ne s'intéressent pas aux atteintes superficielles, sujet principal de cette thèse.

Concernant les infections systémiques à *N. dimidiatum*, plusieurs cas ont été publiés. En 2003, Dunn *et al.* présentent le cas d'une sinusite à *N. dimidiatum* chez une patiente immunodéprimée. Cette dernière est d'abord traitée par amphotéricine B puis par voriconazole. La stabilisation de l'infection fongique invasive est obtenue après 6 mois de traitement et ce, avant le décès de la patiente suite à un rejet de greffe.[15] Par la suite, en 2009, Elinav *et al.* s'intéressent au cas d'un patient immunocompétent atteint d'une infection invasive à *N. dimidiatum* et traité avec succès par voriconazole.[16] En 2011, R. Moutran *et al.* étudient le cas d'un patient traité par corticothérapie orale pour sarcoïdose et souffrant de lésions cutanées chroniques à *N. dimidiatum*. Ce dernier est traité par amphotéricine B IV pendant 7 semaines et une guérison est constatée. Les auteurs ne peuvent cependant pas conclure clairement à l'efficacité du traitement qui était concomitant avec une diminution progressive de la corticothérapie et donc de l'immunodépression. A noter qu'en première ligne, un traitement par terbinafine topique avait été mis en place sans résultat probant.[17]

En parallèle des ces études *in vitro* et des cas cliniques présentés, Ruiz-cendoya *et al.* évaluent, en 2010, l'efficacité de l'amphotéricine B, du voriconazole et du posaconazole sur un modèle murin d'infection systémique à *N. dimidiatum*. [22] Deux souches de *N. dimidiatum* sont testées pour chaque molécule sur des groupes de 10 souris. L'efficacité des traitements est évaluée sur la prolongation de la survie des souris, sur la réduction de la charge fongique dans les tissus ainsi que sur des études histologiques des organes infectés. Les résultats obtenus *in vivo* en évaluant la survie des souris sont rapportés aux valeurs de CMI obtenues *in vitro* avec la méthode du CLSI. Les deux souches présentent des CMI plus basses *in vitro* pour l'amphotéricine B, par rapport aux autres antifongiques.

In vivo, une prolongation de la durée de survie est observée avec toutes les molécules testées comme l'illustrent les graphiques de la figure 8.

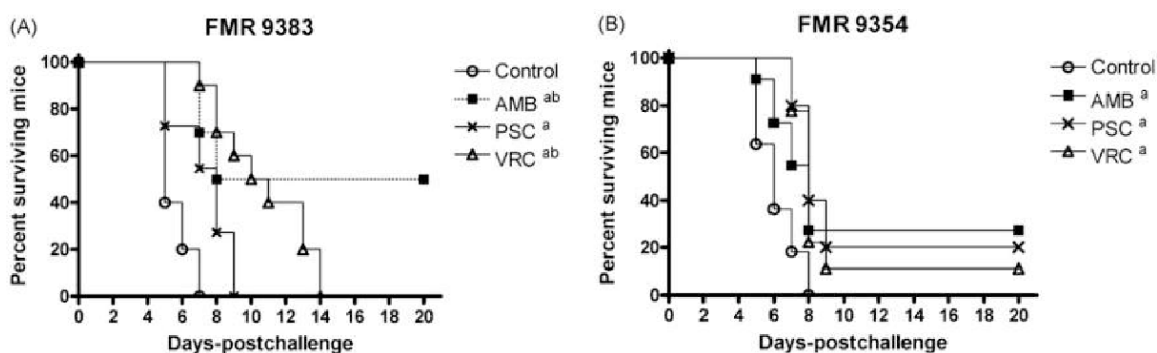


Figure 8 : Mortalité cumulée de souris neutropéniques infectées par *N. dimidiatum* souche FMR 9383 (A) et FMR 9354 (B) et traitées par 1,2 mg/kg d'amphotéricine B (AMB), 60 mg/kg de posaconazole (PSC) et 60 mg/kg de voriconazole (VRC). (Traitement débuté à J-1 post-infection et continué pendant 7 jours).

Pour la souche FMR 9383, 50% des souris traitées par l'amphotéricine B survivent jusqu'à la fin de l'expérience alors que toutes les autres meurent dans les 2 semaines. La différence de survie est significative pour l'amphotéricine B et le voriconazole pour la souche FMR 9383 alors qu'elle n'est pas significativement différente entre les trois molécules pour la souche FMR 9354.

Les auteurs ont ensuite évalué les effets du traitement antifongique sur la charge fongique dans les reins et la rate. Il est cependant difficile d'en tirer une conclusion puisque seulement deux souches de *N. dimidiatum* sont testées et on observe des disparités entre les résultats obtenus. De manière globale, l'amphotéricine B apparaît plus efficace pour réduire la charge fongique que les autres antifongiques dans les deux organes étudiés. Cette étude préliminaire est donc intéressante mais aurait gagné à être réalisée sur d'avantage de souches.

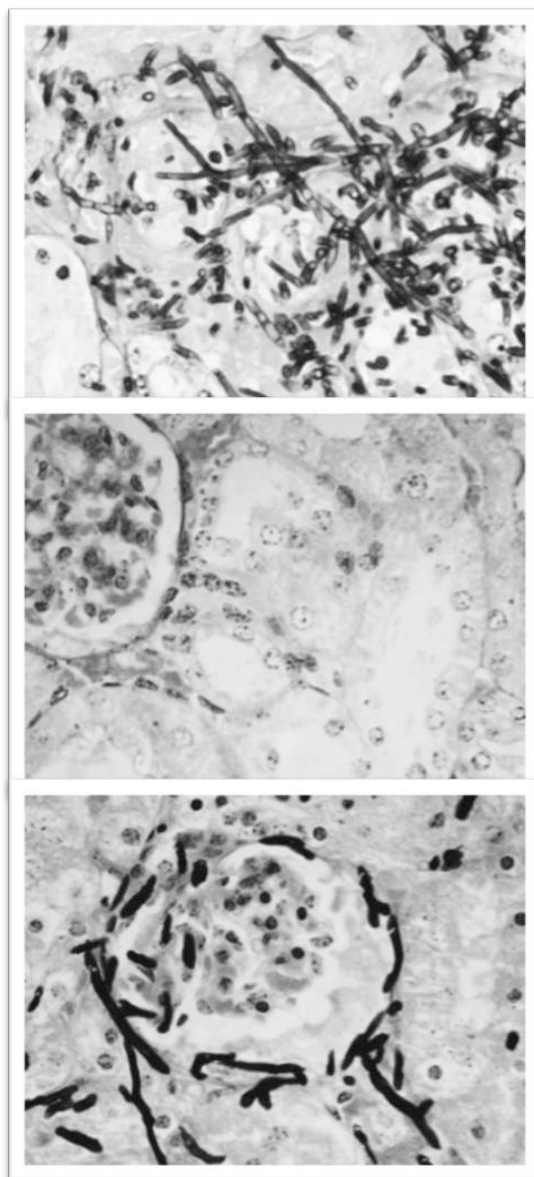


Figure 9 : Coupes histo-pathologiques des reins de souris neutropéniques infectées par *N. dimidiatum*. (1) groupe contrôle non traité : éléments fongiques associés à une réponse inflammatoire. (2) groupe traité par amphotéricine B ou par voriconazole : absence d'éléments fongiques et de réponse inflammatoire (3) groupe traité par voriconazole : quelques éléments fongiques sans réponse inflammatoire.

En conclusion, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement de référence pour la prise en charge d'une scytalidiose. Certaines molécules donnent de bons résultats *in vitro* mais la corrélation *in vivo* n'est souvent pas démontrée. D'un point de vue clinique, des résultats sont obtenus avec l'amphotéricine B par voie orale, toutefois cette approche n'est pas adaptée pour traiter une onychomycose à *Scytalidium* spp. En pratique, des résultats sont obtenus avec cet antifongique utilisé par voie locale comme le préconisent les médecins du CHU de Fort de France. Les mécanismes de résistance de ce champignon vis-à-vis des molécules existantes sont encore mal connus et mal définis.

En considérant ces données, l'utilisation des huiles essentielles, est une approche originale de manière à envisager une nouvelle alternative thérapeutique. Cependant, il est tout d'abord indispensable de proposer une méthode d'évaluation standardisée *in vitro* de ces substances.

C. Huiles essentielles

1. Généralités

Les huiles essentielles (HE) occupent aujourd'hui une place de plus en plus importante dans notre société qui privilégie le recours aux produits d'origine naturelle. Formidables concentrés de molécules aromatiques naturelles, les nombreuses propriétés thérapeutiques des HE ont été mises en évidence au fil du temps : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, relaxantes, cicatrisantes, anti-inflammatoires et bien d'autres. Mais leur utilisation est-elle un simple phénomène de mode où peuvent-elles prendre une place significative dans l'arsenal thérapeutique dont nous disposons ?

a) Origine

Le terme aromathérapie a été créé par l'ingénieur chimiste, R. M. Gattefossé en 1928 et désigne l'emploi des HE issues de plantes aromatiques pour traiter les pathologies et pour améliorer la santé et le bien-être. Il en découle la définition de l'huile essentielle, définie par la commission de la Pharmacopée Européenne : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

Les HE sont des extraits de plantes aromatiques. Ces dernières, capables de stocker et de synthétiser une essence dans leurs tissus, ne représentent que 10% du règne végétal. Ces essences permettent aux plantes qui les contiennent d'attirer les insectes pollinisateurs ou de repousser les prédateurs herbivores. Cependant, cette capacité de synthèse reste encore inexplicée à ce jour. Parmi ces plantes aromatiques, quelques familles sont à retenir : les lamiacées (lavandes, thym, sarriettes, origan, etc.), les myrtacées (eucalyptus, girofliers, mélaleuques, etc.), les lauracées (cannelles, lauriers, bois de rose, litsées, etc.), les astéracées (camomille, etc.), les apiacées, les abiatacées, les poacées (palmarosas, citronnelles, etc.), les cupressacées (cyprès, etc.) et les rutacées (bergamote, etc.). Seules les parties les plus concentrées de la plante sont récoltées pour subir l'extraction par distillation. Les structures sécrétrices se retrouvent dans les sommités fleuries, les fruits, les feuilles, les racines, les bois, l'écorce et les oléorésines.[23]

b) Historique

L'utilisation des HE remonte à l'Antiquité et des pays comme la Chine et l'Égypte sont les berceaux de l'utilisation de l'aromathérapie. Les peuples indigènes prônaient déjà une relation étroite avec les plantes, que ce soit pour se soigner ou vénérer leurs dieux. Les aborigènes exploitaient tout autant ces dernières et étaient dotés d'une connaissance remarquable sur les bienfaits que la nature peut apporter. Par exemple, les feuilles de plusieurs espèces de *Melaleuca*, très connues dans le monde des HE (Niaouli, Tea tree, etc.), étaient couramment utilisées, notamment le Niaouli pour ses propriétés cicatrisantes où le Tea tree pour ses vertus anti-infectieuses.[24] En Inde, région connue pour sa richesse en plantes aromatiques, les HE étaient considérées comme le prana, « le souffle de vie » apporté par l'énergie des HE.

Une civilisation se démarque d'avantage, il s'agit de la civilisation égyptienne. Plus particulièrement dans l'Égypte Antique durant les dynasties des pharaons, les plantes aromatiques étaient à la base de l'élaboration de l'embaumement des momies grâce à leurs vertus antibactériennes et antiputrides. Les Grecs ont par la suite repris les connaissances égyptiennes et les ont répandues dans tout le bassin méditerranéen, surtout dans la Rome antique. Ce n'est qu'aux alentours du XII^{ème} siècle que l'aromathérapie trouve sa place en Occident.

Voici quelques noms qui ont marqué l'évolution des connaissances dans le domaine de l'aromathérapie :

- Tout d'abord, Dioscoride (25-90 après J.-C.), père de la médecine occidentale. Il a rédigé un ouvrage capital intitulé *De Materia Medica*, dans lequel il recommande l'utilisation des plantes pour se soigner.
- Mais aussi Avicenne (980-1037), médecin Arabe qui mit au point l'Alambic au X^{ème} siècle, processus de distillation permettant d'obtenir les HE.

- R. N. Gatefossé (1881-1950), ingénieur chimiste français, inventeur du terme « aromathérapie ». Il a longuement étudié les vertus antimicrobiennes des HE à la suite d'une découverte fortuite après s'être brûlé la main et l'avoir mise directement dans de l'HE de Lavande. Le soulagement immédiat et la rapidité déconcertante de cicatrisation l'ont poussé à se pencher sur les différentes propriétés médicinales des HE.
- Le docteur Jean Valnet (1920-1995) reprit les travaux de Gattefossé et publia des ouvrages de référence (Aromathérapie, Traitement des maladies par les essences des plantes, 1964).

R. N. Gatefossé et J. Valnet sont tous les deux considérés comme les pères de l'aromathérapie moderne.

- Pour finir, P. Franchomme, chercheur français et aromatalogue est à l'origine de la notion de « chémotype », terme que nous décrirons plus en détails par la suite.

À la fin du XX^{ème} siècle, au même titre que l'ensemble de la pharmacognosie, l'aromathérapie bénéficia de l'avancée des méthodes d'analyses, en particulier de la chromatographie. La distinction précise des composés aromatiques permit à la médecine de mieux appréhender leurs mécanismes d'action, et d'affiner leur prescription.[25]

c) Méthodes d'extraction

Il existe deux grandes techniques pour extraire les HE des plantes :

- L'extraction par expression à froid, moyen le plus simple mais le plus limité, valable pour extraire l'essence contenue dans les zestes frais d'agrumes.
- La distillation par entraînement à la vapeur d'eau, technique la plus utilisée en aromathérapie.

Le principe de cette dernière technique consiste à extraire l'HE contenue dans les cellules végétales par la vapeur d'eau. La matière première est placée dans un alambic dans lequel est envoyée de la vapeur d'eau. Celle-ci détruit les cellules végétales et libère ainsi des molécules odorantes. Une fois chargée d'HE, la vapeur d'eau est condensée par refroidissement. L'hydrolat aromatique formé par cette condensation de vapeur d'eau est obtenu d'un côté et de l'autre est recueillie l'HE. Les différences de densités permettent de séparer ces deux phases dans l'essencier.

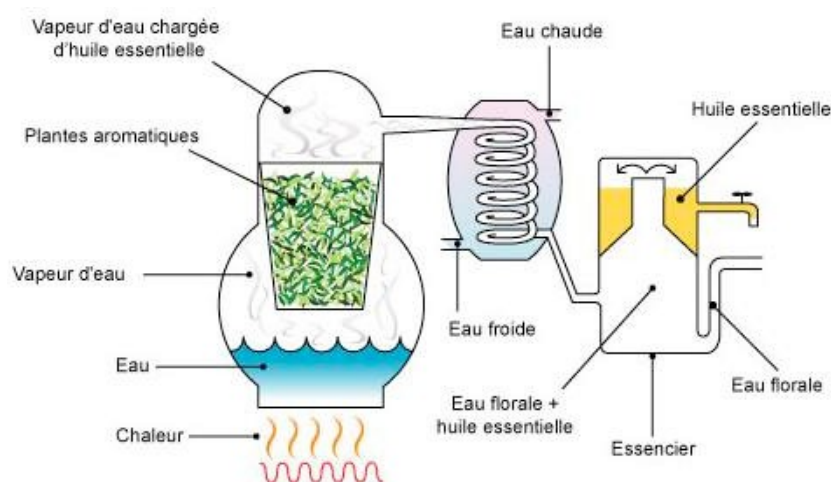


Figure 10 : Principe de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (d'après <http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com>, consulté le 06/05/17)

A noter que les molécules, dites « lourdes », restent dans le tissu végétal. Leur utilisation ainsi que leurs propriétés concernent la phytothérapie.[26]

d) Composition

(1) Définition du chémotype

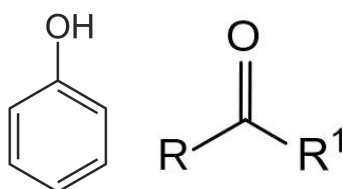
Le chémotype (ou chimiotype) définit la (les) molécule(s) biochimiquement active(s) de l'HE. On parle ainsi d'HECT : Huile Essentielle ChémoTypée. Cette mise en évidence est nécessaire car pour une même plante, l'essence synthétisée est biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développe. Une plante aromatique peut donc fournir des HE totalement différentes en fonction du lieu de récolte ou de l'origine géographique. Biochimiquement différents, deux chémotypes peuvent ainsi présenter des activités mais aussi des toxicités différentes.

Par exemple, prenons l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Le *Thymus vulgaris* CT thujanol présente une activité anti-infectieuse, stimulante, régénératrice des cellules hépatiques et présente très peu d'effets secondaires. Le *Thymus vulgaris* CT thymol est, quant à lui, un anti-bactérien, mais présente une action caustique pour la peau et est hépatotoxique à doses élevées et prolongées. [26]

(2) Chémotypes principalement rencontrés dans les HE

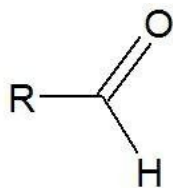
La détermination de ce dernier est possible grâce au couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse. Plusieurs familles biochimiques sont fréquemment rencontrées : les alcools, les cétones, les aldéhydes terpéniques et aromatiques, les esters, les éthers, les terpènes ainsi que les oxydes.

(a) Les alcools



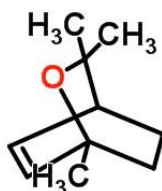
Ils incluent les phénols, les alcools et les sesquiterpénols. Les phénols et les alcools sont connus pour leurs propriétés antibactériennes à large spectre d'action mais aussi pour celles virucides et fongicides. Attention, ils ne sont cependant pas dénués de toxicité. Les phénols sont en effet dermocaustiques à l'état pur et hépatotoxiques à dose élevée et prolongée.

(b) *Les aldéhydes*



Les aldéhydes aromatiques présentent des propriétés proches de celles des phénols, et les aldéhydes terpéniques sont plus connus pour leur action calmante, anti-inflammatoire et antalgique.

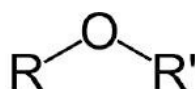
(c) *Les oxydes terpéniques*



Ex : 1,8 cinéole

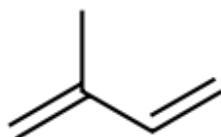
Ces composés biochimiques sont de très bons expectorants et antiviraux, avec des propriétés antibactériennes plus légères. Leur bonne tolérance cutanée favorise leur utilisation (ex : Niaouli, Eucalyptus radié, etc.).

(d) *Les éthers*



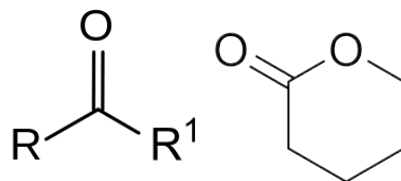
Ces derniers sont connus pour leur action antispasmodique, antalgique et antivirale.

(e) *Les terpènes*



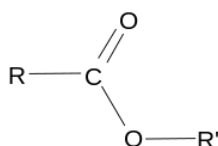
Très bons stimulants, ils montrent aussi des activités « hormon-like » intéressantes pour des états inflammatoires prolongés. Ils sont aussi appréciés pour leur effet décongestionnant respiratoire et lymphatique.

(f) *Les cétones et les lactones*



Mucolytiques, lipolytiques, cholagogues, cholérétiques mais aussi neurotoxiques et abortifs. Ce qui nécessite une certaine vigilance pour leur utilisation.

(g) *Les esters*



Ces derniers présentent des propriétés antispasmodiques, anti-inflammatoires et sédatives ainsi qu'une très faible toxicité.[26]

e) Effets indésirables et toxicité des huiles essentielles

L'action puissante des HE leur donne une réelle importance dans l'arsenal thérapeutique. Mais cette efficacité s'accompagne bien souvent d'une toxicité non négligeable qui demande une utilisation prudente et intelligente. Certaines HE, par exemple celle de moutarde ou encore de croton, présentent une activité vésicante et nécrosante. Les HE riches en cétones (menthone, bornéone, thuyone) peuvent être, selon les terrains (immaturité, fragilité), neurotoxiques et abortives. Les HE phénolées ou riches en aldéhydes sont bien souvent dermocaustiques. Leur utilisation nécessite une dilution au préalable. La toxicité potentielle de certaines HE nécessite ainsi un encadrement strict et spécifique aussi bien au niveau de leur production que de leur utilisation. Le danger réside dans la facilité avec laquelle il est possible de se les procurer et la vulgarisation de leur utilisation.[25]

f) Critères de qualité

L'obtention d'une HE de qualité se révèle être un processus délicat devant répondre à de nombreux critères de qualité issus de l'ANSM dont la certification botanique qui regroupe l'appellation de la plante avec le genre, l'espèce, la sous-espèce et le cultivar (variante de nature spontanée à l'intérieur d'une même espèce) ou l'hybride (croisement entre les variétés, les variétés cultivées et les espèces). Les autres critères sont l'origine géographique, le biotope étant important pour caractériser la composition chimique de l'HE, le mode de culture (sauvage ou cultivée, agriculture biologique ou non), le stade de développement botanique, l'organe distillé, le mode d'extraction ainsi que le(s) chémo(s)type(s). [26]

D. Huiles essentielles et champignons dans la littérature scientifique

Concernant les données de la littérature sur le potentiel antifongique des HE, de nombreux articles sont disponibles. [27, 28, 29] Nous avons donc sélectionné les plus pertinents d'un point de vue méthodologique ou pour les résultats qui en découlent sur les dermatomycoses.

En 1988, Janssen *et al.* testent 53 HE sur 3 des dermatophytes les plus communs aux Pays-Bas (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* et *Epidermophyton floccosum*). Cette étude conclue à une activité *in vitro* intéressante de plusieurs HE et plus particulièrement : l'Aneth, le Giroflier, l'Origan, le Persil, l'Anis vert ainsi que le Thym, qui se démarquent sur les 3 souches de dermatophytes. [30]

En 2002, Hammer *et al.* étudient l'action *in vitro* de l'HE de Tea tree sur des souches de dermatophytes et autres filamenteux. Cette étude, qui repose sur le principe de la microdilution selon la technique du CLSI, conclut à une activité fongistatique et fongicide suivant la concentration utilisée d'HE de Tea tree. Cependant, les *Scytalidium* spp. ne font pas partie de cette étude. [31]

En 2002 également, Satchell *et al.* traitent 158 patients atteints de pieds d'athlète (atteinte interdigitale due à un dermatophyte) avec de l'HE de Tea tree diluée à 25% ou 50% dans une solution d'éthanol et de polyéthylène glycol vs un groupe placebo. Il montre une amélioration clinique statistiquement significative pour les patients traités par l'HE de Tea tree par rapport au placebo. Cependant, il n'y a pas de scytalidioses dans cette cohorte et les auteurs restent évasifs sur les espèces de dermatophytes testées. De plus, l'évaluation se fait au bout de 4 semaines de traitement alors que les onychomycoses sont normalement des prises en charge de longue durée.[32]

En 2005, Cavaleiro *et al.* travaillent sur le potentiel antifongique de l'HE de Génévrier sur des souches de dermatophytes, d'*Aspergillus* et de *Candida*. Ils déterminent la CMI en se basant sur les protocoles du CLSI par macrodilution. Ils testent plusieurs chémotypes d'HE de Génévrier et concluent que *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* est la plus active, avec une CMI entre 0,08 et 0,16 µl/ml. Ces auteurs s'intéressent également à la composition de l'HE de *J. oxycedrus ssp. oxycedrus* : celle-ci est majoritairement composée d' α -pinène comme toutes les HE de Génévrier et contient du δ -3-carène qui lui est spécifique. L'activité de ces différents composés est évaluée directement sur les champignons après les avoir isolés par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse. C'est le δ -3-carène qui montre les meilleures CMI. Son rôle semble donc essentiel à l'activité antifongique attribuée à l'HE de *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* même s'il n'est pas le chémotype majoritaire de cette dernière et même s'il est impossible d'en déduire si l'action est uniquement due à ce dernier ou à une synergie entre tous les chémotypes présents dans l'huile. L'étude conclut cependant au potentiel thérapeutique de cette HE ainsi qu'à l'importance des chémotypes qui la composent. Par ailleurs, elle ne concerne que les dermatophytes et l'efficacité reste à confirmer par des études plus poussées, notamment *in vivo*.[33]

En 2006, Tullio *et al.* testent, *in vitro*, les HE de Thym rouge, de Fenouil, de Clou de girofle, de Sauge, de Citron, de Lavande et de Pin sur 44 souches de champignons comprenant des dermatophytes et des moisissures dont certains dématiés. La méthode est basée sur deux protocoles différents, le premier suivant la méthode du CLSI, l'autre étant basée sur une méthode par contact avec des vapeurs chargées en HE. Les résultats obtenus montrent des activités antifongiques variables selon l'HE et la méthode utilisée, avec une supériorité du Thym sur les dermatophytes et dématiés ainsi que des CMI plus basses obtenues avec les

vapeurs d'HE. Une fois encore des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ces résultats et déterminer le mode d'action exacte de ces HE.[34]

En 2011, De Oliveira Pereira et al. se penchent sur l'action fongicide de la Citronnelle sur *Trichophyton rubrum*. Ils notent une inhibition de la croissance fongique ainsi que des modifications morphologiques importantes des souches au microscope (altération de la forme, de la pigmentation, etc.). Ils en concluent à une action antifongique de cette HE contre *Trichophyton rubrum*. [35]

Les huiles essentielles sont donc un sujet qui intéresse les chercheurs depuis déjà plusieurs années. Les articles les décrivant comme antifongiques prolifèrent mais à ce jour, aucun auteur ne s'est encore penché sur le traitement des onychomycoses à *Scytalidium* spp. par ces substances. Par ailleurs, de nombreux articles comme ceux que nous avons présentés ci-dessus donnent des valeurs de CMI alors qu'aucun cut-off n'a été défini pour le moment. Le sujet d'étude est donc encore vaste et l'élaboration de protocoles fastidieuse. C'est en lisant ces différents articles et à l'aide des protocoles du CLSI que nous avons travaillé pour standardiser et rendre le plus reproductible possible une méthode d'évaluation *in vitro* des HE sur les champignons.

E. Objectifs du travail présenté

L'objectif principal de ce travail a été de déterminer un protocole standard permettant d'évaluer l'activité antifongique des HE sur les champignons. Notre approche a été centrée autour de deux méthodes :

- l'aromatogramme : ce procédé, plus simple à mettre en œuvre que le second, a déjà été utilisé et décrit dans la littérature. Bien que manquant de précision dans sa réalisation et sa lecture par l'absence de standardisation actuelle, il offre un premier résultat visuel de l'efficacité d'une HE sur un champignon.
- La méthode de microdilution en plaques : elle repose sur des protocoles de référence internationaux pour tester l'activité des antifongiques sur les champignons, selon les guidelines du Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) et aboutit à des résultats plus précis.

Secondairement, en utilisant ces protocoles, 20 huiles essentielles ont été testées sur 15 souches de *Neoscytalidium dimidiatum*, dans le but de mettre en évidence une éventuelle activité de certaines d'entre elles sur ce champignon connu pour sa résistance aux traitements conventionnels.

A plus long terme, les retombées envisagées de ce travail seraient de définir un protocole standard pour le test des HE sur d'autres champignons, et en particulier les dermatophytes. Il serait aussi intéressant d'exploiter le potentiel antifongique des HE les plus actives pour développer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre du traitement des mycoses superficielles.

II. Matériels et méthodes

A. Souches étudiées

Quinze souches de *N. dimidiatum* issues de la collection du Centre International de Référence des champignons situés aux Pays-Bas (Centraal Bureau voor Schimmelcultures : CBS), ont été utilisées dans cette étude. Les souches, conservées dans un mélange glycérolé au congélateur, ont été repiquées sur des géloses de Sabouraud et placées à l'étuve à 37°C. Elles ont été régulièrement entretenues par repiquage tout au long de notre étude. Le numéro de référence, la source et l'origine géographique des souches utilisées dans ce travail sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Dans notre étude, nous avons travaillé sur des souches présentant 3 jours de pousse et en nous appuyant sur les recommandations du protocole CLSI-M38A décrit pour évaluer l'activité de molécules antifongiques vis-à-vis de moisissures.

	Espèce	Numéro de référence	Source	Origine géographique
1	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125608	Homme	Gabon
2	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125609	Homme	Gabon
3	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125611	Squames cutanées, pied	Martinique
4	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125613	Homme	Gabon
5	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125614	Homme	France
6	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125615	Homme	France
7	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125616	Homme	Gabon
8	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125617	Ongle	France
9	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125618	Homme	Gabon
10	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125619	Pied gauche	France
11	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125804	Homme	France
12	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 125745	Homme	Gabon
13	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 114859	Homme	USA
14	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 233.57	Platane, bois dégradé	Italie
15	<i>N. dimidiatum</i>	CBS 251.96	Mycétome, pied	Antilles

B. Choix des huiles essentielles

Nous avons sélectionné un panel de 20 huiles essentielles, pour leurs potentielles activités antifongiques dans la littérature ou selon les précisions de sites destinés au grand public tel que Aromazone (<http://www.aroma-zone.com>) ou Pranarom (<https://www.pranarom.com/fr>). Les HE ont été commandées par ce biais, plus facilement accessible pour ces premières approches, et non par l'intermédiaire de la Copper, fournisseur spécialisé de toutes les matières premières indispensables aux industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires.

Le tableau présenté ci-dessous répertorie la liste de ces 20 huiles essentielles, leur dénomination scientifique, leur famille botanique, la partie de la plante distillée, l'origine géographique de la plante dont elles sont issues, les chémotypes majoritaires pour chacune d'elles ainsi que le numéro de lot.

Tableau IV : Liste des 20 HE testées dans notre étude, et précision des dénominations scientifiques, familles botaniques, parties distillées, situations géographiques, chémotypes majoritaires (>5%) et numéros de lots.

Huiles essentielles	Dénomination scientifique	Famille botanique	Partie de la plante distillée	Situation géographique	Chémotypes majoritaires (>5%)	Lot
Bergamotier	<i>Citrus aurantium</i> spp <i>bergamia</i>	Rutacées	Zeste	Italie	<u>Esters</u> : acétate de linalyle (28,58%) <u>Terpènes</u> : limonène (38,05%), β-pinène (5,92%), γ-terpinène(6,84%) <u>Alcools</u> : linalol (10,75%)	OF16318
Bois de rose	<i>Aniba rosaeodora</i> <i>organic</i>	Lauracées	Feuille	Brésil	<u>Alcools</u> : linalol (80,20%)	OF17167
Camomille romaine	<i>Chamaemelum nobile</i>	Astéracées	Fleur	Angleterre	<u>Esters</u> : angélate d'hexyle (19,81%), de méthallyle (16,84%), de 2-méthylbutyle (7,28%), d'isoamyle(6,92%), isobutyrate d'hexyle (7,84%) <u>Cétones</u> : trans-pinocarvéol (8,20%)	OF16487
Cannelle de Ceylan	<i>Cinnamomum verum</i>	Lauracées	Feuille	Sri Lanka	<u>Alcools</u> : Eugénol (77,35%)	OF11590
Eucalyptus citronné	<i>Eucalyptus citriodora</i>	Myrtacées	Feuille	Madagascar	<u>Aldéhydes terpéniques</u> : citronnellal (73,45%) <u>Alcools</u> : citronnellol (5,78%), isopulegol (7,49%)	OF17277
Eucalyptus officinal	<i>Eucalyptus radiata</i>	Myrtacées	Feuille	Australie	<u>Oxydes</u> : 1,8 cinéole (69,5%) <u>Alcools</u> : α-terpinéol (10,50%) <u>Terpènes</u> : limonène (5,46%)	OF17699
Géranium Egypte	<i>Pelargonium asperum</i>	Géraniacées	Feuille	Egypte, Afrique du Nord	<u>Alcools</u> : citronnellol (33,92%), géraniol (13,01%) <u>Esters</u> : formiate de citronnellyle (7,16%)	PHE0147
Clous de Girofle	<i>Eugenia caryophyllus</i> <i>organic</i>	Myrtacées	Bouton floral	Madagascar	<u>Phénols</u> : eugénol (81,78%) <u>Esters</u> : acétate d'eugényle (12,90%)	OF15306
Laurier noble	<i>Laurus nobilis</i>	Lauracées	Feuille	Serbie	<u>Oxydes</u> : 1,8-cinéole (45,05%) <u>Alcools</u> : linalol (5,70%) <u>Esters</u> : acétate de terpényle (8,02%) <u>Terpènes</u> : sabinène (8%), α-pinène (5,89%)	OF17615
Lavande aspic CT2	<i>Lavandula latifolia</i> <i>CT2</i>	Lamiacées	Sommité fleurie	Espagne	<u>Alcools</u> : linalol (38,23%) <u>Cétones</u> : camphre (11,84%) <u>Oxydes</u> : 1,8-cinéole (26,12%)	OF17113

(Suite du tableau 3)

Huiles essentielles	Dénomination scientifique	Famille botanique	Partie de la plante distillée	Situation géographique	Chémotypes majoritaires (>5%)	Lot
<i>Lemongrass</i>	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Poacées	Herbe	Inde	<u>Monoterpénols</u> : géraniol (6,14%) <u>Aldéhydes terpéniques</u> : géraniol (41,24%), néral (33,13%)	OF15144
<i>Litsée citronnée</i>	<i>Litsea cubeba</i>	Lauracées	Semence	Inde, Chine, Vietnam	<u>Aldéhydes terpéniques</u> : géraniol (40,73%), néral (30,91%) <u>Terpènes</u> : limonène (9,56%)	PHE0106
<i>Niaouli</i>	<i>Melaleuca quinquenervia CT cinéole</i>	Myrtacées	Feuille	Madagascar, Nouvelle Calédonie	<u>Oxydes</u> : 1,8 cinéole (55,65%) <u>Monoterpénols</u> : α -terpinéol (7,10%) <u>Terpènes</u> : α -pinène (12,87%), limonène (5,63%)	PHE0293
<i>Origan compact</i>	<i>Origanum compactum</i>	Lamiacées	Sommité fleurie	Maroc	<u>Phénols</u> : carvacrol (42,40%), thymol (17,50%) <u>Terpènes</u> : γ -terpinène (18,10%), p-cymène (7,92%)	OF15194
<i>Palmarosa</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>	Poacées	Partie aérienne	Népal	<u>Alcools</u> : géraniol (79,91%) <u>Esters</u> : acétate de géranyle (11,39%)	OF16792
<i>Ravintsara</i>	<i>Cinnamomum camphora CT cinéole</i>	Lauracées	Feuille	Madagascar	<u>Oxydes</u> : 1,8-cinéole (58,40%) <u>Terpènes</u> : sabinène (14,11%), α -pinène (5,84%) <u>Alcools</u> : α -terpinéol (6,04%)	OF17700
<i>Sarriette des montagnes</i>	<i>Satureja montana</i>	Lamiacées	Sommité fleurie	France	<u>Phénols</u> : carvacrol (56,22%) <u>Terpènes</u> : p-cymène (10,23%), γ -terpinène (12,97%)	OF16318
<i>Sauge officinale grande feuille</i>	<i>Salvia officinalis grande feuille</i>	Lamiacées	Sommité fleurie	France	<u>Cétones</u> : thuyones (60,06%), camphre (6,94%) <u>Oxydes</u> : 1,8-cinéole (8,32%)	OF16324
<i>Tea tree</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtacées	Feuille	Australie	<u>Alcool</u> : terpinène-4-ol (40,01%) <u>Terpènes</u> : γ -terpinènes (21,62%), α -terpinène (9,71%)	PHE0187
<i>Thym vulgaris à linalol</i>	<i>Thym vulgaris CT linalol</i>	Lamiacées	Sommité fleurie	Espagne	<u>Alcools</u> : Linalol (82,8%) <u>Esters</u> : acétate de linalyle (6,20%)	QHE0391

C. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des HE

1. Aromatogramme

a) Principe

L'aromatogramme est une méthode permettant d'évaluer si une HE présente une activité antifongique, *in vitro*, vis-à-vis d'un champignon. Le procédé par lequel ce test est réalisé est comparable à l'antibiogramme. Le principe repose sur l'ensemencement d'une suspension fongique sur une gélose de Sabouraud, ici il s'agit de *N. dimidiatum*, puis au dépôt d'un disque imprégné d'HE au centre de la gélose. Après incubation à une température et pour un temps défini, l'inhibition de croissance du champignon est objectivée par la présence d'un halot autour du disque imprégné. La présence et le diamètre de ce halot permettent d'évaluer si l'huile a une efficacité ou non et l'importance de celle-ci vis-à-vis du champignon étudié.

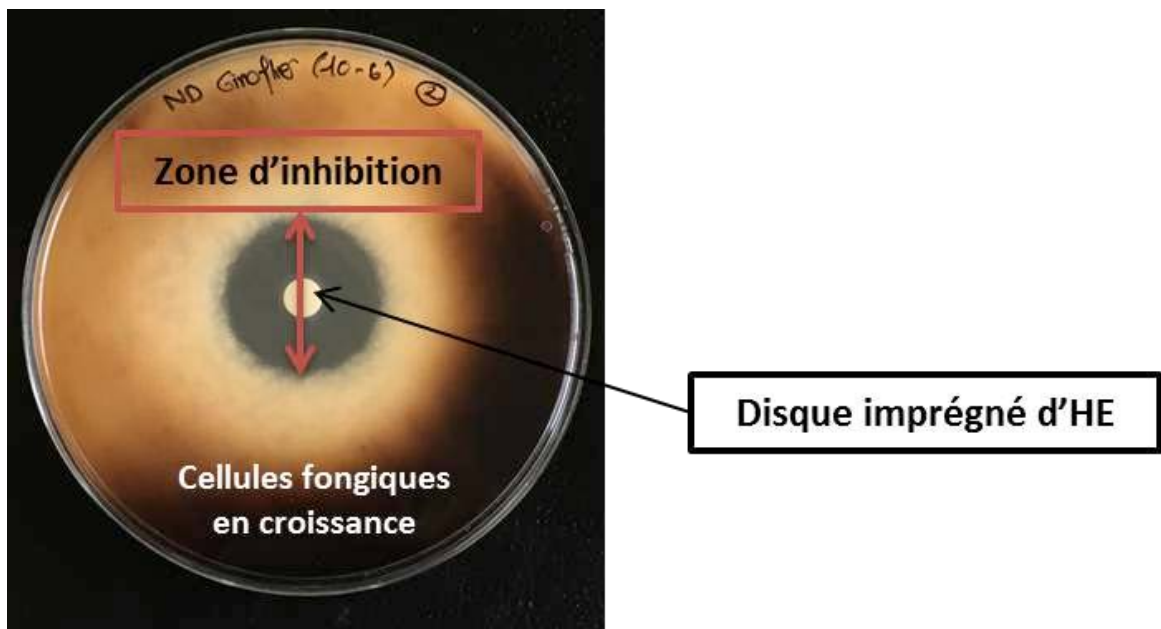


Figure 11: Aromatogramme réalisé avec l'HE de Giroflier et *N. dimidiatum*. Les conditions de réalisation de ce test sont les suivantes : 100 μ l d'inoculum fongique d'une suspension à 0,5 Mc Farland, utilisation d'un disque de 6 mm de diamètre imprégné de 10 μ l d'HE pure. La boîte est incubée à 37°C, cette observation est faite à 48h de pousse.

b) Protocole détaillé

Afin d'optimiser le protocole de réalisation de l'aromatogramme, les paramètres suivants ont été considérés : la taille de l'inoculum fongique, le volume d'HE déposé sur le disque ainsi que la taille du disque et le temps d'incubation avant la première lecture. Pour travailler sur ces différentes conditions, nous nous sommes appuyés sur des articles de la littérature, tels que ceux de De Oliveira Pereira *et al.*[35], El Amri *et al.*[36], Esper *et al.* [37] et Felsociova *et al.*[38]. En effet, De Oliveira Pereira *et al.* ont évalué par cette méthode l'effet antifongique de l'HE de Citronnelle sur des souches de *Trichophyton rubrum*. Esper *et al.* mettent aussi cette technique à profit pour évaluer le potentiel antifongique de L'HE d'Agérate et d'Origan sur des souches d'*Aspergillus flavus*. Felsociova *et al.* testent 15 HE différentes par ce procédé sur des souches de *Penicillium* tandis que El amri *et al.* utilisent cette technique pour évaluer le potentiel antibactérien des HE.

(1) Taille de l'inoculum fongique

Lors d'un travail préliminaire réalisé par un étudiant de Master I, et s'appuyant sur les données de la littérature, plus particulièrement sur la publication de Felsociova *et al.*[38], deux boîtes de Sabouraud ont étéensemencées, avec respectivement, 100 μ l et 200 μ l d'une suspension fongique de *N. dimidiatum* quantifiée à 0.5 Mac Farland (utilisation de la souche CBS 125615). Sur chacune des deux boîtes un disque de 6 mm de diamètre a été imprégné de 20 μ l d'HE pure de Géranium. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 3 jours. Le temps d'incubation de la culture permettant une lecture optimale était de deux jours : en effet à 24h la pousse était trop légère pour observer un halot alors qu'au-delà de 3 jours, la boîte était envahie par le champignon, ce qui ne permettait plus de déterminer la présence d'un halot.

Afin d'établir un parallèle entre le protocole de microdilution en plaque (détaillé plus loin) et celui des aromagrammes, une taille d'inoculum fongique identique aux recommandations du CLSI a également été testée dans ce travail de Master I : ainsi, pour ensemercer l'aromatogramme, un volume de 100 µl d'un inoculum à 0.5Mc Farland a été dilué 50 fois dans du RPMI. Ceci a été réalisé en parallèle de l'ensemencement de 100 µl de la suspension pure. Les conditions de dépôt de l'HE restant identiques à ce qui a été décrit précédemment.

Dans ce travail de thèse, de manière complémentaire aux tests réalisés lors du travail de Master I pour la détermination de la taille de l'inoculum fongique, des disques de diamètre différents et plusieurs volumes d'HE ont été évalués.

(2) Disques et inoculum d'HE

Lors de cette étape, des disques de 6 mm et de 9 mm de diamètre ainsi que des volumes de 10 µl et de 20 µl d'HE ont été testés avec les HE de Géranium, Litsée citronné, Niaouli, Tea tree et Thym suivant les mêmes conditions que celles détaillées précédemment, avec deux souches de *N. dimidiatum* (souches CBS 125618 et 125616). La lecture a été faite après deux jours de croissance. En effet, au-delà de cette durée d'incubation, les boîtes étaient envahies par le mycélium et la lecture devenait ininterprétable. Le protocole du test est détaillé dans l'annexe 1.

Après ces tests, les conditions adéquates étant définies pour réaliser les aromagrammes, les 20 HE sélectionnées dans cette étude ont été testées sur la souche *N. dimidiatum* CBS 125618, en triplicat. L'objectif de ce test était de déterminer les HE les plus actives sur *N. dimidiatum* afin de tester par la suite l'ensemble des souches de notre collection. Un témoin a aussi été inclus avec l'utilisation en parallèle d'une souche d'*A. fumigatus*. Ceci permet d'observer si l'HE se comporte de la même façon quel que soit le champignon ou s'il y a une différence d'activité suivant les champignons testés.

2. Microdilution en plaque

a) Principe

Le principe de l'évaluation de l'activité d'antifongique sur des moisissures par microdilution en plaque est décrit dans les méthodes référencées sous le code M38-A2 par le CLSI. Globalement, il s'agit de déposer dans les cupules d'une plaque, pour un même volume, des concentrations décroissantes d'un ou plusieurs antifongiques. Un inoculum fongique, de taille définie, est ensuite ajouté dans chaque cupule et la plaque est incubée 48 à 72h avant lecture. Cette technique permet de déterminer la plus petite concentration inhibant toute croissance visible d'un champignon à l'œil nu, et correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'antifongique pour la souche étudiée.

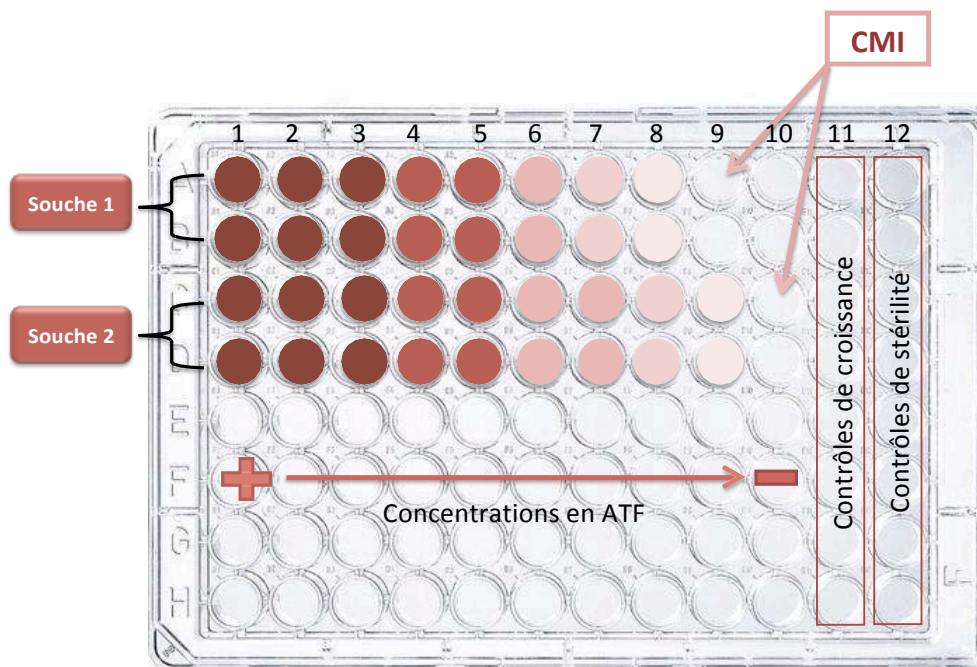


Figure 12 : Schéma d'une plaque de microdilution utilisée pour déterminer la CMI d'un antifongique vis-à-vis de deux souches fongiques : la première cupule pour laquelle aucune croissance fongique n'est visible correspond à cette valeur : ici le puits 9 pour la souche 1 et 10 pour la souche 2. (ATF : antifongique)

b) Protocole détaillé

Après avoir réalisé plusieurs manipulations préalables en suivant le protocole M38-A2 pour tester la terbinafine souvent prescrite en première intention dans les onychomycoses, sur les souches de *N. dimidiatum*, ce protocole a été adapté aux huiles essentielles.

(1) Microdilution en plaque : adaptation aux huiles essentielles

(a) *Tests de solubilisation*

Les HE n'étant pas miscibles dans l'eau, il n'est pas possible de les diluer directement dans le RPMI pour effectuer les gammes de concentration nécessaires. Le Tween, en tant qu'émulsifiant, a souvent été décrit dans la littérature pour réaliser ces dilutions.[39, 40] Nous avons donc réalisé une gamme de dilutions suivant le tableau ci-dessous, afin d'évaluer le volume de Tween 20 à utiliser pour obtenir une homogénéisation la plus stable possible.

Tableau V : Rapports entre les volumes de RPMI et de Tween 20 à utiliser pour solubiliser au mieux l'huile essentielle (D'après la publication d'Edris *et al.*, 2012)

<i>Rapport</i> <i>Vol RPMI : Vol Tween</i>	Vol RPMI (μl)	Vol Tween (μl)	Vol HE (μl)	Volume T (μl)
<i>9:1</i>	720	80	200	1000
<i>8:2</i>	640	160	200	1000
<i>7:3</i>	560	240	200	1000
<i>6:4</i>	480	320	200	1000

Les tests de solubilisation ont été réalisés pour les cinq HE suivantes : Géranium, Litsée citronné, Tea tree, Niaouli et Thym.

Dans un deuxième temps nous avons également testé la solubilisation de ces HE dans de l'éthanol [40] ainsi que dans du DMSO, conformément à ce qui est réalisé dans le protocole M38-A2, et même si ceci n'est pas aussi courant dans la littérature que l'utilisation du tween. Nous avons suivi les mêmes rapports de volumes que ceux réalisés avec le Tween.

(b) *Préparation des plaques*

A partir du protocole CLSI M38-A2, dix concentrations d'HE ont été testées couvrant une gamme allant de 12 500 µg/ml à 25 µg/ml. Les plaques ont été préparées suivant deux méthodologies différentes à partir des conditions préalablement définies. Dans l'un des deux cas, nous avons testé une même concentration d'HE par plaque pour toutes les souches sélectionnées alors que dans le second cas les différentes concentrations d'HE étaient testées en parallèle dans une même plaque pour une souche donnée. Les avantages de chaque protocole sont explicités ci-dessous.

▼ **Premier protocole : une gamme de 10 dilutions d'HE par plaque**

Ici, dix concentrations d'une HE sont testées simultanément sur une même plaque. Quatre souches sont donc testées par plaque avec toutes les dilutions.

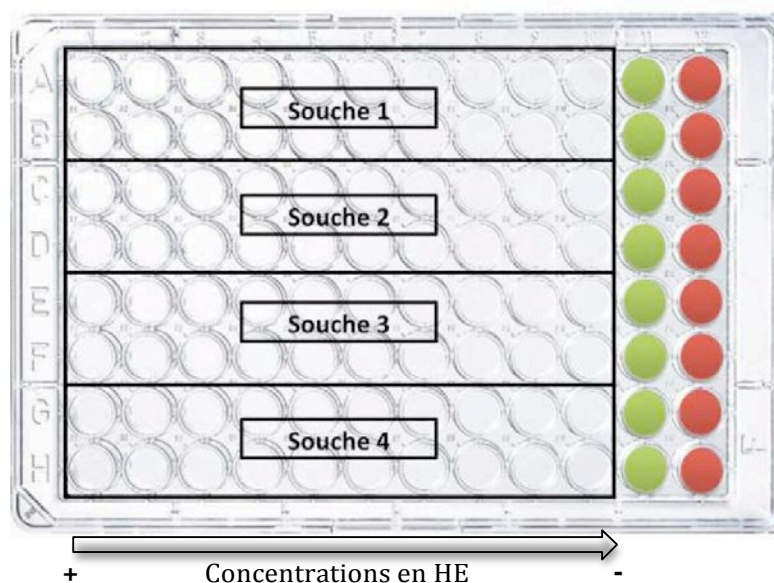


Figure 13 : Schéma de la plaque utilisée pour évaluer une gamme de 10 dilutions d'HE sur une même plaque. Les souches sont testées en doublon. Les puits en vert sont les contrôles de stérilité (RPMI + Tween ou DMSO selon le protocole), les puits en rouge sont les témoins de pousse (RPMI + Tween ou DMSO + souche).

Ce protocole présente l'avantage de pouvoir visualiser simultanément les résultats de l'évaluation de toute la gamme de concentrations de l'HE testée sur 4 souches par plaque. Ainsi, la CMI peut être facilement déterminée et surtout comparée d'une souche à l'autre.

▼ Deuxième protocole : une seule dilution de la gamme par plaque

Dans ce second protocole, une seule concentration d'une même HE est testée par plaque. Ceci permet de tester simultanément jusqu'à 20 souches sur la même plaque. Les HE étant volatiles, l'avantage principal de ce protocole réside dans la diminution du risque de mélange de plusieurs concentrations de l'HE testée dans une même plaque, qui pourrait fausser les résultats finaux.

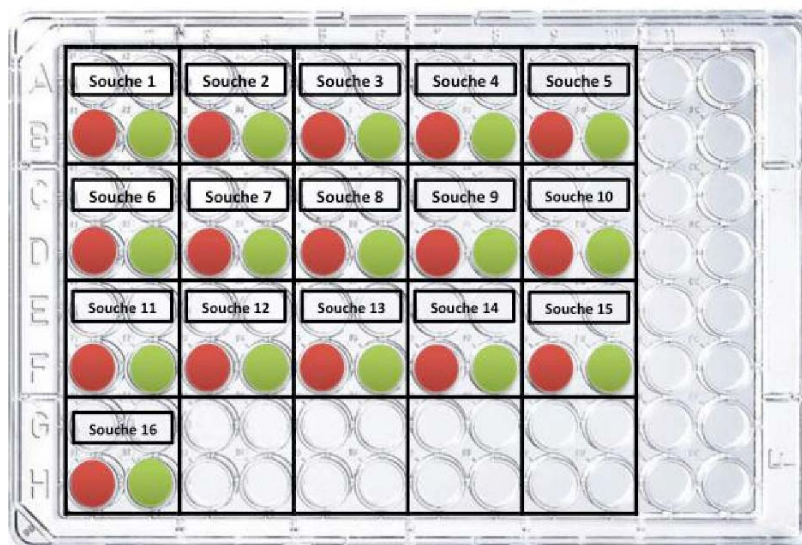


Figure 14 : Schéma de la plaque utilisée pour évaluer une même concentration d'HE par plaque sur plusieurs souches. Les souches sont toujours testées en doublon. Les puits en vert sont les contrôles de stérilité (RPMI + Tween ou DMSO selon le protocole), les puits en rouge sont les puits ensemencés (RPMI + souche + Tween ou DMSO)

(c) *Ensemencement des plaques*

Cette étape consiste avant tout à préparer un inoculum de mycélium fongique quantifié à l'aide d'un turbidimètre Mac Farland à partir de chacune des souches. Cet appareil apporte une indication sur la concentration de la suspension fongique, qui doit être en ce qui concerne les moisissures, équivalent à un indice de 0.5 Mc Farland, correspondant à 0.4×10^4 à 5×10^4 CFU/ml, d'après les données du document de référence CLSI M38-A2. Le détail du protocole est présenté en annexe 2.

Les plaques sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C et lues quotidiennement jusqu'à ce que la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) puisse être clairement déterminée.

III. Résultats-interprétations

A. Aromatogrammes

1. Taille de l'inoculum fongique

Lors du travail de Master I précédent, deux boîtes de gélose Sabouraud ont été ensemencées avec respectivement 100 μ l et 200 μ l d'une suspension fongique de concentration 0.5 Mac Farland de la souche *N. dimidiatum* CBS 125615.

Lors de ces tests, 20 μ l de l'HE de Géranium avaient été déposés sur un disque de 6 mm. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 16.

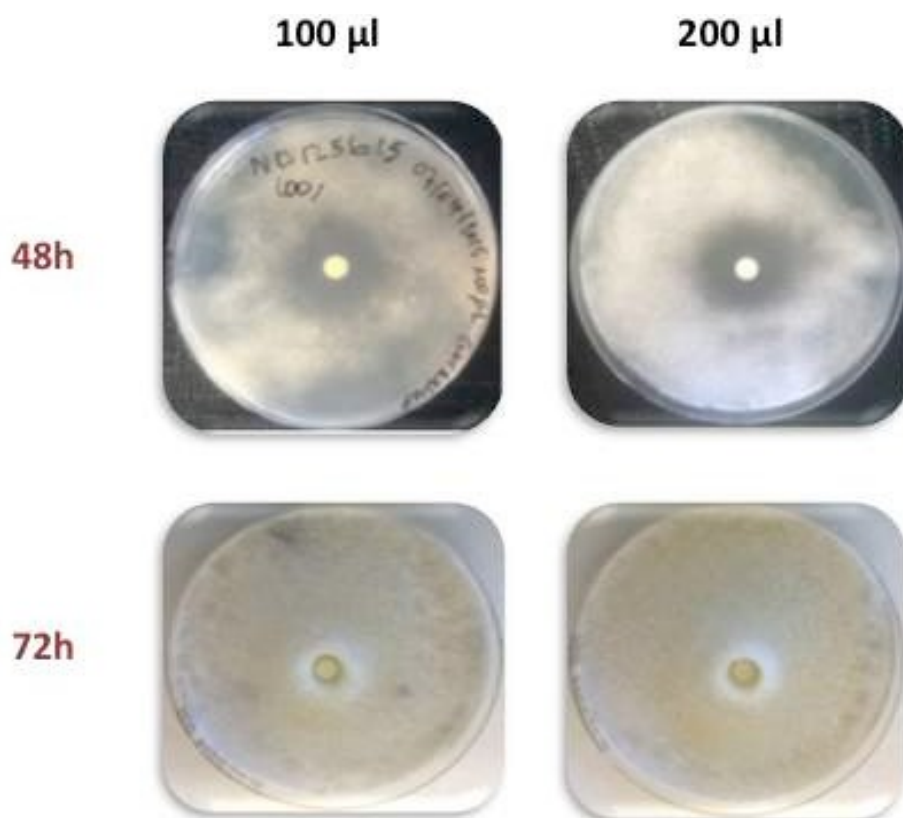


Figure 15 : Aromatogrammes réalisés avec la souche *N. dimidiatum* CBS 125615 et observés après 48 et 72 heures de croissance à 37°C, pour un inoculum fongique de 100 μ l et 200 μ l quantifié à 0.5 Mac Farland. La croissance du champignon à 24h étant trop peu développée, elle ne permet pas de déterminer un halot.

Les observations faites sur ces boîtes ont montré que les deux tailles d'inoculum permettent d'obtenir une croissance suffisante du champignon pour observer des diamètres d'inhibition dès 48h. A 72h, les deux boîtes sont envahies. Cette expérience, répétée plusieurs fois, n'a pas montré de différence claire entre les aspects obtenus en inoculant 100 ou 200 μl de la suspension fongique. Dans la littérature, un inoculum de 100 μl est le plus souvent préféré, notre choix s'est donc porté sur cette taille d'inoculum.[38]

2. Disques et volumes d'huiles essentielles

L'évaluation de disques de diamètres différents et de plusieurs volumes d'HE a été réalisée en parallèle afin d'obtenir la combinaison optimale permettant la meilleure diffusion des HE et l'obtention de halots d'inhibition clairement identifiables. Nous avons donc testé des disques de 6 mm et 9 mm et des volumes de 10 et 20 μL d'HE, conformément à ce qui est le plus fréquent dans la littérature [35, 36, 37, 38]

Les résultats obtenus pour des disques de 9 mm et un volume de 10 μL d'HE n'ont pas été concluants comme le présente la figure 16. Les diamètres d'inhibition ne sont pas clairement interprétables. En effet, les disques de 9 mm ne sont pas imprégnés de manière homogène ce qui limite la bonne diffusion de l'huile dans la gélose. La taille du disque de 9 mm est trop grande par rapport au volume d'HE déposé.



Figure 16 : Aromatogrammes obtenus avec une culture de *N. dimidiatum* (souche CBS 125616) pour un disque de 9 mm, avec un inoculum fongique de 100 μL à 0,5 MacF et un volume de 10 μL d'HE de Géranium (à gauche) et de Tea tree (à droite).

Le même résultat est obtenu pour un inoculum de 20 μL , et ce pour les mêmes raisons. Les diamètres ne sont toujours pas interprétables.

Avec les disques de 6 mm et des volumes d'HE de 20 μ L, nous constatons que le volume est trop important pour cette taille de disque, l'huile déborde autour du disque. Par contre, en utilisant un disque de 6 mm et un volume d'HE de 10 μ L, l'HE imprègne le disque de manière homogène, sans déborder sur la gélose. Dans ces conditions, nous obtenons des halots réguliers et clairement identifiables, comme le montrent ces illustrations sur les HE d'Origan, de Cannelier de ceylan et de Giroflier.



Figure 17 : Aromatogrammes réalisés avec *N. dimidiatum* en utilisant des disques de 6 mm, un inoculum fongique de 100 μ L à 0,5 Mac Farland et un volume de 10 μ L d'HE d'Origan, de Cannelier de ceylan et de Giroflier respectivement.

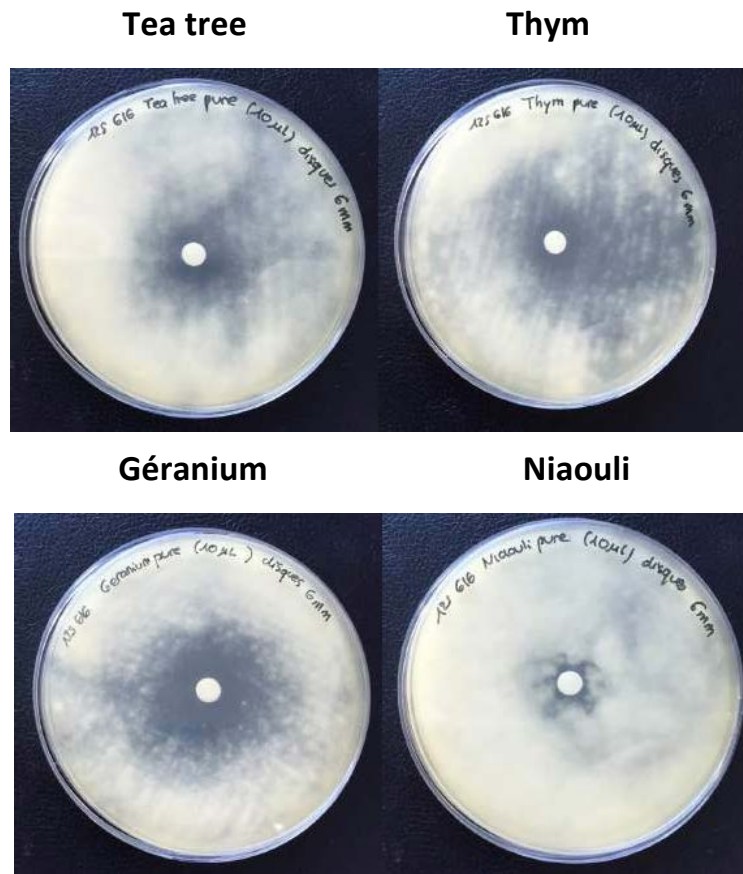
Au terme de ces tests, la taille de l'inoculum fongique que nous avons retenue est de **100 μ L**, celle des disques de **6 mm**. La quantité optimale d'HE à déposer sur le disque est de **10 μ L**. Les boîtes sont incubées 72h à 37°C, lues quotidiennement. Le temps d'incubation permettant une lecture optimale est en général de 48h.

3. Profils des aromatogrammes obtenus

a) *Essais préliminaires*

L'activité de 5 HE a été évaluée sur deux souches de *N. dimidiatum* CBS 125618 et 125616 dans les conditions expérimentales définies précédemment, c'est-à-dire pour un inoculum de 10 μ L d'HE et un disque de 6 mm. Les résultats ainsi obtenus avec les HE de Géranium, Thym, Niaouli, Tea tree et Litsée citronné sont illustrés par la figure 18, ci-dessous, avec la souche CBS 125616. En effet, les boîtes inoculées avec la souche CBS 125618 ont été rapidement envahies entre 24 et 48h et n'ont pas permis de mettre en évidence un halot.

(A)



(B)



Figure 18 : Aromatogrammes obtenus avec les HE de Tea tree, Thym, Géranium, Niaouli (A) et Litsée citronné (B) sur la souche *N. dimidiatum* CBS 125616 pour un inoculum d'HE de 10 μ L et des disques de 6 mm   48h (A) ou 72h (B) (aucune pousse n'est observée avec l'HE de litsée citronné à 48h).

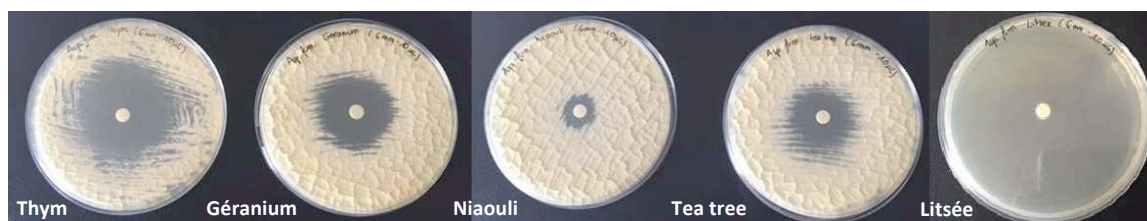
D'après les résultats obtenus, les aromatoigrammes diffèrent suivant la souche : la souche *N. dimidiatum* CBS 125618 envahit rapidement la boîte rendant toute détermination de halot impossible à 48h alors qu'à 24h la souche n'avait pas assez poussé.

Un problème méthodologique peut être suspecté pour la préparation des aromatoigrammes avec cette souche, peut-être au moment de la mesure de l'inoculum fongique. Ainsi, dans cette expérience et pour cette souche, à 48h l'équilibre entre l'inoculum fongique et la quantité d'HE en présence est tel que la concentration d'HE est trop faible pour inhiber la pousse.

Pour la souche CBS 125616, même si les halots ne sont pas de lecture aisée, on note une activité plus importante pour le Litsée citronné, le Géranium, le Tea tree et moins importante pour le Niaouli. L'aromatoigramme réalisé avec le Thym ne permet pas sur cette expérience de définir clairement la taille du halot, même si celle-ci semble se situer entre le Géranium et le Tea tree.

Un contrôle est également inclus dans notre expérience en utilisant la moisissure *Aspergillus fumigatus* dans les mêmes conditions que celles définies jusqu'à présent. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 19.

(A)



(B)

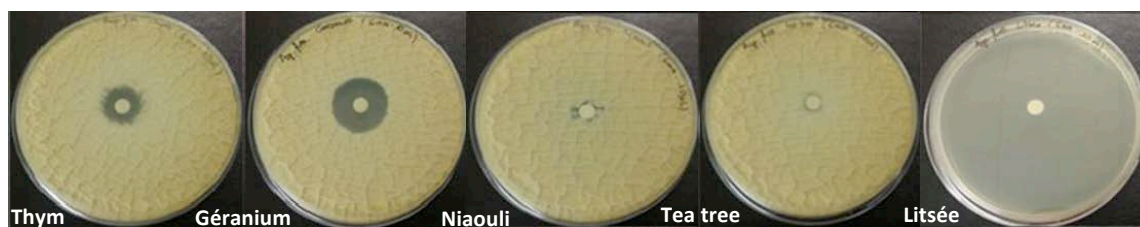


Figure 19 : Aromatoigrammes obtenus avec les HE de Thym, Géranium, Niaouli, Tea tree et Litsée citronné (inoculum 10 µL, disques 6 mm) sur une souche d'*Aspergillus fumigatus* (ref laboratoire : 21186669) pour une lecture à 48h (A) et 72h (B)

Avec ce champignon, la détermination des halots d'inhibition peut être faite à partir de 48h mais à 72h les boîtes sont déjà pratiquement toutes envahies, sauf pour le Litsée citronné. Il apparaît donc qu'en mettant en œuvre les mêmes conditions expérimentales, sur des moisissures différentes, les aromagrammes soient lisibles à des temps équivalents, avec une tendance voisine : on note par ordre décroissant en taille des halots, une activité plus importante du Litsée citronné, du Thym, du Géranium, du Tea tree puis du Niaouli, pour *A. fumigatus*. Cette même tendance est constatée pour *N. dimidiatum*, même si les halots sont nettement moins précis.

Pour compléter ces résultats préliminaires, l'ensemble des 20 HE sélectionnées dans cette étude et présentées dans la partie Matériels et Méthodes ont été testées, cette fois sur une seule souche, en triplicat (*Nd* CBS 125618).

b) Résultats des aromagrammes obtenus pour toutes les huiles essentielles

Le tableau ci-dessous présente les moyennes des halots mesurés dans le cas des aromagrammes réalisés avec une seule souche de *N. dimidiatum* testée en triplicat. Seules les valeurs mesurées de 24 à 72h ont été considérées ici. En effet, au-delà de 72h, les boîtes étant dans l'ensemble envahies, ne présentaient plus de halot déterminable.

Tableau VI : Moyennes des diamètres obtenus à partir des aromatogrammes réalisés pour la souche *N. dimidiatum* (CBS 125618)

	moyenne des mesures des halots (mm)		
	24h	48h	72h
Bois de rose	Trop léger		
Camomille	Trop léger		
Laurier noble	Trop léger		
Sauge	Trop léger		
Niaouli	11		
Ravintsara	13		
Bergamote	15	0	0
Géranium	16		
Lavande aspic	21		
Tea tree	20		
Thym	20		
Eucalyptus radié	34		
Palmarosa	28	16	0
Eucalyptus citronné		17	
Litsée citronné	85	46	14
Lemongrass		54	21
Cannelier de ceylan	40	34	24
Giroflier	40	33	26
Sarriette	85	59	50
Origan	60	54	52

85 : absence de pousse

0 : gélose envahie

En illustration de cette expérience, nous présentons ci-dessous les photos des aromatogrammes obtenus pour le Giroflier et l'Origan à J3.

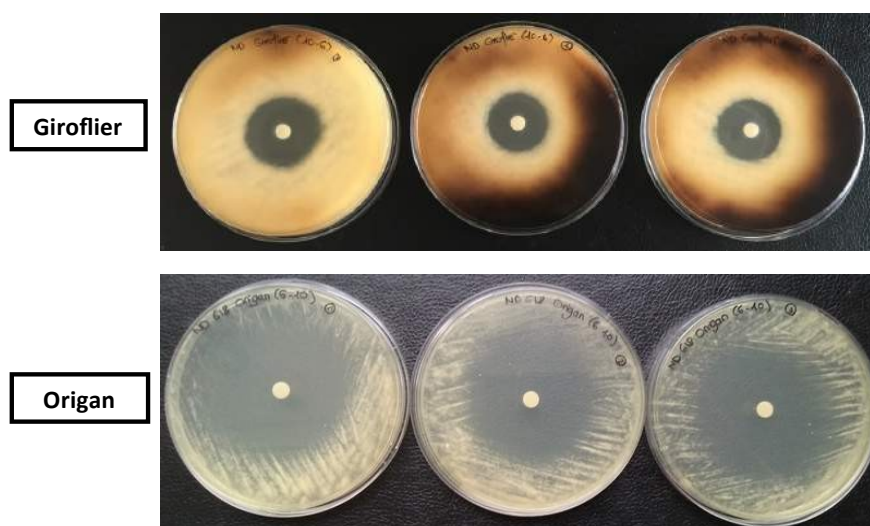


Figure 20 : Aromatogrammes à J3 pour l'HE de Giroflier et Origan

Le tableau ci-dessous présente les moyennes des halots mesurés dans le cas des aromatoigrammes réalisés avec *A. fumigatus* de 24 à 72h.

Tableau VII : Moyennes des diamètres obtenus à partir des aromatoigrammes pour *A. fumigatus* (souche de référence 21186669)

	moyenne des mesures des halots (mm)		
	24h	48h	72h
Thym	Trop léger		
Sauge	10		
Camomille	11		
Ravintsara	12		
Bergamote	13		
Niaouli	13	0	0
Lavande aspic	20		
Eucalyptus radié	21		
Laurier noble	21		
Tea tree	36		
Eucalyptus citronné	85		
Bois de rose	Trop léger	12	0
Géranium	36	17	
Palmarosa	42	30	21
Giroflie	35	33	32
Cannelier de ceylan	40	34	33
Litsée citronné	85	85	51
Origan	75	75	75
Lemongrass	85	85	85
Sarriette	85	85	85

85 : absence de pousse

0 : gélose envahie

Les tableaux détaillés répertorient l'ensemble des valeurs obtenues pour les deux champignons se trouvent dans l'annexe 3. L'ensemble des lectures est illustré par les photos en annexe 4.

D'après les diamètres d'inhibition obtenus, les résultats sont assez proches pour les deux moisissures. Ainsi, nous observons fréquemment un envahissement des boîtes dès le 2^{ème} jour de lecture pour *N. dimidiatum*, en faveur d'une évaporation totale des HE entre 24h et 48h, permettant au champignon de reprendre une croissance quasi-normale. L'action de ces HE semble donc, dans ces conditions, transitoire et apparaîtrait ici plutôt comme fongistatique. Il est utile de noter que, malgré une croissance fongique trop faible pour être mesurée dans le

cas des HE de Camomille, Bois de rose, Saugé et Laurier noble, on pouvait déjà observer à 24h une pousse très étendue dans la gélose témoignant d'une faible action antifongique ou de conditions expérimentales inadéquates pour ces huiles.

Par ailleurs, parmi les HE semblant les plus actives, l'HE de Palmarosa et d'Eucalyptus citronné n'entraînent pas un envahissement aussi rapide des boîtes par les champignons, ce qui évoque soit qu'elles aient une activité plus puissante et plus rapide que les autres soit qu'elles soient moins volatiles. Toutefois, ce caractère plus ou moins volatile des HE est difficilement vérifiable dans la littérature. Malgré une pousse légère qui rend les mesures des diamètres d'inhibition difficiles, l'HE de Litsée citronné, montre à nouveau, comme précédemment, une action antifongique intéressante. Le lemongrass se démarque lui aussi, tant pour *N. dimidiatum* que *A. fumigatus* : les diamètres d'inhibition obtenus sont importants et supérieurs à 72h à ceux obtenus avec le Litsée citronné.

En parallèle, l'HE de Cannelier de ceylan et de Giroflier sont caractérisées par leurs diamètres d'inhibition très précis et une absence d'envahissement des boîtes. Dans le cas d'*A. fumigatus*, l'effet semblerait plus clairement fongicide. De plus, les cultures conservées jusqu'à J7 n'ont pas montré d'évolution des diamètres d'inhibition. Les halots sont aussi très précis pour *N. dimidiatum*, mais les boîtes sont envahies au fur et à mesure du temps. L'action semble donc plutôt fongistatique pour ce champignon.

Enfin, les HE de Sarriette et d'Origan montrent des profils très intéressants autant sur *N. dimidiatum* que *A. fumigatus*. Les halots d'inhibition sont les plus importants sur l'ensemble des 20 HE testées sur *N. dimidiatum*. De plus, les boîtes ne sont toujours pas envahies à J5 ce qui serait en faveur d'une activité plutôt fongicide de ces HE. Il en est de même pour *A. fumigatus*.

En résumé, toutes les HE ne présentent pas la même action. Certaines semblent plutôt fongistatiques, car une fois entièrement évaporées, le champignon reprend une croissance normale. Ceci serait le cas pour 16 HE sur 20 testées sur *N. dimidiatum*. Au contraire, d'autres HE apparaissent comme fongicides, telles les HE de Cannelier de ceylan, Giroflier, Lemongrass, Origan et Sarriette sur la souche d'*A. fumigatus* d'une part et de Sarriette et d'Origan pour *N. dimidiatum* d'autre part. Aucune croissance du champignon testé ne reprend, celui-ci semble donc mort.

Suite à ce screening, nous avons donc sélectionné en priorité les 4 HE de Sarriette, Origan, Giroflier et Litsée citronné pour étudier la sensibilité des 15 souches de *Neoscytalidium dimidiatum* de notre collection.

c) Aromatogrammes des 4 HE sélectionnées sur nos souches de *N. dimidiatum*

Les résultats des tests obtenus pour les 4 HE sélectionnées : **Sarriette, Giroflier, Litsée citronné** et **Origan** sur les souches de *N. dimidiatum* de la collection sont exposés dans les tableaux ci-dessous. Les résultats sont illustrés dans l'annexe 5.

De manière générale, et comme attendu d'après les résultats précédents, la lecture des diamètres d'inhibition à 24h n'est pas optimale car certaines souches présentent une pousse encore trop faible voire toutes les souches dans le cas du Litsée citronné.

Tableau VIII : Diamètres d'inhibition obtenus sur 11 souches de *N. dimidiatum* avec l'HE de Sarriette

SARRIETTE	24h	48h	72h	120h
125608	85	60	50	45
125611		55	50	45
125616		85	45	40
125617		50	46	45
125619		50	50	43
125804	60	43	37	0
125614		48	40	
125618		48	40	25
125609		53	50	43
125615	55	42	33	0
125613	50	44	36	
moyenne	70	52,5	43,4	26

85 : absence de pousse

0 : gélose envahie

A 48h, 10 boîtes sur 11 présentent des profils lisibles et à 72h l'ensemble des 11 boîtes peut être lu. Le temps d'incubation des souches semble donc optimal ici entre 48 et 72h. L'observation à 120h (J5), montre que 4 des 11 boîtes sont envahies par le champignon. Cependant, en regardant uniquement les autres souches testées pour lesquelles les halots d'inhibition sont stables à J5, l'hypothèse d'une action fongicide pourrait aussi être avancée. Ceci met en évidence l'importance d'effectuer des études complémentaires avant de pouvoir conclure fiablement sur l'effet fongistatique ou fongicide de cette HE, et des autres HE d'une manière plus générale. D'autant que la littérature montre que cette action peut évoluer suivant la quantité d'HE en présence et que notre protocole nécessite une optimisation.

Tableau IX : Diamètres d'inhibition obtenus pour 11 souches de *N. dimidiatum* avec l'HE de Giroflier

GIROFLIER	24h	48h	72h	120h
125616	85	40	32	10
125617		40	31	15
125608	50	40	23	11
125611	45	35	26	12
125619	45	37	27	0
125613	43	35	20	0
125614	43	32	25	11
125804	43	30	22	0
125618	40	30	21	10
125615	40	30	20	0
125609	40	30	19	11
moyenne	50,8	34,5	24,2	7,3

85 : absence de pousse

0 : gélose envahie

Pour cette huile, la détermination du diamètre d'inhibition semble optimale à partir de 48h. Le diamètre moyen obtenu est de 34,5 mm. L'envahissement des boîtes débutant à 120 h reflète l'évaporation de l'HE et met en évidence l'activité plutôt fongistatique de cette dernière. Comme précédemment, l'interprétation pourrait être différente si on considère les boîtes présentant un halot de tailler stabilisée. Globalement, sur l'ensemble des souches, l'HE de Giroflier, malgré des diamètres d'inhibition très nets, présente une action antifongique moins importante que l'HE de Sarriette, quel que soit le jour de lecture auquel la comparaison des diamètres est réalisée.

Tableau X : Diamètres d'inhibition obtenus pour 14 souches de *N. dimidiatum* avec l'HE de Litsée citronné

LITSEE	24h	48h	72h	120h
125608	85	85	13	0
125616			35	
125617			35	
125618		40	0	
125804		40		
125745		40	11	
125619		40	10	
125615		33		
125609		30		
125611		30		
125614		30	0	
114859		30		
125613		28		
23357		25		
moyenne	85	44,4	11,6	0

85 : absence de pousse

0 : gélose envahie

Avec cette huile, à 24 h la pousse est trop faible pour être mesurée et à 72 h, quasiment toutes les boîtes sont envahies. Cette HE est probablement beaucoup plus volatile que les 3 autres. Toutefois, à 48h, un diamètre d'inhibition compris entre 25 et 40 mm est observé pour 11 boîtes sur 14, traduisant une activité intéressante même si elle est inférieure à celle de la Sarriette et moins homogène entre les souches que le Giroflier. D'autre part, là aussi, l'effet semble plutôt fongistatique puisque la croissance reprend plus ou moins rapidement.

Tableau XI : Diamètres d'inhibition obtenus pour 14 souches de *N. dimidiatum* avec l'HE d'Origan

ORIGAN	24h	48h	72h	120h
125616	85	85	50	40
125608		50	55	50
114859		50	55	50
125617		45	45	30
125745	70	55	50	45
23357	60	50	47	30
125611	55	50	50	40
125614	55	47	45	20
125619	53	48	48	24
125618	52	45	40	15
125609	52	45	40	12
125613	52	45	40	7
125615	50	44	40	0
125804	50	45	40	
moyenne	63,5	50,3	46,1	25,9

85 : absence de pousse

0 : gélose envahie

La lecture des diamètres d'inhibition de l'Origan semble optimale à partir de 48h et relativement stable à 72h. A 48h, le diamètre moyen est de 50 mm et à 72h de 46 mm. La stabilité des diamètres semble traduire une activité plutôt fongicide de l'huile. Toutefois, là encore pour deux boîtes, la croissance reprend à 120h. Les conclusions sur l'activité fongicide ou fongistatique sont donc là encore délicates à émettre. Le diamètre moyen à 72 h est proche de celui de la Sarriette.

En conclusion, d'après les résultats obtenus et pour une lecture à 48h, la plus active des quatre HE que nous avons testées est la Sarriette suivie de l'Origan puis du Giroflier et du Litsée citronné. En considérant une lecture à 72h, l'activité de l'Origan et de la Sarriette sont voisines. D'autre part, les différences parfois observées entre certaines souches pour une même huile testée et donc dans les mêmes conditions tendent à conclure quant à la nécessité de standardiser d'avantage notre procédé expérimental. Enfin, il serait intéressant de répéter ces tests et de les élargir à d'autres HE dont les résultats initiaux sont prometteurs, comme l'HE de Cannelier de ceylan par exemple.

Ces premiers résultats nous permettent donc de sélectionner également les deux HE que nous testerons dans la deuxième méthode d'évaluation, le procédé par microdilution en plaques.

B. Microdilution en plaques

L'étape préalable à ce protocole est celui de l'optimisation de la solubilisation des HE, non miscibles dans l'eau. Le Tween étant beaucoup utilisé dans la littérature, nos premiers essais ont été réalisés avec cet émulsifiant.

a) Tests de solubilisation des HE dans le Tween-RPMI

Ce test a été réalisé avec les HE suivantes : Thym, Géranium, Litsée citronné, Niaouli et Cyprès. Les résultats sont illustrés par la figure 21. Le rapport optimal pour l'ensemble des huiles est le rapport 6-4, c'est à dire 6 volumes de RPMI (480 μ l) pour 4 volumes de Tween (320 μ l). Cependant, après réalisation de plusieurs plaques, l'utilisation du Tween n'apparaît pas appropriée. En effet, ce dernier ne permet pas d'obtenir une solubilisation parfaite avec toutes les HE. Après un bref laps de temps, les solutions se divisent à nouveau en deux phases non miscibles. De plus, le Tween étant un émulsifiant, il mousse. Ceci pose de gros problèmes de reproductibilité sur nos volumes de manipulation et nous empêche une bonne standardisation de la méthode en plaques. Il semblerait aussi que ce dernier puisse avoir une activité antimicrobienne intrinsèque, ce qui fausserait nos résultats. [41]

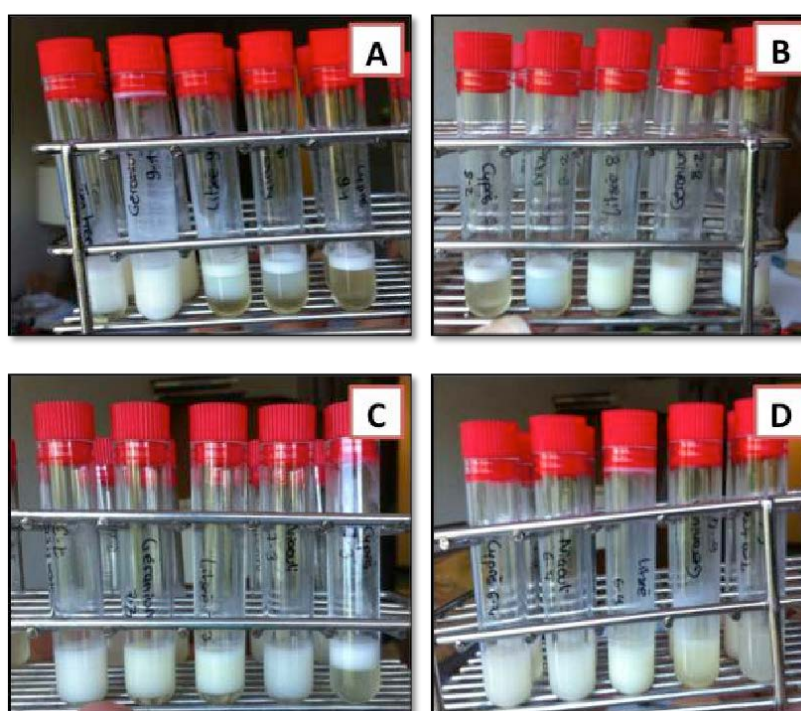


Figure 21 : Illustration des tests de solubilisation des HE (de gauche à droite Tea tree, Géranium, Litsée citronné, Niaouli et Cyprès) au Tween 20. Rapports 9-1 (A), 8-2 (B), 7-3 (C) et 6-4 (D).

De manière à solubiliser les HE dans un autre agent que le Tween, des tests ont été réalisés en utilisant le DMSO, tel que ce qui est décrit dans les protocoles CLSI avec les antifongiques. Après les résultats obtenus grâce aux aromagrammes, notre choix s'est porté sur les deux HE les plus actives qu'étaient la Sarriette et l'Origan. Cependant, nous avons rencontré des difficultés à solubiliser cette dernière avec le DMSO. Nous l'avons donc sortie de l'étude et remplacée par l'HE de Giroflier, également décrite dans la littérature comme étant plus facilement émulsionnable. [40]

Les conditions optimales ont ainsi été définies avec une dilution au $\frac{1}{4}$ de l'HE dans le DMSO, soit 1 volume d'HE pour 3 volumes de DMSO. Aucun effet moussant ni de réapparition de deux phases non miscibles n'ayant été observé, nous avons donc retenu ces conditions pour la préparation des plaques de microdilution.

b) Détermination des CMI pour l'HE de Sarriette et de Giroflier

Des résultats préliminaires obtenus notamment avec le Tween 20 sur les premières HE testées (Thym, Niaouli, Tea tree, Litsée citronné et Géranium) ainsi que les travaux réalisés par un étudiant de Master I nous ont conduit à travailler en utilisant le protocole dans lequel nous testons une concentration par plaque. En effet, nos premiers résultats peu exploitables avec l'utilisation du Tween 20 (CMI très disparates pour une même HE, effet moussant) ainsi que l'hypothèse de la volatilité des HE dans le protocole utilisant toutes les concentrations d'une même HE sur une même plaque ont été les facteurs essentiels de ce choix.

Une fois le protocole choisi, nous avons réalisé un premier essai avec l'HE de Giroflier pour les souches CBS 125613 et 125618. La figure 22 présente l'aspect des puits d'une plaque quand la croissance a lieu ou est inhibée par une substance antifongique, permettant de faire cette lecture de CMI.

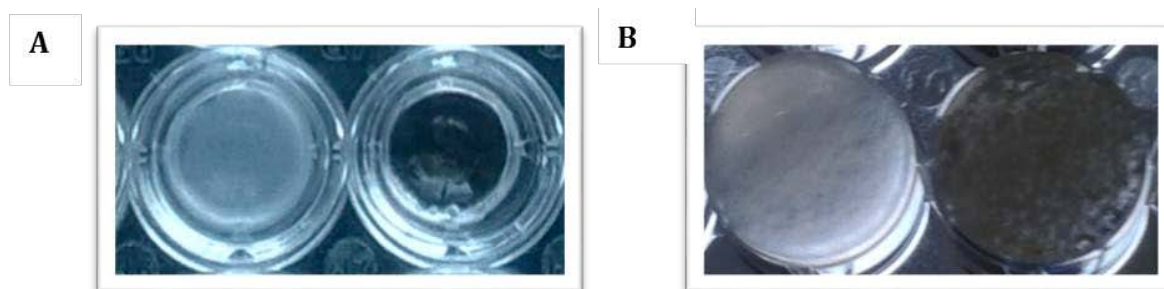


Figure 22 : Illustration de la croissance fongique en microplaques avec une pousse totale dans le puits de gauche et une absence de pousse dans celui de droite vu du dessus (A) et vu du dessous (B)

La CMI ainsi obtenue à 72h correspond au puits 6 soit une concentration de 800 µg/mL. Nous avons ensuite réitéré l'expérience avec les deux HE sélectionnées et ce sur toutes les souches de *N. dimidiatum*. Les premiers puits ne présentant pas de pousse et donc correspondant aux CMI obtenues pour ces deux HE sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Numéro des puits correspondant à la CMI de l'HE testée (respectivement Sarriette ou Giroflier), c'est à dire le premier puits pour lequel aucune croissance fongique n'est visible et ce pour l'ensemble des souches de *N. dimidiatum* de notre collection

SOUCHES		SARRIETTE		GIROFLIER		SOUCHES		SARRIETTE		GIROFLIER	
		PUITS N°		PUITS N°				PUITS N°		PUITS N°	
		J3	J5	J3	J5			J3	J5	J3	J5
125608	1	6	6	5	5	125618	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125609	1	6	6	5	5	125619	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125611	1	6	6	5	5	125804	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125613	1	6	6	5	5	6417	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125614	1	6	6	5	5	9702	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125615	1	6	6	5	5	13357	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125616	1	6	6	5	5	114859	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5
125617	1	6	6	5	5	125745	1	6	6	5	5
	2	6	6	5	5		2	6	6	5	5

Puits	% HE	En µg/mL
1	1,25	12500
2	0,625	6250
3	0,313	3130
4	0,16	1600
5	0,08	800
6	0,04	400
7	0,02	200
8	0,01	100
9	0,005	50
10	0,0025	25

Ainsi une CMI de **400 µg/mL** est déterminée pour l'HE de Sarriette et de **800 µg/mL** pour l'HE de Giroflier. Ce résultat étant en accord avec celui trouvé dans la première expérience précédente sur l'HE de Giroflier.

Dans cette expérience, nous n'avons pas observé de repousse fongique à distance dans les plaques. Ainsi les conditions liquides d'évaluation de l'activité antifongique des HE amènent à des conclusions différentes sur ce point particulier que les tests réalisés avec les aromagrammes. En effet, lors de ces derniers, l'évaporation des HE était favorisée et donc le contact entre ces substances et les champignons moins optimal et durable.

IV. Discussion-conclusion générale

Dans cette étude, notre premier objectif était de définir un protocole standard pour étudier l'activité *in vitro* des HE sur les champignons, à partir des données de la littérature. Nous avons donc utilisé la méthode de l'aromatogramme et celle des microdilutions en plaques. Alors que la première est plus largement décrite dans la littérature, la seconde est plus difficile à mettre en place mais présente l'avantage d'être comparable aux techniques de référence du CLSI pour évaluer l'activité de potentiels anti-microbiens.

Les premiers résultats obtenus avec les aromagrammes nous ont permis de sélectionner quatre HE présentant une activité antifongique plus intéressante que les autres : la Sarriette, l'Origan, le Giroflier et le Litsée citronné. Au terme des tests avec les aromagrammes, les deux HE parmi ces quatre présentant les plus grands disques d'inhibition ont été la Sarriette et l'Origan. Pour des raisons de solubilité, nous avons cependant choisi l'HE de Giroflier à la place de celle d'Origan pour les études en microplaques. Ces dernières ont abouti à des CMI de 400 µg/mL pour la Sarriette et 800 µg/mL pour le Giroflier. Il n'existe actuellement pas de cut-offs ni de CMI de référence concernant les HE dans la littérature, rendant l'exploitation de ces résultats pour le moins complexe. Toutefois, en se référant à la publication récente de août 2017 de Khan *et al.* les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur.[42]

Par ailleurs, en s'intéressant à la composition de ces huiles et notamment aux molécules actives qui la composent, les chémotypes, des caractéristiques communes ont pu être mises en évidence. D'après les fiches d'analyse du fabricant et par ordre de décroissance, les chémotypes majoritaires (> 5%) de ces HE sont :

- HE de Sarriette : **carvacrol**, **p-cymène**, γ -terpinènes
- HE d'Origan : **carvacrol**, thymol, γ -terpinène, **p-cymène**
- HE de Giroflier : **eugénol**, acétate d'eugényle
- HE de Litsée citronné : géranial, néral, limonène

La Sarriette et l'Origan sont donc les deux seules HE composées majoritairement de **carvacrol**, respectivement à 56,22% et 42,40%. Elles sont aussi composées toutes les deux de p-cymène. Les γ -terpinènes nous intéressent moins car ils sont également présents en forte proportion dans l'HE de Bergamote par exemple, dont les géloses sont très rapidement envahies au cours de nos expériences. Pour ce qui est du Giroflier, ce n'est pas le carvacrol mais cette fois-ci **l'eugénol** qui prédomine avec un pourcentage de 81,82 % de la composition totale.

Ces résultats rejoignent l'article de Janssen *et al.* présenté dans la partie « Huiles essentielles et champignons dans la littérature scientifique ». Malgré une publication ancienne de 1988, cet auteur montre notamment, après avoir testé 53 HE sur des dermatophytes, une supériorité *in vitro* de l'HE d'Origan et de Giroflier (la Sarriette n'étant pas testée dans ce panel).

Concernant ces composants majoritaires des HE de Sarriette et d'Origan d'une part et de Giroflier d'autre part, respectivement le carvacrol et l'eugénol, ces derniers sont le sujet de plusieurs études dans le domaine de la mycologie. Abbaszadeh *et al.* testent en 2014 le carvacrol, l'eugénol, le thymol et le menthol sur plusieurs souches de moisissures responsables de contamination alimentaire et le carvacrol semble être celui dont l'action antifongique est la plus intéressante. [43] Tartor *et al.* mettent en évidence dans une étude récente que le carvacrol serait une molécule prometteuse aussi bien en prophylaxie qu'en curatif pour traiter l'aspergillose aviaire. [44] Nobrega *et al.*, quant à eux, se penchent sur l'activité antifongique du carvacrol sur *Cryptococcus neoformans* [45] tandis qu'Ahmad *et al.* et Chami *et al.* s'intéressent à l'action anti-candidosique de ce dernier. [46, 47] Il ressort de ces deux publications une activité fongicide du carvacrol, de l'eugénol ainsi que du thymol vis-à-vis du genre *Candida*. Pour l'eugénol, il existe cependant moins d'études à ce jour que celles concernant le carvacrol, en mycologie. Cependant, des auteurs s'y sont intéressés : comme Ahmad *et al.* cités précédemment mais aussi Kahn *et al.* qui s'intéressent à des souches de *Candida albicans* présentant des résistances aux molécules conventionnelles. Ces études sont en faveur d'une action antifongique intéressante de l'eugénol vis-à-vis de ces souches résistantes et d'un intérêt potentiel pour une utilisation en association aux molécules déjà sur le marché. [48] Par ailleurs, parmi les arguments en faveur du potentiel antifongique de l'eugénol, nous pouvons citer nos premiers résultats avec l'HE de Cannelle, comparables à ceux de l'HE de Giroflier dont le composant majoritaire de ces deux HE est l'eugénol.

L'HE de Thym se démarque également dans l'article de Janssen par son action *in vitro*. Pourtant ça n'a pas été le cas dans nos expériences. Il existe en effet plusieurs HE de Thym (Thym à linalol, Thym à thujanol, Thym à thymol, etc.) dont la composition en chémotypes varie (présence ou absence de certains chémotypes, concentrations variables en carvacrol par exemple, etc.). Or, dans cet article, il n'est pas précisé de quel type de thym il s'agit. Le linalol présent en majorité dans l'HE de Thym que nous avons utilisée ne semble pas présenter une action antifongique très intéressante. Janssen utilisait donc probablement une HE de composition différente. Ceci montre donc bien l'importance de la composition d'une HE et les différences d'action que cela peut engendrer. Des investigations supplémentaires seraient intéressantes afin de consolider ces arguments.

La recherche ne se limitant cependant pas au seul domaine de la mycologie, ces chémotypes intéressent aussi les chercheurs en virologie. L'article très récent de Sharifi-Rad *et al.* se penche sur l'action du thymol, du carvacrol, du p-cymène et de deux HE sur le virus HSV1. Ils mettent ainsi en évidence une activité virucide dose dépendante de ces composés. [49]

Ceci ouvre donc une voie de recherche intéressante qui pourrait conduire à isoler ces chémotypes comme principes actifs afin de développer de nouvelles molécules antifongiques, voire de manière plus générale, antimicrobiennes. Ceci permettrait de s'affranchir des effets indésirables des HE tout en sélectionnant l'action recherchée en fonction du choix du chémotype (par exemple, l'effet antifongique ou antibactérien, antiviral, etc.). Ces nouvelles molécules pourraient aussi être intéressantes dans le cadre d'associations de molécules comme cela a déjà été étudié *in vitro* avec le kétoconazole vis-à-vis de *Trichophyton* spp. [50]

Tout ceci nécessite des études complémentaires car d'autres questions se posent. Notamment celle de l'action de chaque chémotype. Est-elle due à la molécule seule ou s'agit-il d'un effet synergique de tous les chémotypes présents dans l'huile. La notion de mécanisme d'action entre aussi en jeu. Encore peu connu à ce jour, l'activité antifongique d'une huile essentielle varie logiquement lui aussi en fonction des chémotypes présents. Ainsi Freires *et al.* s'intéressent au mode d'action de l'HE de Coriandre sur le genre *Candida*. Une liaison du principe actif de cette HE à l'ergostérol entraînerait une modification de perméabilité membranaire causant des dommages de la membrane cellulaire et conduisant à une mort cellulaire. Il n'y aurait à priori pas de lien avec la voie de biosynthèse de la membrane cellulaire. Une action inhibitrice de l'adhérence du biofilm et une diminution de l'activité protéolytique de la levure entreraient aussi en jeu. [51] Pinto, quant à lui, décrit l'induction

d'un stress oxydatif par l'HE de *Ferulago capillaris* sur *Candida albicans* qui affecterait l'activité enzymatique et le potentiel membranaire mitochondrial. [52]

En parallèle des mécanismes d'action et de la composition des HE, des études complémentaires sont aussi nécessaires concernant la toxicité de ces composés. En effet, la coumarine, le safrol ou encore l'eugénol sont connus pour être génotoxiques. Et les composés phénoliques présentent une dermocausticité, facteur limitant pour une utilisation locale.

En revenant sur l'aspect plus technique de cette thèse, bien que nos résultats soient prometteurs, une meilleure standardisation de nos manipulations reste indéniablement nécessaire si nous souhaitons par la suite tester d'avantage d'HE, et aussi à une plus grande cadence afin d'établir des données statistiques. Une des étapes finales d'un tel travail étant d'aboutir à des études *in vivo*, après l'isolement des chémotypes spécifiquement intéressants. Pour améliorer notre protocole, nous avons noté au cours de ce travail différents points à optimiser. Premièrement, nous avons repiqué les souches de *Scytalidium* spp. un grand nombre de fois, nous ne sommes donc pas sûres qu'après chaque repiquage nous obtenions la même qualité ou quantité relative de spores - filaments. Ceci conduit à s'interroger sur la concentration fongique dans l'inoculum. Que contient exactement l'inoculum standardisé à 0.5 Mac Farland : plus de spores ou de filaments ? L'action d'une même HE pourrait en effet varier suivant que celle-ci est mise au contact de spores ou de filaments mycéliens. Pour étudier ceci, l'utilisation de filtres permettant de sélectionner et donc de séparer filaments et spores pourraient être envisagés.

Parmi les autres facteurs importants à prendre en compte se trouve la volatilité des HE. Il est difficile d'établir des diamètres sur les chromatogrammes pour certaines HE qui semblent très volatiles. Cette volatilité varie d'une HE à l'autre comme nous avons pu le constater aux différents temps de lecture. Cependant nous ne savons pas en combien de temps ces HE s'évaporent et donc combien de temps elles restent au contact des souches fongiques. Suivant ces caractéristiques qui restent à étudier, l'application clinique des HE nécessite donc impérativement l'élaboration de formes galéniques spécifiques. Des travaux récents proposent notamment l'incorporation de ces HE dans des nanocapsules ce qui correspondrait plus à une voie d'utilisation à visée systémique et non locale. [53] À l'échelle de nos tests, nous avons utilisé des films autocollants appliqués sur les microplaques pour pallier cet effet. C'est aussi pour cela que nous avons adopté le deuxième protocole lors de la préparation de ces microplaques, c'est à dire, une concentration d'HE par plaque. Malgré tout, l'absence d'air

peut aussi empêcher la bonne pousse du champignon. Il est donc difficile de trouver un compromis pour obtenir une bonne reproductibilité de nos protocoles.

Enfin, le choix des HE de notre étude est fondé sur la littérature scientifique mais aussi sur des sites internet vulgarisés. D'autres HE non testées seraient sûrement prometteuses telle que l'HE de Fenouil étudiée par Mamta Patra *et al.* en 2001. Cette dernière montre en effet une activité antifongique intéressante, notamment contre plusieurs dermatophytes dont *T. rubrum* mais aussi contre *Neoscytalidium dimidiatum*. [54]

Les HE commercialisées à la Cooper sont certainement plus adaptées aux tests que nous avons réalisés et il semblerait intéressant de reproduire certaines manipulations avec ces HE. Pour finir et d'après les résultats obtenus, la question de l'action fongicide ou fongistatique des huiles essentielles se pose. Dans l'article de Hammer *et al.* (2002), l'HE de Tea tree est définie comme fongistatique à une certaine concentration et fongicide à une autre, et le temps d'exposition à l'huile jouerait aussi un rôle prépondérant pour le développement de l'action fongicide.[4] D'autre part, l'action serait en effet différente suivant que l'HE est appliquée sur des spores ou des hyphes. Par conséquent, nos résultats représentent essentiellement une approche préliminaire, et ces études sont donc encore largement à compléter et affiner.

Pour conclure, les premières étapes d'un protocole visant à tester l'action antifongique des HE ont été mises en place dans ce travail de thèse. L'objectif à plus long terme étant de participer au développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour les infections mycosiques dues à des champignons résistants aux traitements conventionnels. De nombreux facteurs limitants sont entrés en jeu lors de nos tests et il serait nécessaire, par la suite, de développer un protocole mieux standardisé afin de pouvoir établir des données statistiques, et de tester d'avantage d'HE afin de pouvoir prétendre à conduire des tests *in vivo*. A terme, l'HE idéale à retenir ne sera peut-être pas la plus efficace mais répondra aussi à des critères physico-chimiques et toxicologiques adaptés à l'action thérapeutique recherchée et aux sites concernés (local, systémique, etc.). Ce domaine qui intéresse de plus en plus la recherche a ainsi conduit le laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Nancy à collaborer avec une société de biotechnologie (Septeos) à propos de l'évaluation de composés contenant un mélange de chémotypes à visées thérapeutiques. Ceci s'inscrit dans le cadre d'une thèse d'université sur l'action synergique de plusieurs chémotypes sur les moisissures et en particulier *Fusarium*.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole détaillé de la réalisation des aromatoigrammes

Matériel nécessaire :

- Boîtes de pétri : Sabouraud
- Disques de diffusion : *disques absorbants pour essais antibiotiques*
Reference FISHER : 11780096 – X1000 Disque Antibio 6 mm – prix 20.18 euros
- Mac Farland
- Ampoules de sérum physiologique
- Eau stérile
- Pipettes

Protocole :

1. Sous le PSM de mycologie.
2. Préparer une suspension fongique à 0.5 Mc Farland.
 - a. Casser l'ampoule de sérum physiologique dans le tube de culture.
 - b. Gratter la surface du mycélium légèrement avec une oese en plastique stérile sans fendre la gélose.
 - c. Avec une pastette stérile en plastique, recueillir la suspension fongique.
 - d. La remettre dans l'ampoule et mesurer la valeur Mac Farland.
 - e. Si besoin diluer avec quelques gouttes d'eau stérile.
 - f. Si la suspension n'est pas assez concentrée, la remettre dans le tube de culture et reprendre à partir de b.
3. Ensemencer 100 µl de cette suspension sur la boîte de Pétri.
4. Laisser sécher la boîte ouverte sous le PSM.
5. Déposer 20 µl d'HE sur le disque de 6mm en tenant ce dernier avec une pince stérile. Laissez quelques secondes à l'HE pour diffuser sur le disque puis le déposer sur la gélose.
6. Laisser diffuser l'HE et refermer la boîte.
7. Incuber les boîtes à 37°C.
8. Mesurer le diamètre d'inhibition (faire 3 mesures du diamètre et faire la moyenne) à 24h, 48h, 72h.

Contrôles

- Négatif : Préparer une boîte avec la suspension fongique et un disque non imprégné d'HE.
- Positif : Préparer une boîte avec la suspension fongique et un disque imprégné d'ATF (concentration à définir).

Annexe 2 : Protocole détaillé de la réalisation des microplaques d'huiles essentielles

1. REACTIFS ET MATERIEL

- Plaques : Fisher : 50 plaques 96 puits à fond en U NUNCLON Ref : 10344311 ; ancienne référence : W23932
- Huiles essentielles testées :
Giroflier, *Eugenia caryophyllus* (Bouton floral) Lot : OF15306(M)
Sarriette des montagnes, *Satureja montana* (sommité fleurie) Lot : OF16318(G)
- Solution de RPMI (Life technologies, France) reconstituée, tamponnée par du MOPS

Pour 1L :

- o Peser 10,4 g de RPMI puis diluer ce dernier dans 900 mL d'eau distillée
- o Ajouter 34,53 g de MOPS
- o Ajuster le pH à 7,0 puis compléter à 1L avec de l'eau distillée.

2. PREPARATION DE L'INOCULUM FONGIQUE

- **Souches testées sur une plaque** : 16 souches de *Neoscytalidium dimidiatum*

125608	125609	125611	125613	125614	125615	125616	125617
125618	125619	125804	06417	9702	13357	114589	125745

- a. Repiquer les souches sur milieu Malt, les cultiver durant 3 à 5 jours à 37°C
- b. Recouvrir les cultures de 5 mL de sérum physiologique et gratter la surface avec une oese.
- c. Laisser sédimenter les grosses particules 5 min à T°C ambiante.
- d. Récupérer le surnageant dans un tube stérile, vortexer.
- e. Quantifier la solution au Mac Farland. Densité désirée de l'inoculum : 0.5 Mac Farland
- f. Diluer la suspension au 1/50 dans le RPMI.
- g. Ensemencer 100µL de la suspension préparée par puits. Chaque souche est testée en doublon. En parallèle, ensemencer 10µL de la suspension sur boîte de Sabouraud incubée à 37°C pour vérifier le nombre de colonies vivantes par mL. Observation quotidienne de la croissance.

3. PREPARATION DES DILUTIONS D'ANTIFONGIQUES

En partant du principe que la solution d'HE est pure à 100% soit 100 g/100 mL

A partir de la solution mère à 100 g / 100 ml :

Diluer la solution pure au 1/4 : 250 µl Sol pure + 750 µl DMSO (Sigma, France) :

250 000 µg/ml

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
V solution précédente (µL)	200	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V DMSO (µl)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V final (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
V restant (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Concentration (µg/ml)	250 000	12 500	62 600	32 000	16 000	8 000	4 000	2 000	1 000	500

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
V T1 (µl)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
V RPMI (µl)	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360
V final (µl)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Concentration (µg/ml)	25 000	1 250	6 260	3 200	1 600	800	400	200	100	50

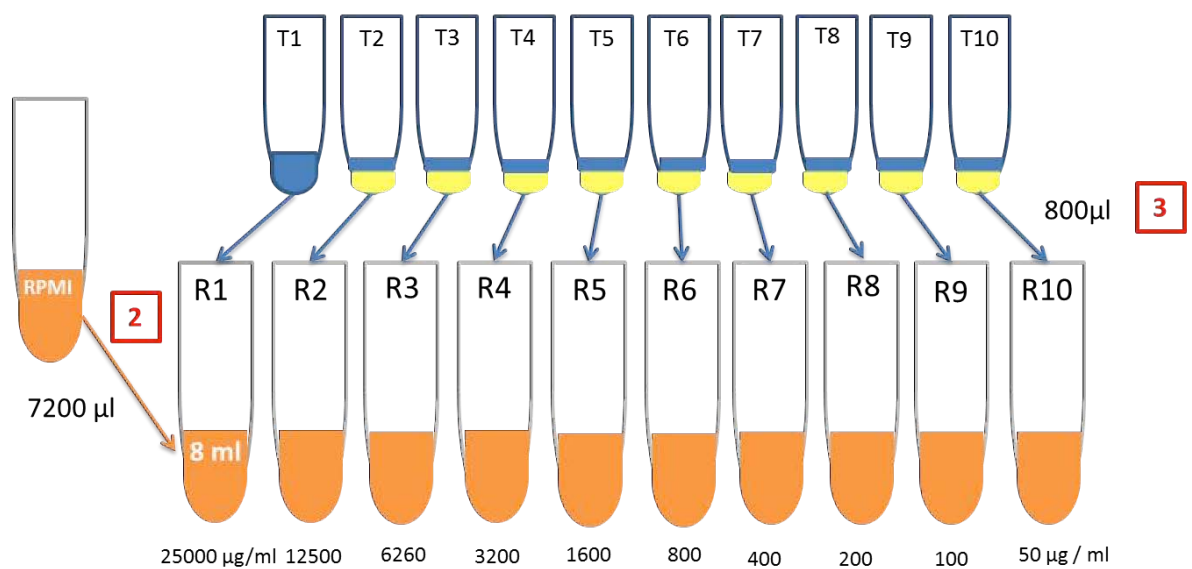
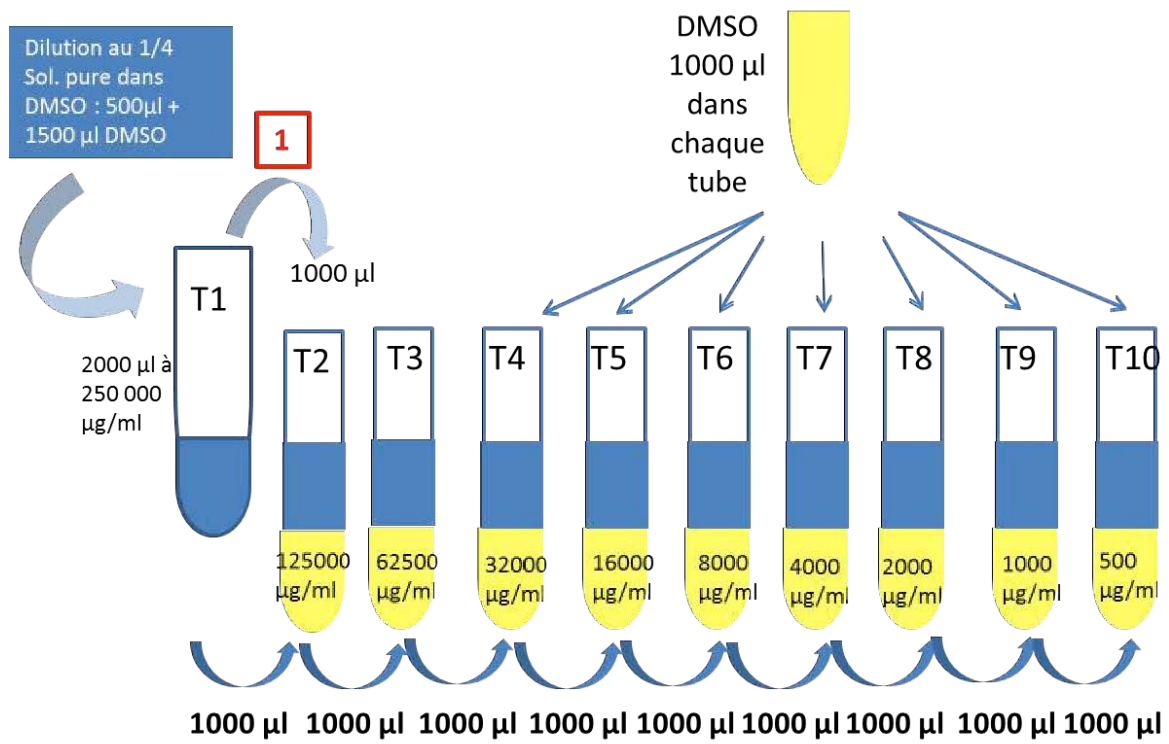
	cupu1	cupu2	cupu3	cupu4	cupu5	cupu6	cupu7	cupu8	cupu9	cupu10
V Ri µL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V inoculum (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V final (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentration (µg/ml)	12 500	625	3 130	1 600	800	400	200	100	50	25

Afin d'optimiser la préparation, les volumes sont recalculés pour pouvoir préparer le nombre de plaques adéquat. On prépare 500µL Sol pure + 1500µL DMSO puis :

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
V solution précédente (µL)	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
V DMSO (µl)	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
V final (µl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
V restant (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentration (µg/ml)	250 000	12 500	62 600	32 000	16 000	8 000	4 000	2 000	1 000	500

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
V T1 (µl)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
V RPMI (µl)	7200	7200	7200	7200	7200	7200	7200	7200	7200	7200
V final (µl)	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Concentration (µg/ml)	25 000	1 250	6 260	3 200	1 600	800	400	200	100	50

Ces étapes sont illustrées ci-dessous :

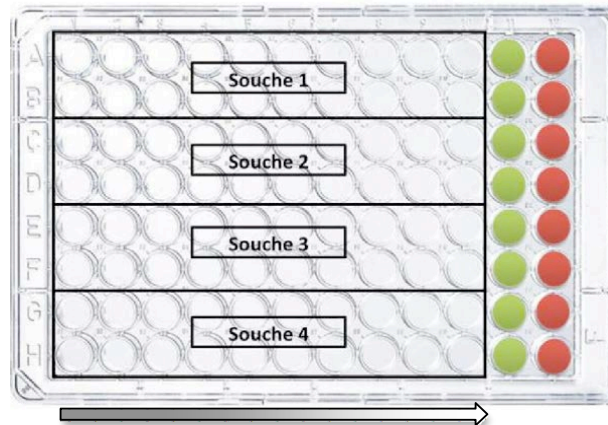


Avec une pipette multicanaux transférer 100µl de chaque dilution dans les puits correspondants de la plaque

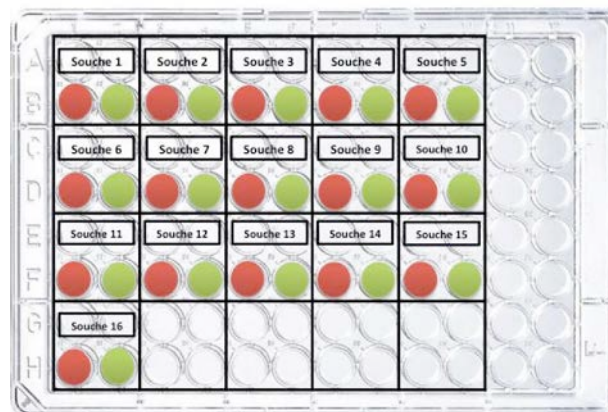
4. ENSEMENCEMENT ET INCUBATION

Les plaques sont ensemencées en fonction du protocole testé, soit une plaque par gamme de concentration (1), soit une plaque par dilution (2).

Protocole 1 :



Protocole 2 :



- Distribuer 100µl du témoin de stérilité RPMI + DMSO dans chaque puits de la colonne 11 dans le protocole 1 ou dans les puits colorés en verts dans le protocole 2.
- Avec une pipette multicanaux réglée sur 100µl, distribuer 100µl de l'inoculum final dans chaque puits des colonnes 1 à 10 et dans la colonne 12 pour les protocole 1 et dans les lignes A, C, E, G et les puits en rouge pour le protocole 2.
- Couvrir la plaque.
- Incuber à 37°C minimum 3 jours.

Les plaques sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C et lues quotidiennement jusqu'à ce que la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) puisse être clairement déterminée.

Annexe 3

Diamètres des halots d'inhibition obtenus à partir des aromatogrammes réalisés pour la souche *N. dimidiatum* (CBS 125618) :

Huiles essentielles		24h	48h	72h
Bois de rose	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0		
Camomille	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0		
Laurier noble	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0		
Sauge	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0		
Niaouli	1	11	0	0
	2	12		
	3	11		
	m	11,33333333		
Ravintsara	1	14	0	0
	2	12		
	3	13		
	m	13		
Bergamote	1	13	0	0
	2	18		
	3	13		
	m	14,66666667		
Géranium	1	15	0	0
	2	17		
	3	15		
	m	15,66666667		
Lavande aspic	1	23	0	0
	2	20		
	3	21		
	m	21,33333333		
Tea tree	1	20	0	0
	2	20		
	3	20		
	m	20		

Huiles essentielles		24h	48h	72h
Thym	1	20	0	0
	2	20		
	3	20		
	m	20	0	0
Eucalyptus radié	1	35	0	0
	2	32		
	3	34		
	m	33,66666667	0	0
Palmarosa	1	27	15	0
	2	28	16	
	3	30	16,5	
	m	28,33333333	15,83333333	0
Eucalyptus citronné	1	85	20	0
	2		15	
	3		15	
	m	85	16,66666667	0
Litsée citronné	1	85	40	10
	2		45	14
	3		53	18
	m	85	46	14
Lemongrass	1	85	54	20
	2		53	20
	3		54	23
	m	85	53,66666667	21
Cannelier de Ceylan	1	40	34	23
	2	40	34	24
	3	40	34	24
	m	40	34	23,66666667
Giroflier	1	40	33	27
	2	40	33	24
	3	40	34	26
	m	40	33,33333333	25,66666667
Sarriette	1	85	60	50
	2		60	50
	3		58	50
	m	85	59,33333333	50
Origan	1	60	55	55
	2	60	55	50
	3	60	53	50
	m	60	54,33333333	51,66666667

Diamètres des halots d'inhibition obtenus à partir des aromatoigrammes pour *A. fumigatus* (souche de référence 21186669) :

Huiles essentielles		24h	48h	72h
Bois de rose	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0	0	
Camomille	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0	0	
Laurier noble	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0	0	
Sauge	1	Pousse trop légère	0	0
	2			
	3			
	m	0	0	
Niaouli	1	11	0	0
	2	12		
	3	11		
	m	11,33333333	0	0
Ravintsara	1	14	0	0
	2	12		
	3	13		
	m	13	0	0
Bergamote	1	13	0	0
	2	18		
	3	13		
	m	14,66666667	0	0
Géranium	1	15	0	0
	2	17		
	3	15		
	m	15,66666667	0	0
Lavande aspic	1	23	0	0
	2	20		
	3	21		
	m	21,33333333	0	0
Tea tree	1	20	0	0
	2	20		
	3	20		
	m	20	0	0

Huiles essentielles		24h	48h	72h
Thym	1	20	0	0
	2	20		
	3	20		
	m	20	0	0
Eucalyptus radié	1	35	0	0
	2	32		
	3	34		
	m	33,66666667	0	0
Palmarosa	1	27	15	0
	2	28	16	
	3	30	16,5	
	m	28,33333333	15,83333333	0
Eucalyptus citronné	1	85	20	0
	2		15	
	3		15	
	m	85	16,66666667	0
Litsée citronné	1	85	40	10
	2		45	14
	3		53	18
	m	85	46	14
Lemongrass	1	85	54	20
	2		53	20
	3		54	23
	m	85	53,66666667	21
Cannelier de Ceylan	1	40	34	23
	2	40	34	24
	3	40	34	24
	m	40	34	23,66666667
Giroflier	1	40	33	27
	2	40	33	24
	3	40	34	26
	m	40	33,33333333	25,66666667
Sarriette	1	85	60	50
	2		60	50
	3		58	50
	m	85	59,33333333	50
Origan	1	60	55	55
	2	60	55	50
	3	60	53	50
	m	60	54,33333333	51,66666667

Annexe 4 :

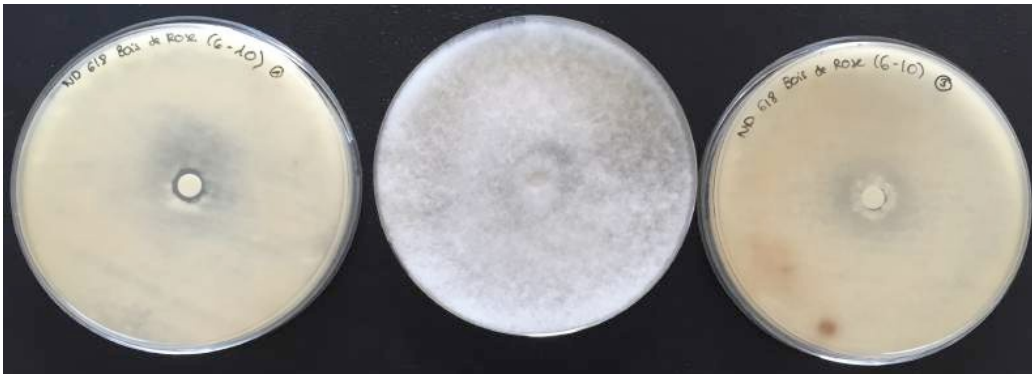
HE de Bois de Rose

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



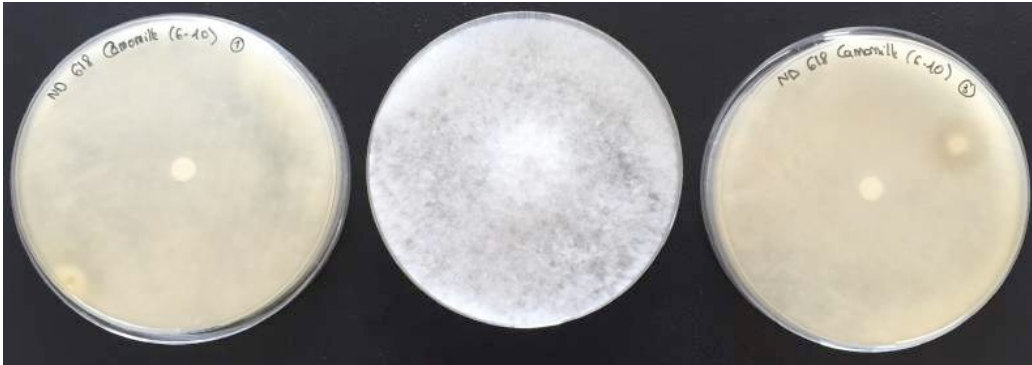
HE de Camomille

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :

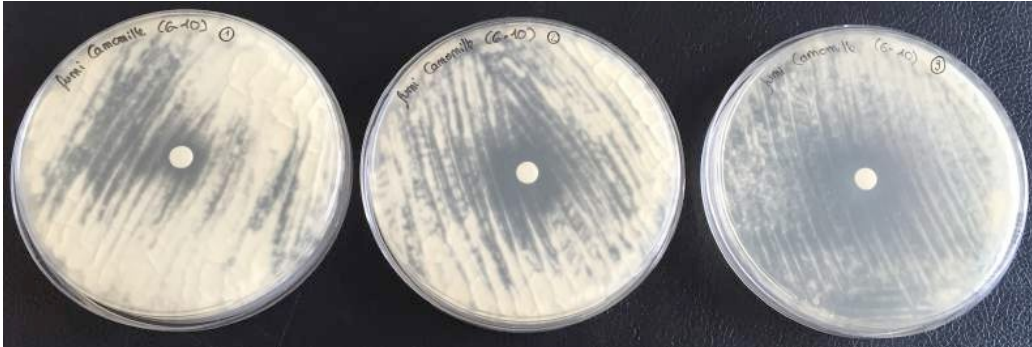


J2 :

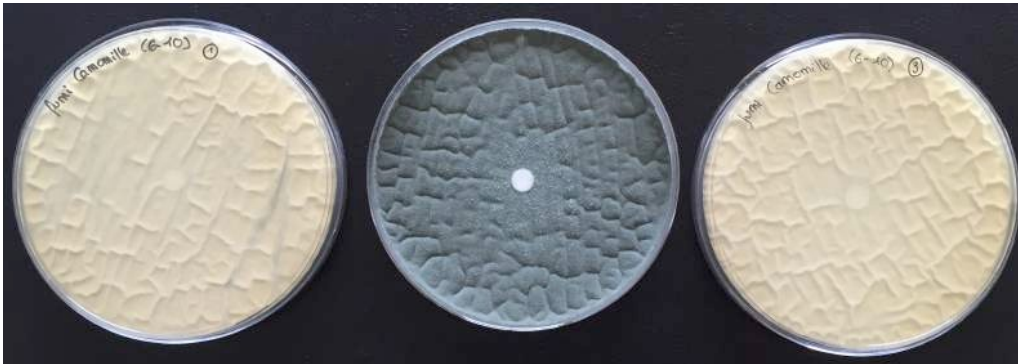


- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



HE de Laurier noble

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :

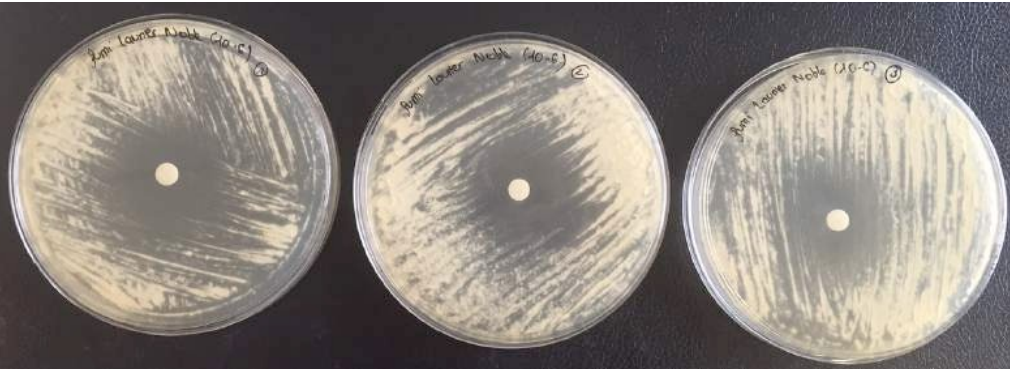


J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



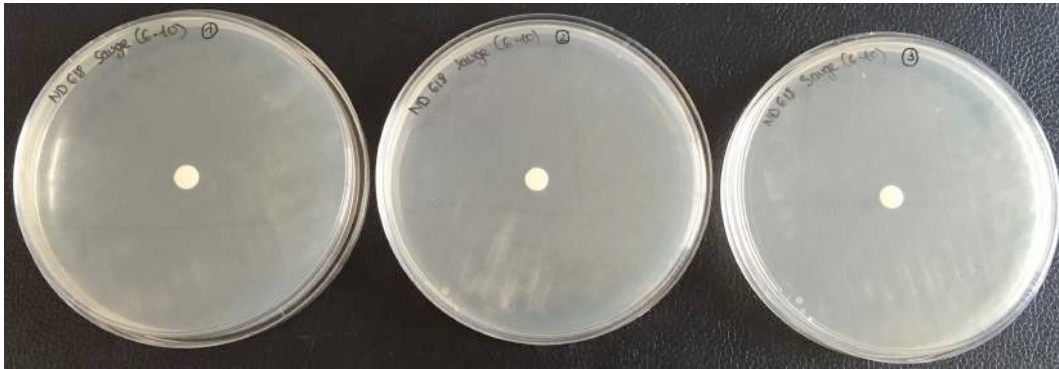
J2 :



HE de Sauge

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :

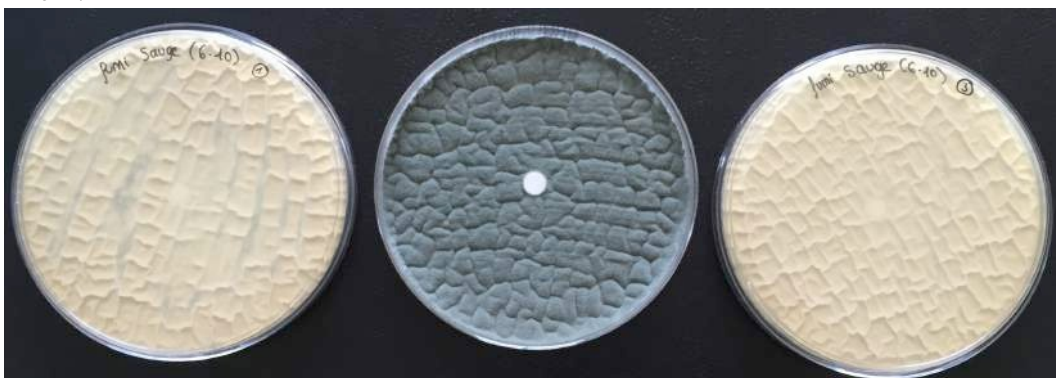


- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



HE de Niaouli

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



HE de Ravintsara

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



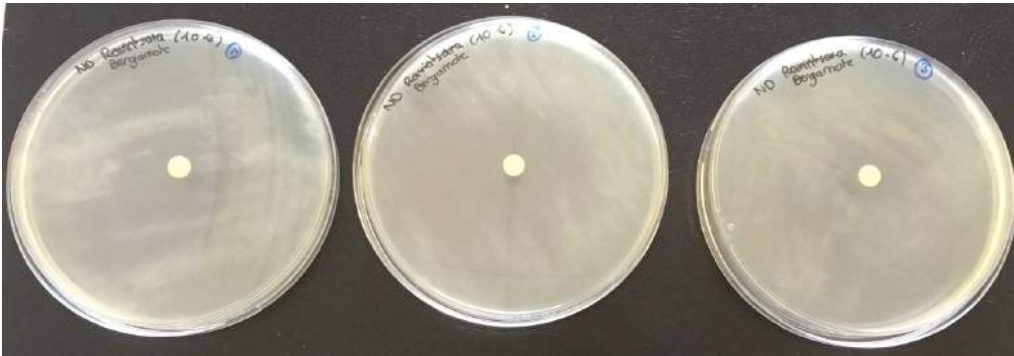
J2 :



HE de Bergamote

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



HE de Géranium :

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :

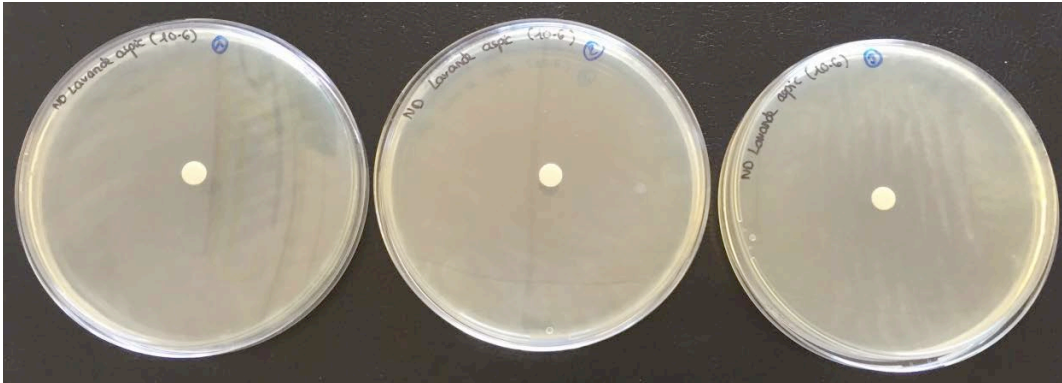


J2 :



HE de Lavande aspic

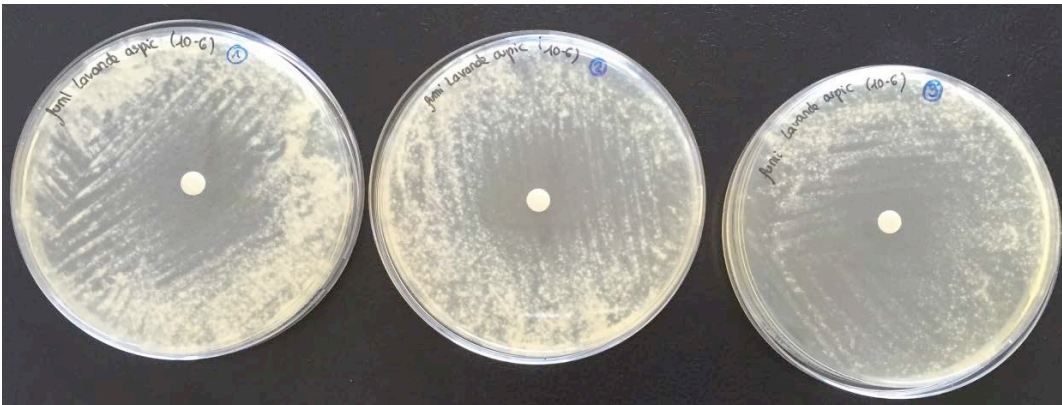
- *Neoscytalidium dimidiatum*
J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*
J1 :



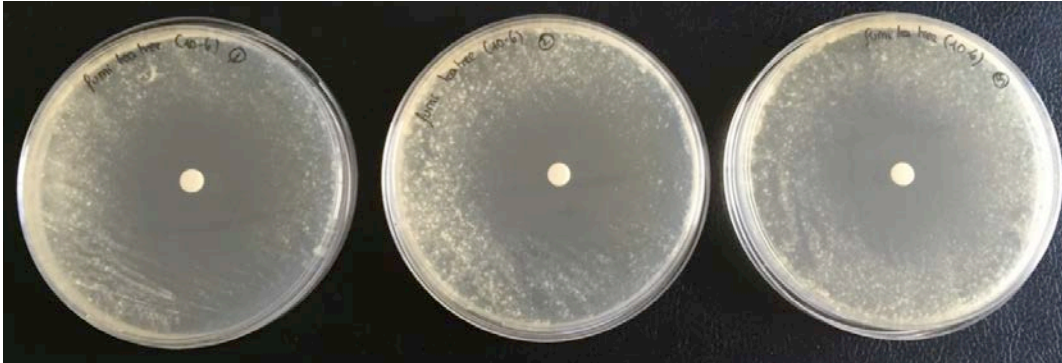
J2 :



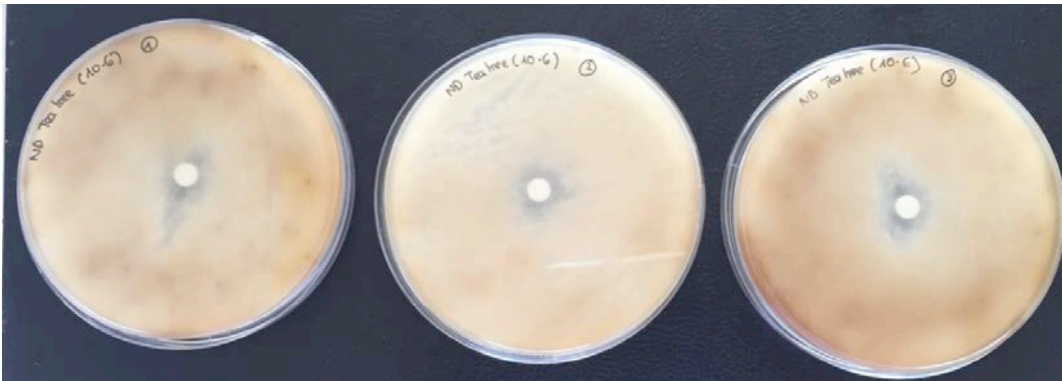
HE de Tea tree

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



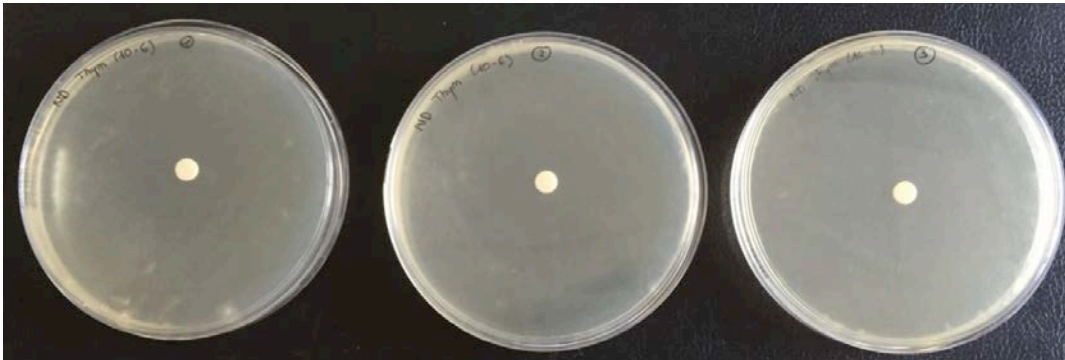
J2 :



HE de Thym

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :

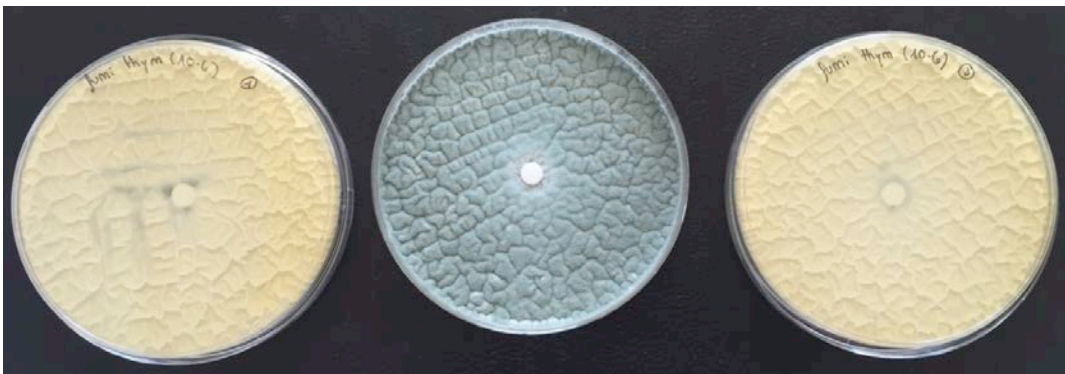


- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



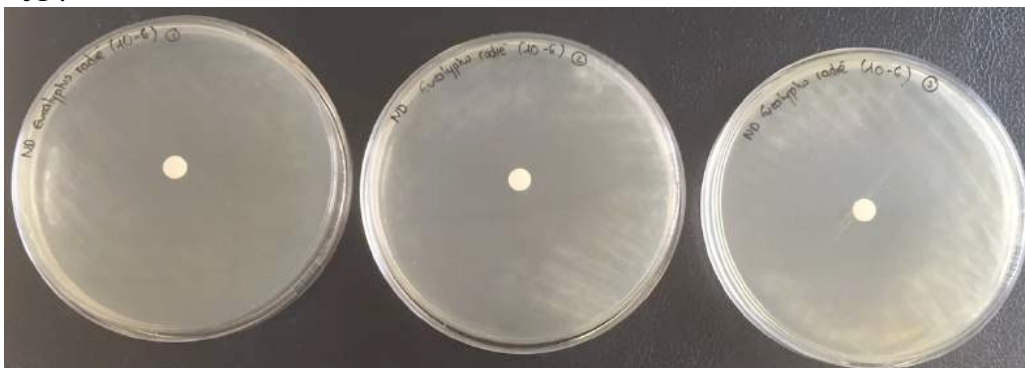
J2 :



HE d'Eucalyptus radié

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



HE de Palmarosa

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



J3 : Envahies

- *Aspergillus fumigatus*

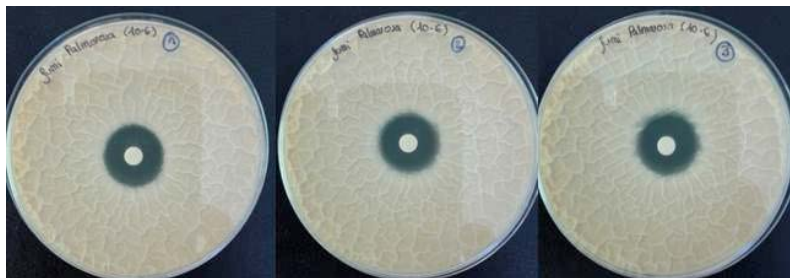
J1 :



J2 :



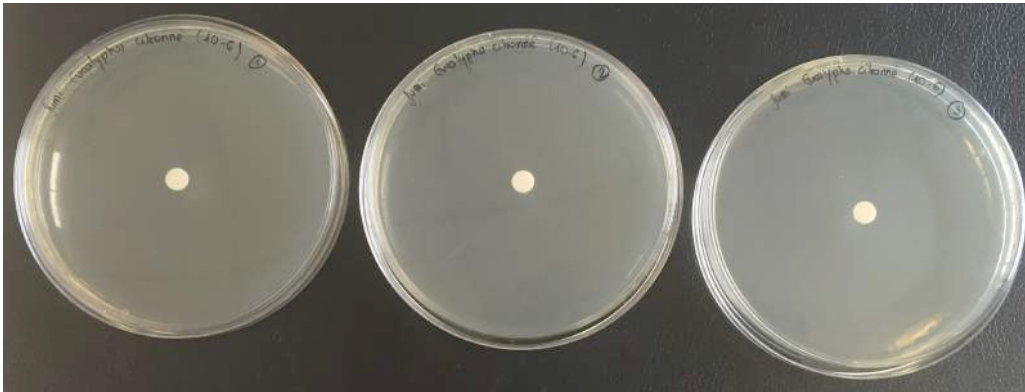
J3 :



HE d'Eucalyptus citronné

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



HE de Litsée citronné

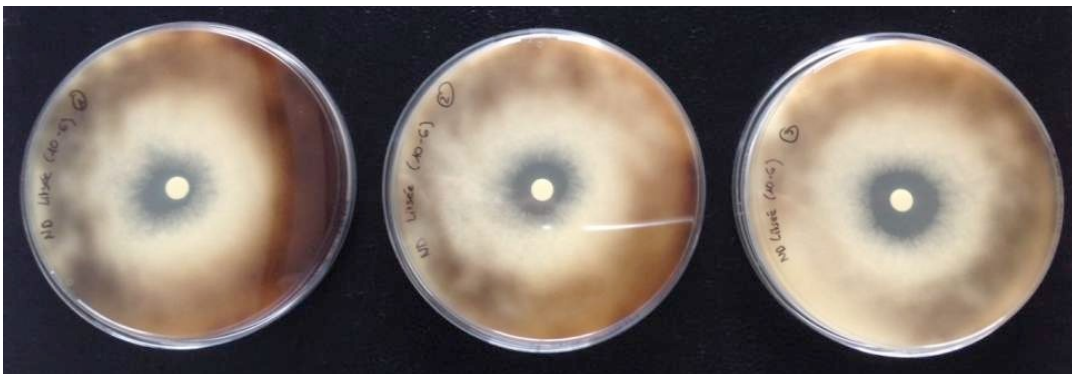
- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 : Absence de pousse

J2 :



J3 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1 et J2: Absence de pousse

J3 :

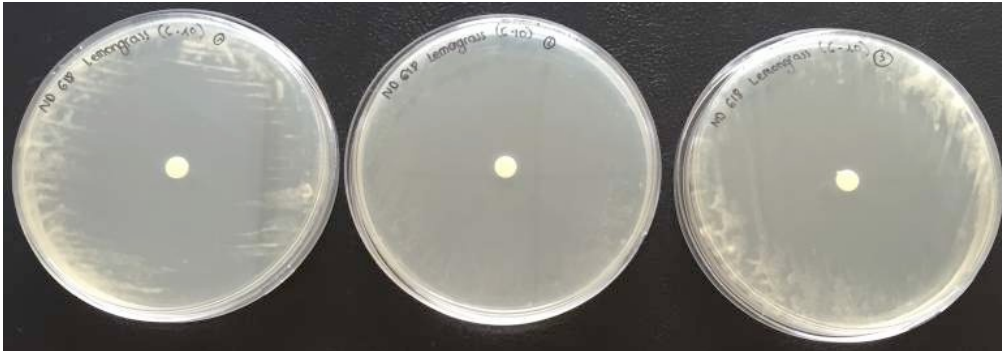


HE de Lemongrass

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 : Absence de pousse

J2 :



J3 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1, J2 et J3 : Absence de pousse

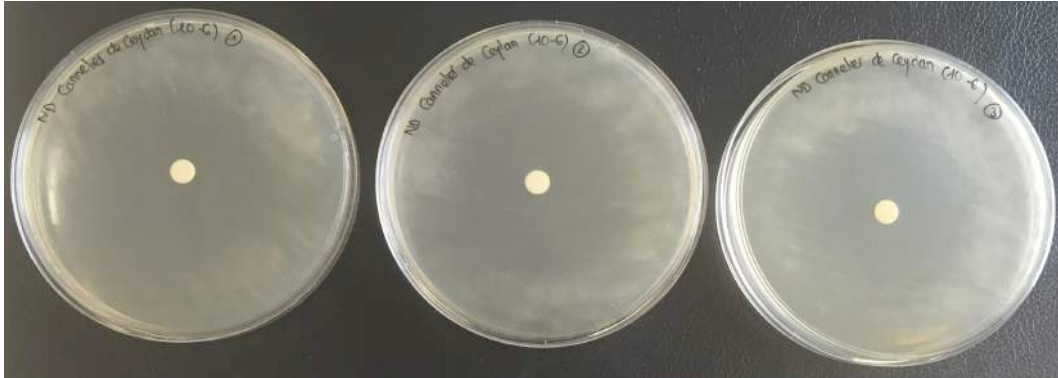
J5 :



HE de Cannelier de Ceylan

- *Neoscytalidium dimidiatum*

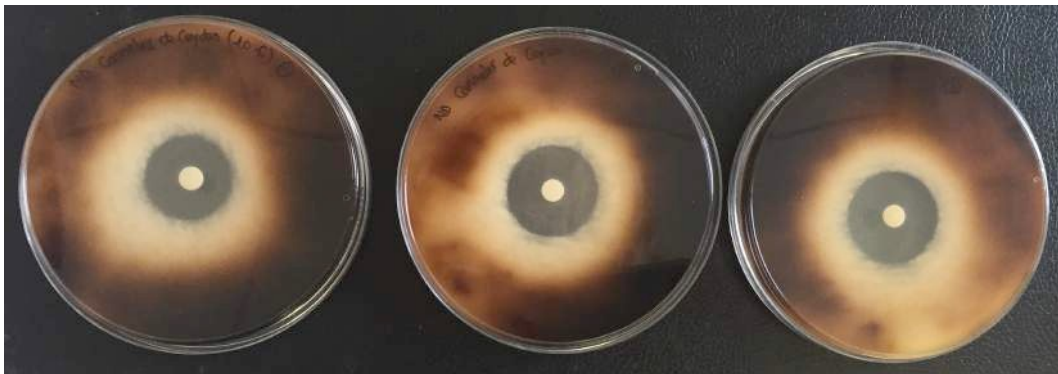
J1 :



J2 :



J3 :



HE de Cannelier de Ceylan (suite)

- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



J3 :



J7 :



HE de Giroflier

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



J3 :



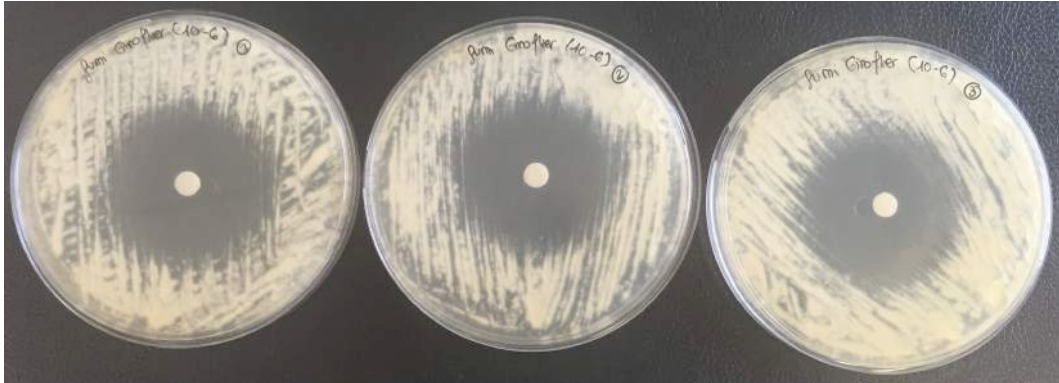
J7 :



HE de Girofler (suite)

- *Aspergillus fumigatus*

J1 :



J2 :



J3 :



J7 :



HE de Sarriette

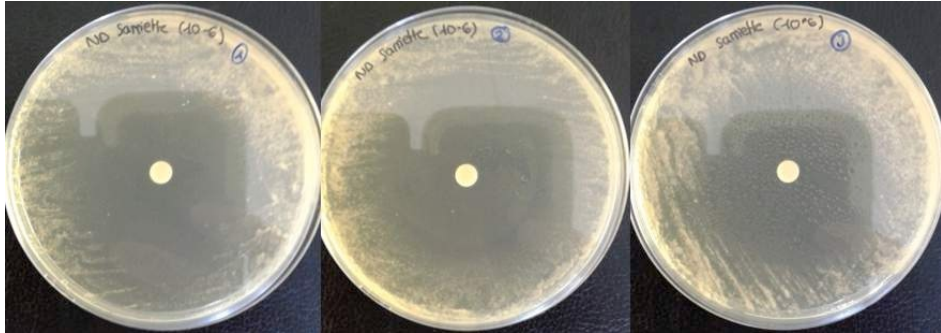
- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 : Absence de pousse

J2 :



J3 :



J5 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1, J2 et J3 : Absence de pousse

J5 :



HE d'Origan

- *Neoscytalidium dimidiatum*

J1 :



J2 :



J3 :



J5 :



- *Aspergillus fumigatus*

J1, J2, J3 et J5 :



Témoins négatifs (= sans HE) :

J1 :

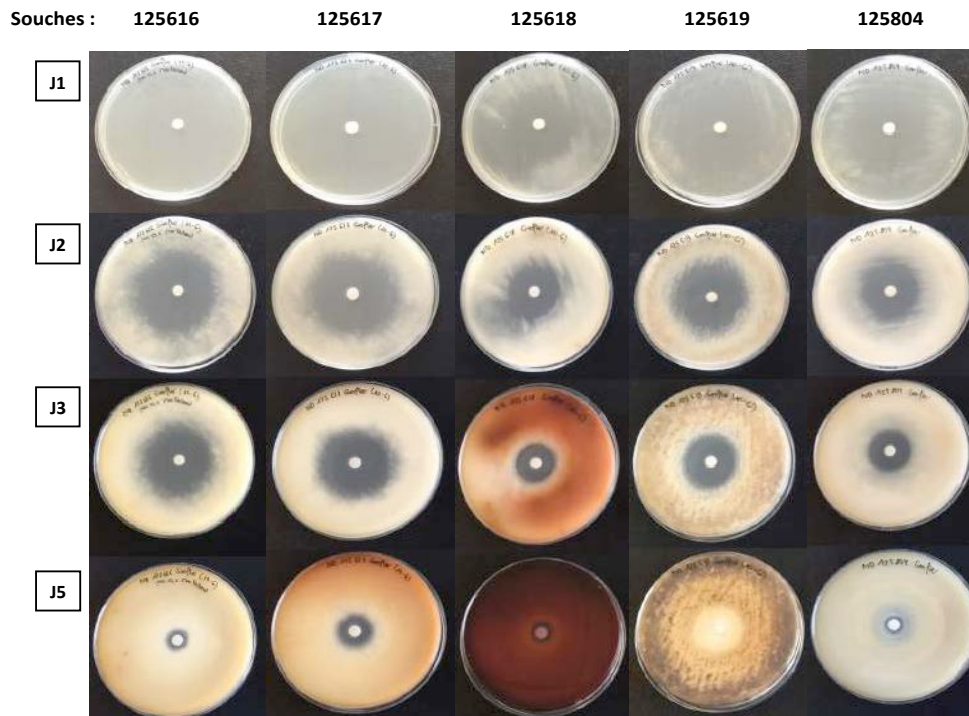
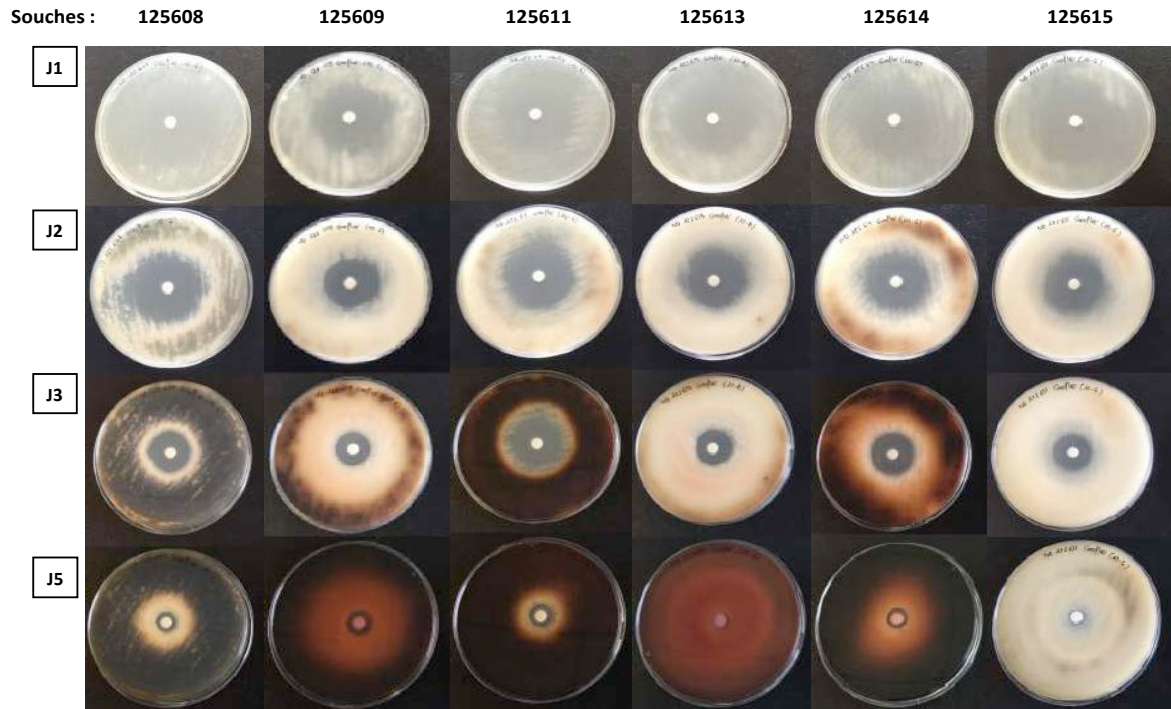


J2 :

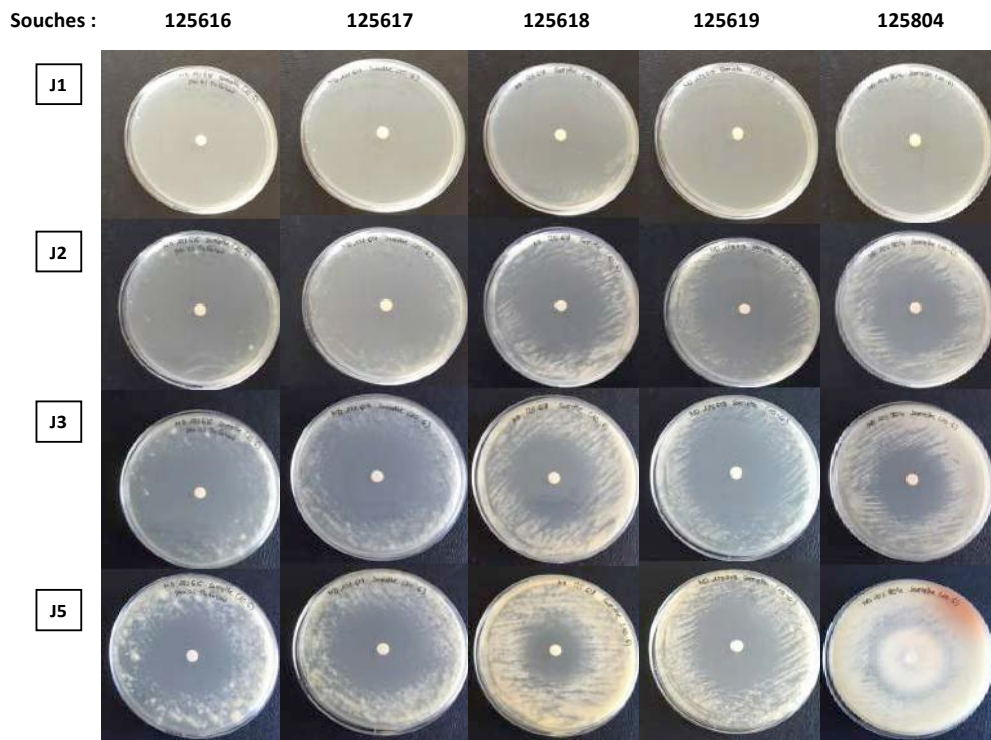
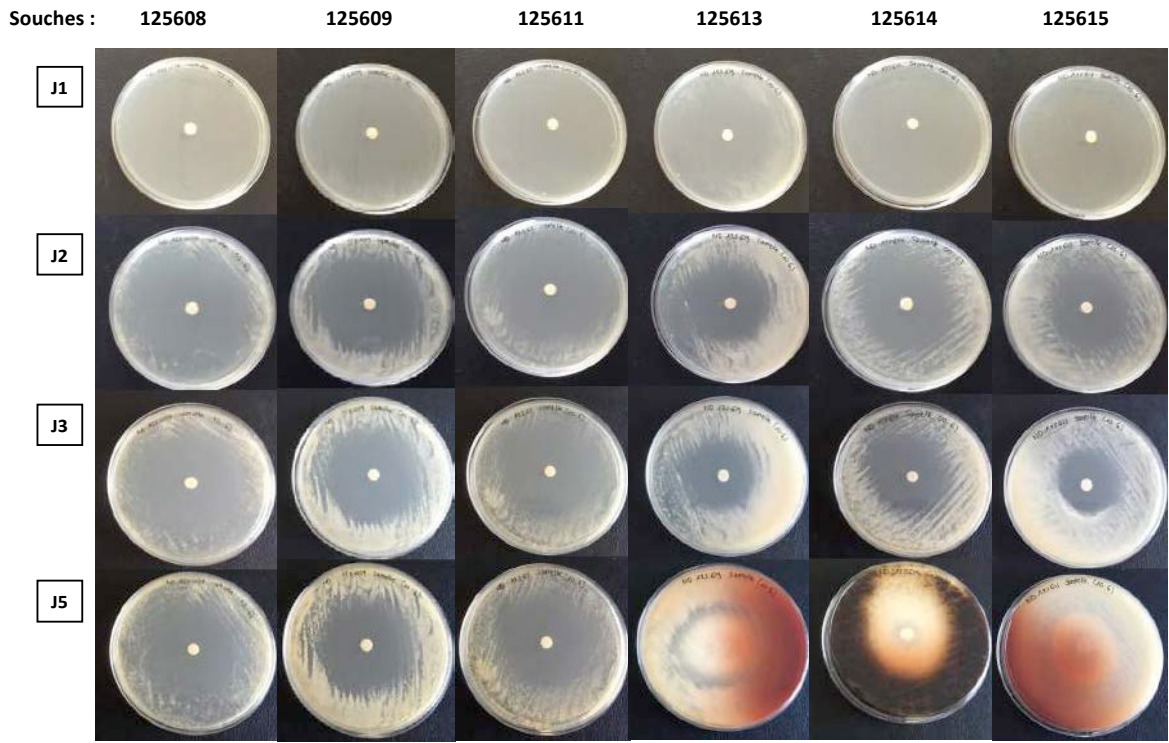


Annexe 5 :

HE de Girofliefier :

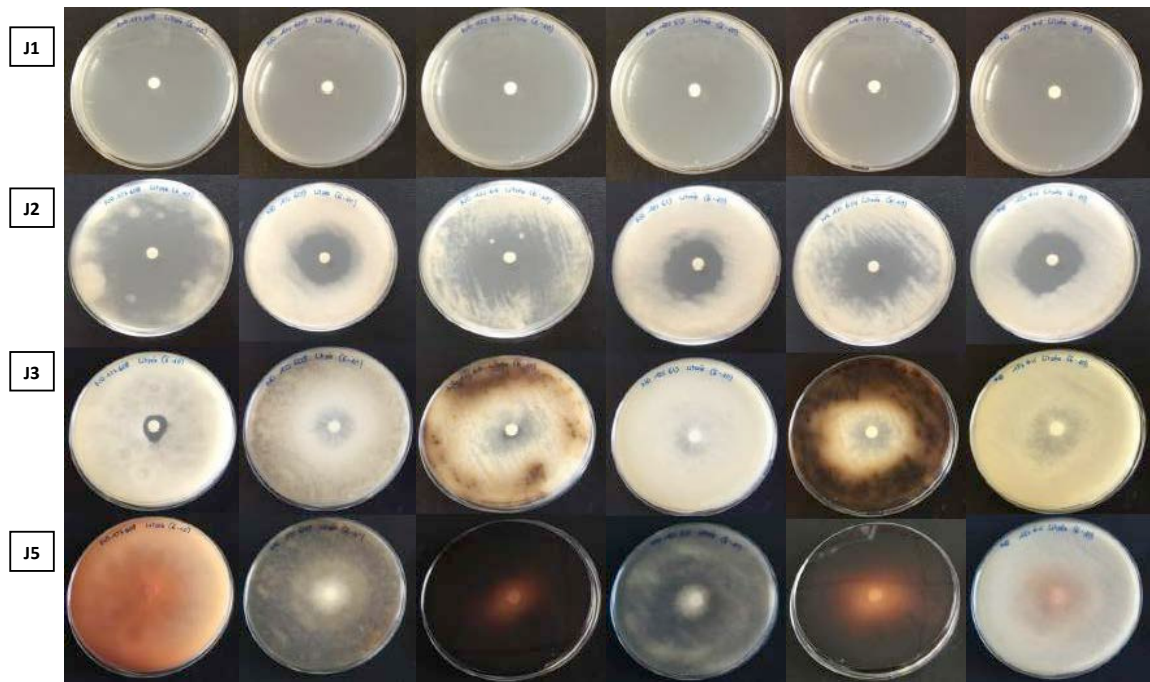


HE de Sarriette :

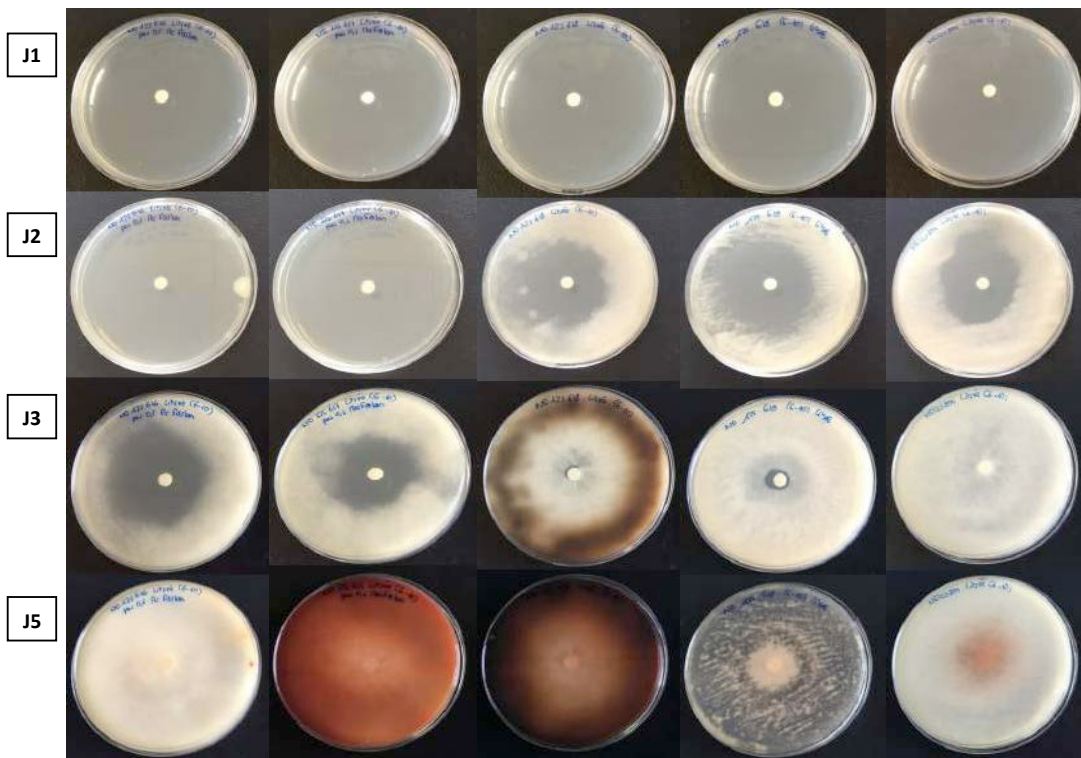


HE de Litsée citronné :

Souches : 125608 125609 125611 125613 125614 125615



Souches : 125616 125617 125618 125619 125804



Souches :

125745

125859

13357

J1



J2



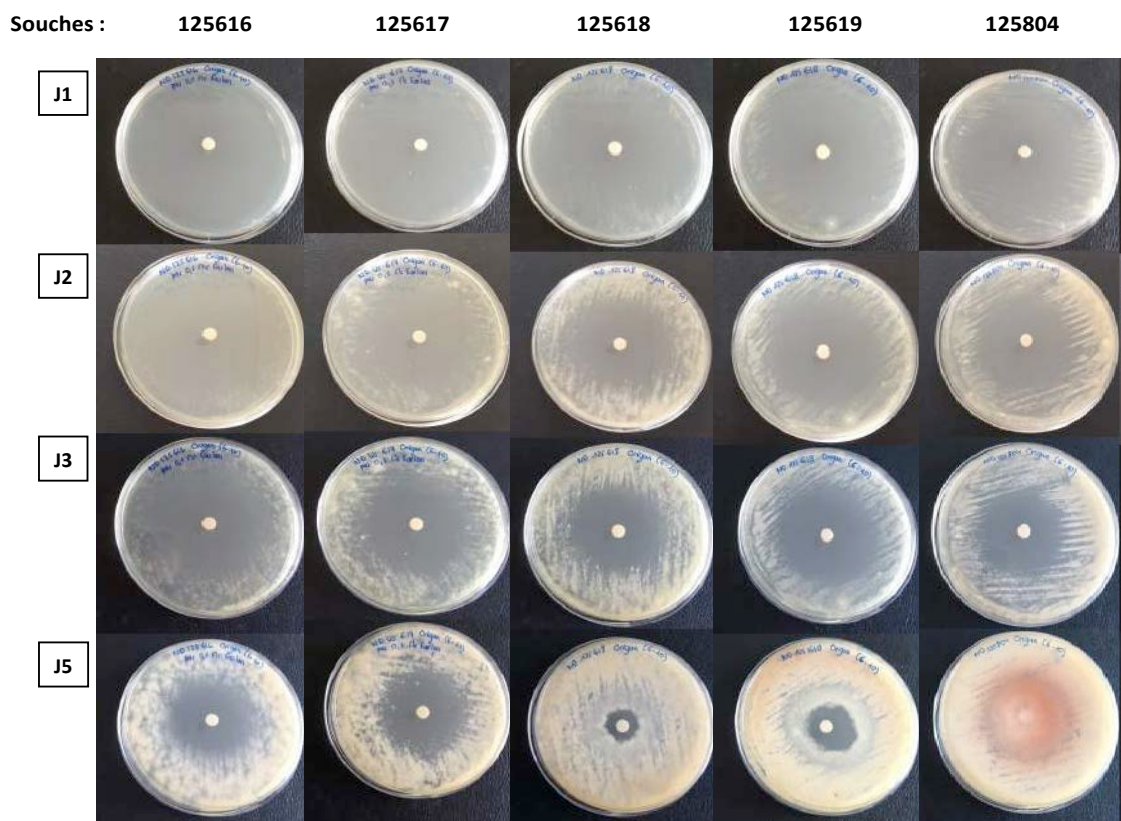
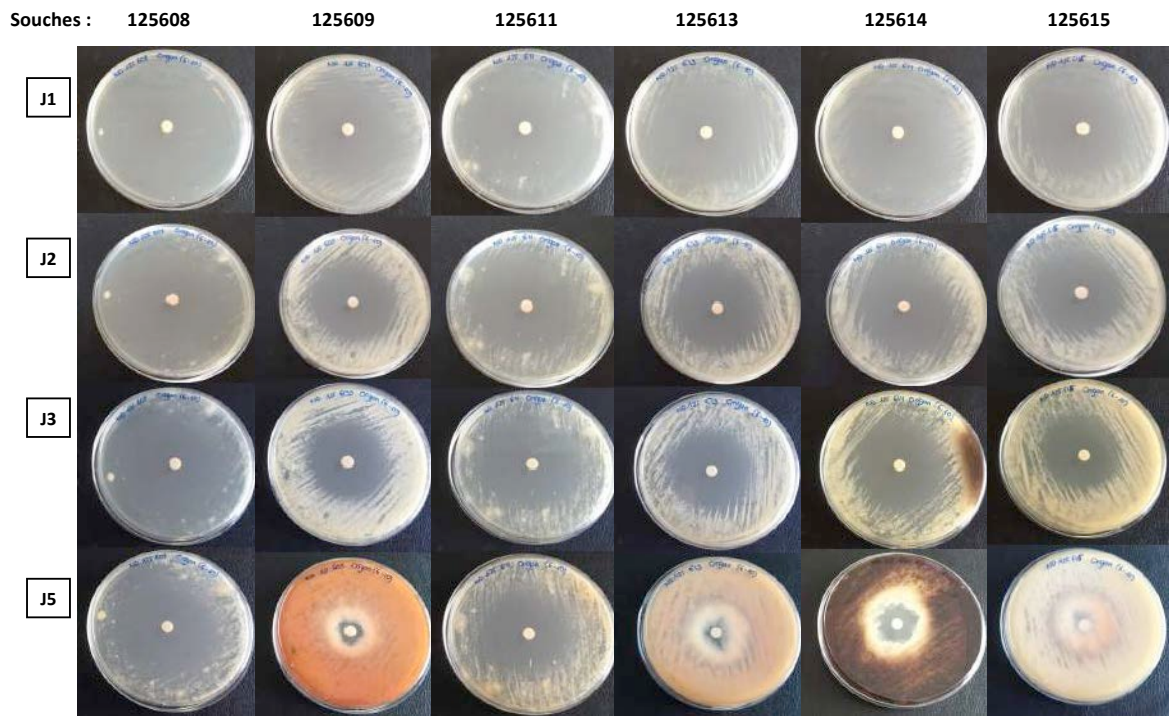
J3

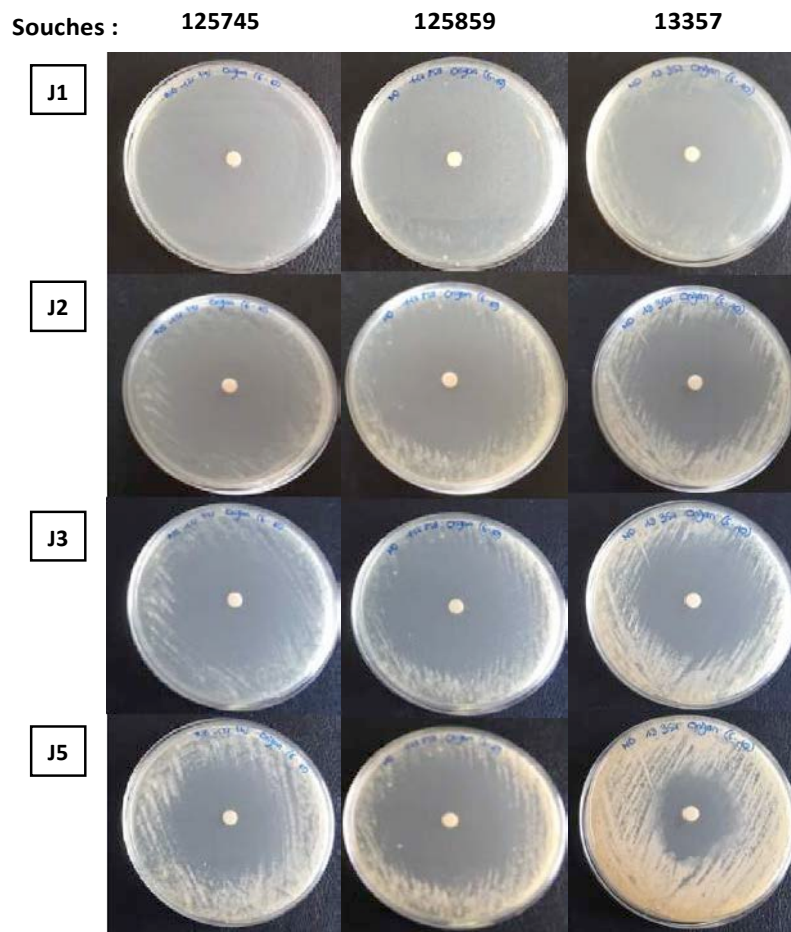


J5



HE d'Origan :





REFERENCES :

1. *Onychomycoses : Modalités de diagnostic et prise en charge*. Ann Dermatol Venerol 2007; 134:5S7-16.
2. Murbach Teles Andrade BF *et al*. *Antimicrobial activity of essential oils*, *Journal of Essential Oil Research*, 2014, 26:1, 34-40.
3. Lakhan SE, Sheaffer H, Tepper D. The Effectiveness of Aromatherapy in Reducing Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Res Treat*. 2016; 2016:8158693.
4. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Aug; 50 (2):195-9.
5. Chabasse D, Contet-Audonnet N, Bouchara JP, Basile AM. *Moisissures Dermatophytes Levures Du prélèvement au diagnostic*, Editions Biomérieux éducation, France, 2016, 190p.
6. Machouart M, Menir P, Helenon R, Quist D, Desbois N. *Scytalidium and scytalidiosis: what's new in 2012?* *J Mycol Med*. 2013 Mar; 23 (1): 40-6.
7. Koenig H. *Guide de mycologie médicale*. Ellipses, France, Paris, 1995, pp. 143-144.
8. Campbell CK, Mulder JL. *Skin and nail infection by Scytalidium hyalinum sp. nov.* *Sabouraudia*. 1977 Jul; 15 (2): 161-6.
9. Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WF, Phillips AJ, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol*. 2006; 55: 235-53.
10. Madrid H, Ruíz-Cendoya M, Cano J, Stchigel A, Orofino R, Guarro J. *Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of Neoscytalidium dimidiatum isolates from different origins*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Oct; 34 (4): 351-4.
11. Phillips AJ, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW. *The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture*. *Stud Mycol*. 2013 Sep 30; 76(1): 51-167.
12. Huang SK, Tangthirasunun N, Phillips AJ, Dai DQ, Wanasinghe DN, Wen TC, Bahkali AH, Hyde KD, Kang JC. *Morphology and Phylogeny of Neoscytalidium orchidacearum sp. nov. (Botryosphaeriaceae)*. *Mycobiology*. 2016 Jun; 44 (2): pp.79-84.
13. Lacroix C, Kac G, Dubertret L, Morel P, Derouin F, de Chauvin MF. *Scytalidiosis in Paris, France*. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Jun; 48 (6): 852-6.

14. Hay RJ, Moore MK. *Clinical features of superficial fungal infections caused by Hendersonula toruloidea and Scytalidium hyalinum*. Br J Dermatol. 1984 Jun; 110 (6): 677-83.
15. Dunn JJ, Wolfe MJ, Trachtenberg J, Kriesel JD, Orlandi RR, Carroll KC. *Invasive fungal sinusitis caused by Scytalidium dimidiatum in a lung transplant recipient*. J Clin Microbiol. 2003 Dec; 41 (12): 5817-9.
16. Elinav H, Izhar U, Benenson S, Admon D, Hidalgo-Grass C, Polacheck I, Korem M. *Invasive Scytalidium dimidiatum infection in an immunocompetent adult*. J Clin Microbiol. 2009 Apr; 47 (4): 1259-63.
17. Moutran R, Maatouk I, Wehbé J, Abadjian G, Obeid G. *Subcutaneous infection spread by Scytalidium (Neoscytalidium) dimidiatum*. Ann Dermatol Venereol. 2012 Mar; 139 (3): 204-8.
18. Feuilhade de Chauvin M. *Treatment of onychomycosis*. J Mycol Med. 2014 Dec; 24 (4): 296-302.
19. Dunand J, Paugam A. *In vitro susceptibility of isolates of Scytalidium spp. from superficial lesions against posaconazole*. Pathol Biol (Paris). 2008 Jul; 56 (5): 268-71.
20. Lacroix C, de Chauvin MF. *In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against Scytalidium dimidiatum and Scytalidium hyalinum clinical isolates*. J Antimicrob Chemother. 2008 Apr; 61 (4): 835-7.
21. Morris-Jones R, Youngchim S, Hextall JM, Gomez BL, Morris-Jones SD, Hay RJ, Casadevall A, Nosanchuk JD, Hamilton AJ. *Scytalidium dimidiatum causing recalcitrant subcutaneous lesions produces melanin*. J Clin Microbiol. 2004 Aug; 42 (8): 3789-94.
22. Ruíz-Cendoya M, Madrid H, Pastor J, Guarro J. *Evaluation of antifungal therapy in a neutropenic murine model of Neoscytalidium dimidiatum infection*. Int J Antimicrob Agents. 2010 Feb; 35 (2): 152-5.
23. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. *Biological effects of essential oils--a review*. Food Chem Toxicol. 2008 Feb; 46 (2): 446-75.
24. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties*. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan; 19 (1): 50-62.
25. Baudoux D. *L'aromathérapie, Se soigner par les huiles essentielles*. Edition Amyris, Belgique, 2008, 256 p.
26. Zhiri A., Baudoux D. *Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies*. Edition Inspir development, Luxembourg, 2006, 72 p.






27. Divband K, Shokri H, Khosravi AR. *Down-regulatory effect of Thymus vulgaris L. on growth and Tri4 gene expression in Fusarium oxysporum strains*. Microb Pathog. 2017 Mar; 104: 1-5.
28. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. *Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species*. J Med Microbiol. 2006 Oct; 55 (Pt 10): 1367-73.
29. Rajkowska K, Otlewska A, Kunicka-Styczyńska A, Krajewska A. *Candida albicans Impairments Induced by Peppermint and Clove Oils at Sub-Inhibitory Concentrations*. Int J Mol Sci. 2017 Jun 19; 18 (6).
30. Janssen AM, Scheffer JJ, Parhan-van Atten AW, Baerheim Svendsen A. *Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes*. Pharm Weekbl Sci. 1988 Dec 9; 10 (6): 277-80.
31. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi*. J Antimicrob Chemother. 2002 Aug; 50 (2): 195-9.
32. Satchell AC, Saurajen A, Bell C, Barnetson RS. *Treatment of interdigital tinea pedis with 25% and 50% tea tree oil solution: a randomized, placebo-controlled, blinded study*. Australas J Dermatol. 2002 Aug; 43 (3): 175-8.
33. Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L. *Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains*. J Appl Microbiol. 2006 Jun; 100 (6): 1333-8.
34. Tullio V, Nostro A, Mandras N, Dugo P, Banche G, Cannatelli MA, Cuffini AM, Alonzo V, Carlone NA. *Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods*. J Appl Microbiol. 2007 Jun; 102 (6): 1544-50.
35. De Oliveira Pereira F, Alves Wanderley P, Cavalcanti Viana FA, Baltazar de Lima R, Barbosa de Sousa F, de Oliveira Lima E. *Growth Inhibition and Morphological Alterations of Trichophyton Rubrum Induced by Essential oil from Cymbopogon Winterianus Jowitt Ex Bor*. Braz J Microbiol. 2011 Jan; 42 (1): 233-42.
36. El Amri *et al.* *Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Teucrium capitatum L et l'extrait de Siléne vulgaris sur différentes souches testées*. J. Appl. Biosci. 2014, 82:7481– 7492.
37. Esper RH, Gonzalez E, Marques MO, Felicio RC, Felicio JD. *Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by Aspergillus flavus*. Front Microbiol. 2014 Jun 4; 5: 269.
38. Felsociova S, Kacaniova M, Horska E, Vukovic N, Hleba L, Petrova J, Rovna K, Stricik M, Hajduova Z. *Antifungal activity of essential oils against selected terverticillate penicillia*. Ann Agric Environ Med. 2015; 22 (1): 38-42.

39. Anwer MK, Jamil S, Ibnouf EO, Shakeel F. *Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion*. J Oleo Sci. 2014; 63 (4): 347-54.
40. Edris AE, Malone CF. Preferential solubilization behaviours and stability of some phenolic-bearing essential oils formulated in different microemulsion systems. Int J Cosmet Sci. 2012 Oct; 34 (5): 441-50.
41. Kaur G, Mehta SK. *Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications*. Int J Pharm. 2017 Aug 30; 529 (1-2): 134-160.
42. Khan SN, Khan S, Iqbal J, Khan R, Khan AU. *Enhanced Killing and Antibiofilm Activity of Encapsulated Cinnamaldehyde against Candida albicans*. Front Microbiol. 2017 Aug 29; 8: 1641.
43. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. *Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi*. J Mycol Med. 2014 Jun; 24 (2): e51-6.
44. Tartor YH, Hassan FAM. *Assessment of carvacrol for control of avian aspergillosis in intratracheally challenged chickens in comparison to voriconazole with a reference on economic impact*. J Appl Microbiol. 2017 Nov; 123 (5): 1088-1099.
45. Nóbrega RO, Teixeira AP, Oliveira WA, Lima EO, Lima IO. *Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of Cryptococcus neoformans*. Pharm Biol. 2016 Nov; 54 (11): 2591-2596.
46. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. *Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Jan; 30 (1): 41-50.
47. Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. *Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo*. Oral Microbiol Immunol. 2005 Apr; 20 (2): 106-11.
48. Khan MS, Malik A, Ahmad I. *Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of Candida albicans*. Med Mycol. 2012 Jan; 50 (1): 33-42.
49. Sharifi-Rad J, Salehi B, Schnitzler P, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Fathi M, Eisazadeh M, Sharifi-Rad M. *Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of Sinapis arvensis L., Lallelantia royleana Benth. and Pulicaria vulgaris Gaertn*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2017 Aug 30; 63 (8): 42-47.
50. Shin S, Lim S. *Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against Trichophyton spp*. J Appl Microbiol. 2004; 97 (6): 1289-96.

51. Freires Ide A, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, Alencar SM, Figueira GM, De Oliveira Rodrigues JA, Duarte MC, Rosalen PL. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. PLoS One. 2014 Jun 5; 9 (6): e99086.
52. Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G, Vaz S, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Oct; 32 (10): 1311-20.
53. Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CM, Beck RC, da Silva CB. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia. 2013 Apr; 175 (3-4): 281-6.
54. Patra M., Shahi K., Midgely G., Dikshit A. Utilization of essential oil as natural antifungal against nail-infective fungi. Flavour Frag J. 2002; 17: 91–94.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 22 Décembre 2017

<p style="text-align: center;">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Anaëlle Cuntzmann</p> <p><u>Sujet</u> :</p> <p style="text-align: center;">Neoscytalidium dimidiatum et huiles essentielles : vers une nouvelle piste thérapeutique ?</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. Christophe GANTZER, PU Directeur : Mme. Marie MACHOUART, PUPH Juges : M. Jean-Luc SCHMUTZ, PUPH Mme Florence MENIGOT, Pharmacien</p>	<p style="text-align: center;">Vu, Nancy, le 15/11/2017 .</p> <p style="text-align: center;">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p style="text-align: center;">M. C. GANTZER Mme. M. MACHOUART</p>  
<p style="text-align: center;">Vu et approuvé, Nancy, le 23. 11. 2017</p> <p style="text-align: center;">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p style="text-align: center;">Francine PAULUS</p> 	<p style="text-align: center;">Vu, Nancy, le</p> <p style="text-align: center;">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p style="text-align: center;">Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 10141.</p>

N° d'identification :

TITRE

***NEOSCYTALIDIUM DIMIDIATUM* et HUILES ESSENTIELLES :
Vers une nouvelle piste thérapeutique ?**

Thèse soutenue le 22 Décembre 2017

Par Anaëlle CUNTZMANN

RESUME :

Actuellement, la notion de « bien-être » entraîne une réelle motivation de la population à changer ses habitudes de vie et à s'orienter vers des pratiques non conventionnelles à visée thérapeutique. Ainsi l'aromathérapie prend une place croissante dans l'arsenal thérapeutique et ce, dans bien des domaines, allant de l'infectiologie à l'association à certaines chimiothérapies. Le champignon *Neoscytalidium dimidiatum* (*Nd*) est une moisissure appartenant aux pseudo-dermatophytes et est responsable d'onychomycoses, dans les pays tropicaux. Il présente un profil de résistance aux traitements conventionnels, ce qui en fait un candidat intéressant pour le développement potentiel de nouveaux traitements. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles (HE) comme nouvelle piste thérapeutique potentielle dans le traitement des onychomycoses à *Nd*. Nous avons ainsi travaillé sur l'élaboration de deux protocoles afin de tester la sensibilité de 15 souches de *Nd* à 20 HE différentes. La première méthode reposait sur la réalisation d'aromatogrammes, mettant en évidence, pour chaque HE, la présence ou non de halots d'inhibition lors de la croissance fongique. Les diamètres de ces derniers ont été mesurés et comparés entre eux afin de sélectionner les HE les plus efficaces. Par la suite, un protocole de microdilution en plaques a permis de tester l'activité antifongique des HE initialement choisies. Les résultats obtenus ont montré que plusieurs HE dont celles de Giroflier, de Cannelle de ceylan, d'Origan et de Sarriette se démarquent pour leur activité antifongique. Les HE d'Origan et de Sarriette sont les deux HE présentant les plus grands diamètres d'inhibition tandis que la Cannelle et le Giroflier montrent les diamètres les plus stables dans le temps. La détermination d'un potentiel fongistatique ou fongicide reste cependant délicat sur nos seuls résultats et nécessite des études complémentaires. Lors des tests par microdilution en plaques des CMI de 400 et 800 µg/mL ont été déterminées respectivement pour les HE de Sarriette et de Giroflier vis-à-vis de *Nd*. Les études sur les activités antifongiques des HE sont encore très disparates rendant difficile l'interprétation et l'extrapolation de ces résultats, pour l'instant. Cette étude représente donc une première étape vers une potentielle nouvelle piste thérapeutique sous conditions d'affiner d'avantage le protocole initié, pour, à terme, conduire à des études *in vivo*.

MOTS CLES : *Neoscytalidium dimidiatum*, huiles essentielles, onychomycoses, aromatogramme, CMI.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Marie MACHOUART	Laboratoire de Parasitologie- Mycologie - CHRU Nancy	Expérimentale X Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème 5

Thèmes	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament 5 - Biologie	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
--------	--	---