
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Ahariz, M. (2012). *Peroxidases regulation of Candida albicans oral biofilms* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté de Médecine – Sciences dentaires, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/209728/4/586e24b9-5ece-484b-a9d7-f2a34b2479d7.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.



ULB - Campus Erasme
Bibliothèque des Sciences de la Santé - CP 607
Route de Lennik, 808 (Bât.E)
B- 1070 Bruxelles
Tél.: 02/555.61.70



Effet régulateur des peroxydases sur les biofilms oraux à *Candida albicans*

Mohamed Ahariz

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade académique
de Docteur en Sciences Dentaires

Promoteur : Pr Ph. Courtois

Université Libre de Bruxelles



003395986

Université Libre de Bruxelles
Faculté de Médecine
Laboratoire d'Hormonologie Expérimentale
(Pr S. Meuris)

Année académique 2011-2012

Effet régulateur des peroxydases sur les biofilms oraux à *Candida albicans*

Mohamed Ahariz

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade académique
de Docteur en Sciences Dentaires

Composition du Jury: Philippe Lebrun, Président,
Françoise Miot,
Dominique Parent,
Astrid Vanden Abbeele,
Olivier Vandenberg,
Philippe Courtois, Secrétaire, Promoteur

Experts externes: Marie-Pierre Hayette, Université de Liège
Hugo De Bruyn, Universiteit Gent

Université Libre de Bruxelles
Faculté de Médecine
Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale
(Pr S. Meuris)

Année académique 2011-2012



Remerciements

Cette thèse de doctorat a été développée dans le Laboratoire d'Horonologie Expérimentale de la Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences Dentaires. J'adresse mes remerciements au Professeur S. Meuris, Directeur du Laboratoire d'Horonologie Expérimentale, pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans son laboratoire et au Professeur Ph. Courtois, promoteur de cette thèse, pour en avoir suivi le travail expérimental et la rédaction. Je remercie les membres du Jury, les Professeurs Philippe Lebrun, Françoise Miot, Dominique Parent, Astrid Vanden Abbeele, Olivier Vandenberg, Marie-Pierre Hayette (Université de Liège) et Hugo De Bruyn (Universiteit Gent) pour leurs commentaires constructifs.

Après avoir longuement assisté le Docteur J. Mouhyi, responsable de l'Unité de prothèses sur implants au CHU Saint-Pierre pendant ma dernière année de licence en Sciences Dentaires (1995-1996), j'ai décidé de me spécialiser dans la réhabilitation orale au moyen d'implants. Je le remercie aujourd'hui de m'avoir mis le pied à l'étrier. Après les DES en Implantologie Orale (1998) sous la direction du Professeur Ch. Malevez et en Biologie Buccale (2000) sous la direction du Professeur Ph. Courtois, je projetais d'examiner *in vitro* et *in vivo* les différentes facettes des relations entre les peroxydases, un seul microorganisme (*Candida albicans*) – il fallait réduire la complexité du milieu oral – et les biomatériaux rencontrés quotidiennement dans mon activité clinique en implantologie et en prothèse. Ce travail scientifique a été encouragé par feu le Professeur J. Van Reck, Chef du Service de Stomatologie et de Chirurgie maxillo-faciale au CHU Saint-Pierre, où j'étais devenu entretemps assistant. Le Professeur J. Van Reck m'avait, entre autres, soutenu auprès du Comité d'Éthique de l'Hôpital Saint-Pierre pour obtenir l'aval concernant la partie clinique de ces recherches. Son successeur, le Professeur I. Loeb m'a incité à poursuivre ce projet. En 2002, j'ai obtenu le DEA en Sciences de la Santé, permettant ainsi de m'atteler à la réalisation de cette thèse de doctorat. La route fut longue et parsemée de difficultés : concilier clinique et recherche fut très contraignant d'autant plus que j'avais succédé en 2001 au Docteur J. Mouhyi à la tête de l'Unité de prothèses sur implants au CHU Saint-Pierre.

De nombreuses personnes se sont croisées autour du thème de recherche abordé : des universitaires, des industriels, des membres des services de soins aux personnes âgées et des étudiants. Des expériences complémentaires furent réalisées au Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Electronique (LISE) aux FNDP à Namur avec la collaboration du Professeur P. Louette. Les sociétés Biopole et Henogen ont subsidié une étude clinique par laquelle j'ai pu contribuer à mettre au point certains aspects de la décontamination des prothèses dentaires par des gels enrichis en systèmes peroxydases. La direction et le personnel de la Maison de Repos Porte de Hal - anciennement Maison des Aveugles - m'a aimablement accueilli pour la partie *in vivo* du travail. Monsieur Christophe Rauter du laboratoire de prothèses dentaires Drailly a fourni gracieusement les feuillets de résine utilisés dans certaines des investigations *in vitro*. De même, j'ai pu bénéficier de l'apport de Monsieur S. Nejadnik qui, dirigé par le Professeur Courtois dans le cadre d'un DEA en Sciences Dentaires, avait eu l'occasion d'analyser l'effet sur *Candida albicans* du peroxyde d'hydrogène produit par la glucose-oxydase. Enfin, sept étudiants de la Haute Ecole Francisco Ferrer - Mesdemoiselles H. El Amri, S. Atmaca, F. Chagri, I. Lottici, Messieurs H. Dewèvre, S. Mavutukidi, J. Le Gentil de Rosmorduc - m'ont aidé, dans le cadre de leur Travail de Fin d'Etudes, à développer des procédures et à répéter des manipulations de laboratoire préalablement aux investigations *in vivo* que j'avais menées ou auxquelles j'avais participé.

Je remercie Madame Fairouz Ben Abdelouahed et Mademoiselle Naïma Ahariz pour la relecture des premiers jets de cette thèse. Je remercie le Professeur G. Graff qui fut attentif à me signaler nombre de nouveaux articles scientifiques parus autour de mon sujet de doctorat et qui accepta de relire le manuscrit en fin de parcours. Mes remerciements s'adressent également au Professeur L. Sennerby (Sahlgrenska Academy, Göteborg, Suède) pour ses conseils et encouragements amicaux.

Je remercie mon épouse, Fouzia, pour son soutien sans faille, mes deux enfants, Sophia et Mehdi, pour le temps de leur enfance qu'ils ont partagé avec nous, mes sœurs et mes parents pour leur présence et leurs conseils toujours sages.

Curriculum-vitae

I. Titres universitaires

- D.E.A. en Sciences de la Santé (Université Libre de Bruxelles, 2002)
- D.E.S. en Biologie Buccale (Université Libre de Bruxelles, 2000)
- D.E.S. en Implantologie Orale (Université Libre de Bruxelles, 1998)
- Licencié en Sciences Dentaires (Université Libre de Bruxelles, 1996)

II. Carrière scientifique

- Doctorant à l'Université Libre de Bruxelles, Laboratoire d'Hormonologie Expérimentale (Directeur : Pr. S. Meuris, promoteur de thèse : Pr Ph. Courtois)
- Responsable de l'unité de prothèse sur implants au CHU Saint-Pierre de 2001 à 2009

III. Participation à des enseignements

- Maître de stages dentiste généraliste de l'Université Libre de Bruxelles
- Membre du collège d'enseignement en implantologie orale à l'Université Libre de Bruxelles
- Prise en charge du patient candidat à un traitement implantaire : 16 heures
ATERI (Association Tunisienne d'Etude et de Recherche en Implantologie), Tunis, 2008
- Réhabilitation implantaire étape par étape : du plan de traitement simple aux cas complexes : 6 heures, CHU Saint-Pierre, Bruxelles, 2006 répété en 2007
- Mise au point du plan de traitement implantaire : de la 1ère consultation à la maintenance prothétique : 16 heures, Formation Hôpital militaire Mohamed V, Rabat, mars 2006

IV. Publications et activités scientifiques

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

- *Candida albicans biofilm on titanium: effect of peroxidase pre-coating.* M. Ahariz, Ph. Courtois. Medical Devices: Evidence and Research 3: 33-40, 2010
- *Candida albicans susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite.* M. Ahariz, Ph. Courtois. Clinical, cosmetic and investigational dentistry 2: 69-78, 2010
- *Candida et prothèses dentaires.* M. Ahariz, I. Loeb, Ph. Courtois. Revue de Stomatologie et de Chirurgie maxillo-faciale 111: 74-78, 2010
- *Denture contamination by yeasts in the elderly.* Vanden Abbeele A., de Meel H., Ahariz M., Perraudin J.-P., Beyer I., Courtois Ph. Gerodontology 25(4):222-8, 2008
- *Periodontal Evaluation of an Nd:YAP Laser Combined with Scaling and Root Planing for non surgical Periodontal Treatment. A clinical evaluation.* El Yazami H., Azehoui N., Ahariz M., Rey G., Sauvêtre E. The Journal of Oral Laser Application 4(2):97-102, 2004
- *Adsorption of peroxidase on titanium surfaces. A pilot study.* M. Ahariz, J. Mouhyi, P. Louette, J. Van Reck, Ch. Malevez, Ph. Courtois. The Journal of Biomedical Materials Research 52: 567-571, 2000

Communications publiées lors de congrès nationaux et internationaux

- *Candida albicans inhibition by thiocyanate / H₂O₂ / peroxidase system in oral gel.* Ahariz M., Dewèvre H., Perraudin J.-P., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Leuven, November 2007, Abstract in Fundamental & Clinical Pharmacology, 22, 227, 2008
- *Lactoperoxidase-precoated oral biomaterials prevent Candida biofilm formation* Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Brussels, November 2006, Abstract in Fundamental & Clinical Pharmacology, 22, 223, 2008
- *Candida albicans adhesion to titanium powder: modulation by lactoperoxidase systems.* Ahariz M., Courtois P. 2nd Trends in medical mycology, Berlin, October 2005, Abstract in mycoses, 48: 2, 70, 2005

- Adherence of candida albicans ATCC 10231 to titanium. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Brussels, April 2005, Abstract in *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 450: R6, 16, 2005
- Effect of saliva-mimicking oral care compounds upon candida albicans ATCC 10231. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Leuven, November 2004, Abstract in *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 449: R11, 33, 2005
- Oral mucosa colonization by Candida sp. and complete denture. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Gent, May 2004, Abstract in *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 448: R7, 17, 2004

Participations actives à des congrès et colloques internationaux

- Influence du choix et de la position de l'implant sur la stabilité tissulaire à long terme. Ahariz M. 6th SENAME & 1st CORTES International Congress: State of the Art in Implantology & Modern dentistry, Marrakech, octobre 2009: invité à titre d'intervenant
- Planification du traitement implantaire : du respect de la biologie à la haute technologie. Ahariz M. Les défis quotidiens en implantologie moderne, Bruxelles, décembre 2008 : invité à titre d'intervenant et de modérateur
- Espace biologique et profil d'émergence: deux notions indissociables de la réussite implantaire. Ahariz M. V^{ème} congrès euro-méditerranéen d'implantologie orale, Gammarth Tunis, Tunisie, novembre 2007 : invité à titre d'intervenant et président de séance
- Options prothétiques du système ankylosTM : Passage d'un concept à sa réalisation clinique. Ahariz M. Symposium Evident Esthetics in Implant Dentistry IV, Bruxelles, juin 2007.
- Effet de l'hypothiocyanite et de l'hypoiodite sur l'adhérence de Candida albicans au titane. Ahariz M., Chagri F., Courtois P. 8^{ème} forum des jeunes chercheurs en odontologie, Lyon, septembre 2006
- Effet de Peroxidase Systems on Candida albicans adhesion to titanium. Ahariz M., Courtois P. 5th Conference of the European research group on Oral Biology ERGOB, Geneva, sept. 2005
- Candida albicans adherence to titanium. Ahariz M., Courtois P. International Association for Dental Research (IADR, CED & NOF Divisions), 41st Meeting, Amsterdam, september 2005
- Yeast colonization on acrylic denture. Ahariz M., Courtois P. Société Belge de Mycologie Humaine et Animale, Namur, septembre 2005
- Traitements implantaires mandibulaires : actualités et perspectives. Ahariz M. III^{ème} congrès euro-méditerranéen d'implantologie, Hammamet, Tunisie, mai 2005; invité à titre d'intervenant
- Inhibition of Candida albicans by saliva-mimicking oral care compounds. Ahariz M., Courtois P. 7th European Symposium on Saliva, Egmond aan Zee, The Netherlands, may 2005
- Concepts en implantologie dentaire moderne. Ahariz M. Société Marocaine de Parodontologie et d'Implantologie SMPI, Casablanca, septembre 2004
- Effect of peroxidase products upon Candida albicans ATCC 10231. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society for Human and Animal Mycology, Gent, may 2004
- Le traitement implantaire actuel chez l'édenté mandibulaire en omnipratique. Ahariz M. Journée scientifique de la Société Pluridisciplinaire d'Odontologie Belge SPDOB, Brogne, septembre 2003 : invité à titre d'intervenant
- Adsorption of lactoperoxidase on titanium surfaces. Ahariz M., Courtois P. International Conference on Oral Biology (ICOB, IADR), Baveno, Italy, june 1998
- Adsorption de la lactoperoxydase sur le titane. Ahariz M., Courtois P. XII^{ème} colloque de l'Association Internationale Francophone de Recherche Odontologique, AIFRO, Bruxelles, mai 1998

Séminaires

- Mise en charge immédiate des implants : indications et procédures. Ahariz M. Peer review CHU Saint- Pierre, décembre 2006
- Inhibition de la croissance de Candida albicans par les sécrétions salivaires. Ahariz M., Courtois P. Laboratoire d'Hormonologie Expérimentale, Bruxelles, mai 2006
- Le plan de traitement, étape cruciale en implantologie. Ahariz M. Peer review, CHU Saint- Pierre, Bruxelles, novembre 2005
- Système ankylosTM, concept et applications. Ahariz M. GLEM, Bruxelles, juin 2005
- Les apports de la mise en charge immédiate des implants en omnipratique. Ahariz M. Study club de Namur, Namur, novembre 2002

Résumé

Parmi les biomatériaux prothétiques et implantaires qui connaissent actuellement un essor considérable dans la sphère orale, le titane est le composant principal des implants et la résine celui des prothèses dentaires. Dès leur introduction dans la cavité orale, un biofilm hétérogène très complexe les recouvre. Cette thèse analyse la complexité des relations qui se nouent entre un seul micro-organisme (*Candida albicans*), un système de défense de la cavité orale (les peroxydases orales) et les 2 biomatériaux précités (titane, résine). Ces biomatériaux sont en effet, dans le milieu oral, au contact de peroxydases: la myéloperoxydase des neutrophiles et la sialoperoxydase des sécrétions salivaires. Les peroxydases orales appartiennent aux mécanismes salivaires de défense innée non immunitaires qui contrôlent la flore microbienne orale. En présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), elles catalysent *in vivo* l'oxydation du thiocyanate (SCN^-) en hypothiocyanite ($OSCN^-$) et *in vitro* l'oxydation d'iodure (I^-) en hypoiodite (OI^-). Dans le compartiment salivaire et dans les biofilms oraux, H_2O_2 provient essentiellement des bactéries. Dans nos investigations, H_2O_2 était produit par une séquence enzymatique glucose (G) / glucose-oxydase (GOD). L' $OSCN^-$ et l' OI^- sont des oxydants antibactériens, antiviraux et antifongiques. Peu d'études envisagent leur action sur les biofilms à *Candida*.

Candida albicans est une levure commensale de la cavité orale qui peut devenir parasitaire lorsque les défenses immunitaires de l'hôte s'affaiblissent. Ce mycète forme des biofilms sur les biomatériaux introduits dans la bouche, particulièrement sur les prothèses amovibles, la décontamination de ces prothèses est par conséquent essentielle pour éviter le risque de candidoses. (*Candida et prothèses dentaires. Ahariz M., Loeb I., Courtois Ph. ; Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac. ; 111: 74-78, 2010.*)

Les investigations *in vitro* avaient pour but d'analyser les relations entre les systèmes peroxydasiques et *Candida*. L'effet des systèmes peroxydasiques (G / GOD / KI ou KSCN / peroxydase) sur des suspensions de *Candida*, sur des biofilms en formation ou déjà formés fut évalué en fonction des apports en peroxyde d'hydrogène et étudié par l'incorporation des séquences enzymatiques dans les milieux de culture utilisés pour la formation de biofilms à *Candida*. La susceptibilité de *Candida albicans* ATCC 10231 à l' $OSCN^-$ versus OI^- produits par la lactoperoxydase (LPO) a été étudiée dans 3 modèles expérimentaux différents: - dans un milieu de culture liquide; - sur un milieu solide (avec gel d'agarose), - dans un modèle de biofilm mis au point dans le cadre de ce travail. Ce dernier consistait en poudre de titane mise en suspension dans du bouillon de Sabouraud contaminé par *Candida albicans*. La croissance de *Candida* dans le surnageant (phase planctonique) était évaluée par turbidimétrie et la biomasse des levures adhérentes aux biomatériaux (phase attachée) par la méthode au sel de tétrazolium MTT. Des études enzymatiques ont permis d'optimiser les concentrations et les activités des composants des systèmes peroxydasiques et d'illustrer la compétition entre thiocyanate et iodure pour la lactoperoxydase. Les systèmes peroxydasiques G/GOD/ I^- /LPO ainsi que G/GOD/ SCN^- /LPO ont empêché ou limité la croissance de *Candida* dans les phases planctonique et attachée sur poudre de titane pendant au moins 21 jours. A faible dose de GOD (0,2 U/ml), le système G/GOD/ I^- /LPO a réduit le développement des phases planctonique et attachée pendant 4 jours alors que le système G/GOD/ SCN^- /LPO n'a présenté un

effet inhibiteur que les 2 premiers jours d'incubation. (*Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypiodite. Ahariz M., Courtois Ph.; *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*; 2: 69-78, 2010).

Dans d'autres expériences, la peroxydase a été adsorbée sur des feuillets de titane dans le but de modifier leur surface et leur conférer la propriété d'inhiber la formation de biofilm à *Candida* après ajout des substrats de l'enzyme. Des études enzymatiques et d'autres par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) ont démontré l'adsorption de la lactoperoxydase au titane. *In vivo*, des peroxydases sont adsorbées sur des piliers de cicatrisation en titane. (*Adsorption of peroxidase on titanium surfaces: A pilot study*. Ahariz M., Mouhyi J., Louette P., Van Reck J., Malevez C., Courtois P.; *J. Biomed. Mater. Res.*; 52: 567-571, 2000).

Le développement d'un biofilm à *Candida* a été suivi sur titane (en poudre ou en feuillets) ainsi que sur résine. Les phases planctonique et attachée ont été ainsi monitorées pendant 21 jours. La présence d'une matrice exopolysaccharidique sécrétée par les levures a été observée en microscopie photonique et confirmée en fluorescence par la méthode au calcofluor. Dans une série d'expériences sur feuillets de titane et de résine, une phase attachée a pu être démontrée par les mêmes techniques. L'efficacité du système peroxydase utilisant l'iodure comme substrat a été mise en évidence aussi bien lorsque l'enzyme était en solution que lorsqu'elle était préadsorbée sur du titane (*Candida albicans* biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating. Ahariz M., Courtois Ph.; *Medical Devices: Evidence and Research*; 3: 33-40, 2010).

L'incorporation d'autres molécules issues des sécrétions exocrines dans des gels oraux est une voie de recherche qui fut également abordée: ces études ont montré le bénéfice *in vitro* des systèmes peroxydases (leur substrat étant du thiocyanate, du chlorure ou surtout de l'iodure) agissant en synergie avec du colostrum, de la lactoferrine et du lysozyme. Mais la formulation de spécialités qui contiennent ces systèmes antimicrobiens naturels est difficilement transposable *in vivo* tant la complexité du milieu oral est grande (*Denture contamination by yeasts in the elderly*. Vanden Abbeele A., de Meel H., Ahariz M., Perraudin J.P., Beyer I., Courtois P.; *Gerodontology*; 25: 222-228, 2008).

Des investigations *in vivo* chez 155 patients ont permis de décrire les souches sauvages de *Candida sp* présentes sur l'intrados de la prothèse dentaire amovible et la muqueuse palatine correspondante. Le lien entre la présence des levures et un débit salivaire réduit fut confirmé. Ces souches sauvages cultivables ont été identifiées directement sur boîtes de Petri (milieu ChromAgar™) à partir de la morphologie macroscopique des colonies et à partir de tests additionnels (test de germination dans du sérum humain, formation de chlamydoconidies sur milieu RAT, système d'identification sur galeries API™). Pendant 2 semaines, 14 patients ont accepté l'application quotidienne sur l'intrados de la prothèse d'un gel. Il s'agissait de comparer en double aveugle un gel actif contenant le système complet thiocyanate - lysozyme - lactoferrine - colostrum avec un gel contrôle inactivé par chauffage. L'analyse des données a montré une réduction de la colonisation de la muqueuse palatine par *Candida sp* mais pas de la contamination de la prothèse elle-même. Par contre, la décontamination *ex vivo* des prothèses par immersion dans des bains (à température ambiante ou à 37°C) contenant soit G/GOD produisant H₂O₂ soit le système peroxydase complet G/GOD/KI/LOP produisant OI⁻ a démontré l'efficacité de l'hypiodite.

Summary

Among the prosthetic and implant biomaterials in the oral cavity currently exciting tremendous interest, titanium and resin are the main components of implants and dentures respectively. From their introduction in the oral cavity, a highly complex heterogeneous biofilm coats these biomaterials. The present thesis analyzes the complex relationships that are formed between one single microorganism (*Candida albicans*), one defence system of the oral cavity (oral peroxidases) and the two aforementioned biomaterials (titanium and resin). These biomaterials are indeed in contact with peroxidases: myeloperoxidase from neutrophils and sialoperoxidase from salivary secretions. Oral peroxidases belong to the salivary non immune innate defence mechanisms that control the oral microbial flora. In the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2), they catalyze *in vivo* the oxidation of thiocyanate (SCN^-) into hypothiocyanite ($OSCN^-$), *in vitro* the oxidation of iodide (I^-) into hypoiodite (OI^-). In the salivary compartment and in oral biofilms, H_2O_2 is mainly formed by bacteria. In our investigations, H_2O_2 was produced by an enzyme sequence glucose (G) / glucose-oxidase (GOD). The $OSCN^-$ and OI^- are antibacterial, antiviral and antifungal oxidants. Few studies have considered their action on *Candida* biofilms.

Candida albicans is a commensal yeast of the oral cavity which can turn parasitic when the host immune defences are weakened. This fungus forms biofilms on biomaterials within the mouth, especially on dentures, the decontamination of these prostheses is therefore essential to avoid the risk of candidosis. (*Candida et prothèses dentaires*. Ahariz M., Loeb I., Courtois Ph. ; *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*; 111: 74-78, 2010).

In vitro, our investigations aimed to analyze the relationships between peroxidase systems and *Candida*. The effect of peroxidase systems (G / GOD / KI or KSCN / peroxidase) on *Candida* suspensions, on biofilms already formed or in formation was evaluated with various inputs of hydrogen peroxide and was studied by incorporation of enzymatic sequences in the culture media used for *Candida* biofilms formation. The susceptibility of *Candida albicans* ATCC 10231 to $OSCN^-$ versus to OI^- , produced by lactoperoxidase (LPO), was studied in three different experimental models: - in a liquid culture medium - on a solid medium (with agarose gel), - in a biofilm model developed in the context of this work. The latter consisted of titanium powder suspended in Sabouraud broth contaminated with *Candida albicans*. The growth of *Candida* in the supernatant (planktonic phase) was evaluated by turbidimetry and the biomass of yeasts adherent to biomaterials (attached phase) by the tetrazolium salt MTT method. Enzymatic studies have allowed the optimization of the concentrations and activities of peroxidase systems components and the illustration of the competition between thiocyanate and iodide for lactoperoxidase. Peroxidase systems G/GOD/ I^- /LPO and G/GOD/ SCN^- /LPO prevented or limited the growth of *Candida* in the planktonic and attached phases on titanium powder for at least 21 days. At a dose of GOD (0.2 U / ml), the system G/GOD/ I^- /LPO has limited the development of planktonic and attached phases for 4 days while the system G/ GOD/ SCN^- /LPO has shown an inhibitory effect only in the first 2 days of incubation. (*Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite. Ahariz M., Courtois Ph.; *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*; 2: 69-78, 2010).

In other experiments, peroxidase was adsorbed on titanium sheets in order to modify their surface and give them the property of inhibiting biofilm formation of *Candida* after addition of the enzyme substrates. Enzymatic studies and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) showed the adsorption of lactoperoxidase to titanium. *In vivo*, peroxidases are adsorbed on titanium healing abutments. (*Adsorption of peroxidase on titanium surfaces: A pilot study.* Ahariz M., Mouhyi J., Louette P., Van Reck J., Malevez C., Courtois P. ; *J. Biomed. Mater. Res.*; 52: 567-571, 2000).

The development of the *Candida* biofilm was followed on titanium (powder or sheets) as well as on resin. Planktonic and attached phases have been monitored for 21 days. The presence of an exopolysaccharide matrix secreted by the yeasts has been observed with light microscopy and confirmed with fluorescence using the calcofluor method. In a series of experiments on titanium and resin sheets, an attached phase was demonstrated by the same techniques. The efficiency of the peroxidase system using iodide as a substrate was demonstrated when the enzyme was in solution and when it was preadsorbed on titanium (*Candida albicans* biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating. Ahariz M., Courtois Ph.; *Medical Devices: Evidence and Research*; 3: 33-40, 2010).

The incorporation in oral gels of other molecules present in exocrine secretions is a research direction that was also discussed: the present studies have demonstrated the *in vitro* benefits of peroxidase systems (with thiocyanate, chloride or especially iodide as substrates) acting in synergy with colostrum, lactoferrin and lysozyme. But the formulation of specialities that contain these natural antimicrobials is difficult to transpose *in vivo* as the complexity of the oral environment is very large (*Denture contamination by yeasts in the elderly.* Vanden Abbeele A., de Meel H., Ahariz M., Perraudin J.-P., Beyer I., Courtois P.; *Gerodontology*; 25: 222-228, 2008).

Investigations pursued *in vivo* in 155 patients allowed the determination of the wild strains of *Candida sp* present on the fitting surface of the removable dental appliance and on the corresponding palatal mucosa. The link between the presence of yeasts and a reduced salivary flow was confirmed. These wild strains were directly grown and identified on Petri dishes (ChromAgar™ medium) from the macroscopic morphology of colonies and from additional tests (germination test in human serum, formation of chlamydoconidies on RAT medium, API™ galleries identification system). For a period of two weeks, 14 patients accepted the daily application of a gel on the fitting surface of their denture. It was a double-blind comparison of an active gel containing the thiocyanate - lysozyme - lactoferrin - colostrum complete system with a control gel inactivated by heating. Data analysis showed a reduction in the number of colonies on the palatal mucosa by *Candida sp*, but not on the denture itself. By contrast, decontamination *ex vivo* of dentures by immersion in a bath (at room temperature or 37° C) containing either G/GOD producing H₂O₂ or the complete peroxidase system G/GOD/KI/L producing OI⁻ demonstrated the efficiency of hypiodite.

Résumé de la thèse annexe

La recherche d'une contamination microbienne intra-implantaire peut-elle démontrer un manque d'étanchéité de l'interface pilier-implant ?

Contexte. Depuis plusieurs décennies, les implants dentaires connaissent un essor considérable et de nombreux systèmes sont disponibles sur le marché. Malgré un taux de survie à long terme supérieur à 90 %, des complications restent à déplorer (Mombelli & Décaillot, 2011). Les systèmes implantaires se différencient notamment par le type de connexion entre l'implant lui-même et le pilier prothétique qui s'y insère. Des études *in vitro* ont mis en évidence l'existence d'un interstice implant - pilier prothétique et de micromouvements entre ces deux éléments (Zipprich *et al*, 2007), mais l'importance de ceux-ci est difficile à évaluer *in vivo*. Ces micromouvements peuvent entraîner une perte d'étanchéité du joint implant - pilier qui transformerait l'implant en un réservoir de bactéries orales à l'origine d'inflammations péri-implantaires récurrentes.

Objectif. Le microbiote oral se compose de nombreuses espèces microbiennes dont la taille peut varier de l'ordre d'un à quelques dizaines de microns. Le but de ce projet est d'identifier les micro-organismes intra-implantaires et de démontrer un lien entre leur taille et la mesure des interstices.

Méthodologie. Une étude prospective multicentrique comparera des groupes de patients traités par différents systèmes implantaires sélectionnés selon l'interstice entre pilier et implant, mesuré *in vitro* (Zipprich *et al*, 2007). Lors du suivi trimestriel à partir du jour de la pose de l'implant, seront réalisés les examens cliniques usuels (mesures des indices de plaque et de saignement au sondage, mesures de la profondeur de poche et de la perte osseuse radiographique) ainsi que des prélèvements microbiologiques péri-implantaires (curettes ou cônes de papier insérés dans le sulcus) et intra-implantaires (récupération de l'ouate de la partie prothétique et / ou du puits implantaire). Les techniques d'identification ne nécessitant pas de culture préalable impliqueront des choix stratégiques: les examens microscopiques particulièrement la microscopie à fond noir détecteront les spirochètes, les techniques immunologiques, l'hybridation FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) et l'hybridation ADN-ADN (*checkerboard DNA-DNA hybridization*) identifieront un nombre limité d'espèces microbiennes, et finalement, des approches plus globales par *microarray* analyseront le microbiote cultivable ou non (notamment le projet HOMIM, *Human Oral Microbe Identification Microarray*). D'autres techniques d'identification exigeant une culture préalable entraînent un biais par sélection des espèces selon le milieu utilisé: les identifications basées sur des tests biochimiques usuels sont longues et fastidieuses pour chacune des colonies. Récemment la spectrométrie de masse MALDI TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*) permet d'identifier aisément et rapidement les spectres protéiques des colonies isolées.

Perspectives. La taille et la densité des espèces bactériennes retrouvées à l'intérieur des implants confirmera l'existence et l'importance de l'interstice pilier / implant *in vivo*. Les espèces observées seront mises en relation avec les systèmes utilisés dans les différents groupes de patients. Le suivi des patients permettra d'étudier l'évolution de la composition de la microflore et sa relation avec le développement de *poches parodontales intra-implantaires iatrogènes*, véritables réservoirs bactériens éventuellement à l'origine de péri-implantites. La mise au point d'incubateurs qui reproduisent *in vitro* les conditions biomécaniques et microbiologiques de la bouche, permettrait de valider de nouveaux systèmes implantaires avant leur utilisation *in vivo*.

Références

- Lamont R.J., Jenkinson H. F. Oral microbiology at a glance. Wiley-Blackwell, 2010.
- Mombelli A., Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. J. Clin. Periodontol., 38: 203-13, 2011.
- Zipprich H., Weigl P., Lauer H.-C., Lange B. Micro-movements at the implant-abutment interface: measurements, causes and consequences. Implantologie, 15:31-45, 2007.

Table des matières

I.	<u>Introduction</u>	
I. 1.	Présentation de la microbiologie orale	1
I. 2.	Les biofilms oraux	1
I. 3.	Contrôle de la microflore orale par la salive	4
I. 4.	<i>Candida sp.</i> : aspects biologiques	10
I. 5.	Aspects cliniques : les candidoses	12
II.	<u>But du travail</u>	
II. 1.	<i>Candida sp.</i> et biomatériaux	17
II. 2.	Hygiène des prothèses dentaires	19
II. 3.	But des investigations	20
III.	<u>Matériel et méthodes</u>	
III.1.	<u>Matériel</u>	
III. 1.1.	Réactifs	21
III. 1.2.	Solutions	22
III. 1.3.	Gels oraux	23
III. 1.4.	Microorganismes	25
III. 1.5.	Biomatériaux	28
III.2.	<u>Méthodes</u>	
III. 2.1.	Dosage du peroxyde d'hydrogène par bioluminescence	30
III. 2.2.	Utilisation du système peroxydase	34
III. 2.3.	Courbe de croissance des levures en culture liquide	36
III. 2.4.	Comptage des levures sur milieu solide	36
III. 2.5.	Évaluation de la biomasse par un sel tétrazolé (MTT)	41
III. 2.6.	Adsorption de la peroxydase sur biomatériaux	45
III. 2.7.	Production expérimentale de biofilms à <i>Candida</i> sur biomatériaux	45
III. 2.8.	Investigations cliniques	47
III. 2.9.	Statistiques	51
IV.	<u>Résultats</u>	
IV. 1.	Effet du peroxyde d'hydrogène sur <i>Candida albicans</i>	53
IV. 2.	Effet d'un système peroxydasique sur <i>Candida albicans</i>	59
IV. 3.	Adsorption de la lactoperoxydase sur des biomatériaux	65
IV. 4.	Validation d'un modèle de biofilm à <i>Candida albicans</i>	71
IV. 5.	Effet des systèmes peroxydasiques sur les biofilms à <i>Candida albicans</i>	78
IV. 6.	Incorporation d'un système peroxydasique dans un gel oral	87
IV. 7.	Investigations cliniques	99
V.	<u>Discussion</u>	
V. 1.	Le système peroxydase dans la cavité orale	107
V. 2.	Les biofilms à <i>Candida albicans</i>	113
V. 3.	Effet du peroxyde d'hydrogène sur <i>Candida albicans</i>	118
V. 4.	Effet des systèmes peroxydasiques sur <i>Candida albicans</i>	121
V. 5.	Applications cliniques	123
VI.	<u>Conclusion et perspectives</u>	129
VII.	<u>Références bibliographiques</u>	131
VIII.	<u>Annexes</u>	
VIII.1.	Documents conçus pour les études cliniques	145
VIII.2.	Articles publiés	155

Liste des abréviations

a.u.	<i>arbitrary unit</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C	catalase
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU	<i>colony forming unit</i> (unité formatrice de colonie)
CMI	concentration minimale inhibitrice
COL	colostrum
CV	coefficient de variation
DO	densité optique
DTNB	<i>5,5'dithio-bis (2-nitrobenzoic) acid</i>
DS	déviati on standard
ESM	erreur standard sur la moyenne
g	gramme
G	glucose
GM+C	gentamycine + chloramphénicol
GOD	glucose-oxydase
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IU	<i>international unit</i>
l	litre
LF	lactoferrine
LPO	lactoperoxydase
LY	lysozyme
M	molaire
μ U	micro-unité
mol	mole
MTT	bromure de tétrazolium (<i>thiazolyl blue formazan</i>)
N	nombre de cas
nm	nanomètre
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PM	poids moléculaire
psi	<i>pound per square inch</i> (ancienne unité de pression)
RAT	<i>rice-agar-tween</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Sp.	<i>species</i>
XPS	spectroscopie photoélectronique à rayons X
U	unité

Formulaire

I ⁻	iodure
KI	iodure de potassium
SCN ⁻	thiocyanate
OI ⁻	hypoiodite
OSCN ⁻	hypothiocyanite

Glossaire

Activité enzymatique: Mesure de la vitesse de transformation d'un (ou plusieurs) substrat(s) en un (ou plusieurs) produit(s) par une enzyme. Une activité enzymatique s'exprime en unité internationale (IU, *International Unit*): 1 IU est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μ mole de substrat par minute à 25°C dans des conditions expérimentales données.

Activité spécifique : Activité enzymatique par mg de protéine purifiée.

Anomère du glucose: Stéréo-isomère optique du glucose après cyclisation déterminé par la position du groupe -OH du 1^{er} carbone (sous le plan équatorial du cycle pyranose pour la forme α et au-dessus pour la forme β).

Bioluminescence : Emission de lumière par des organismes vivants.

Blastoconidie : Cellule mycétales associée à la reproduction asexuée par bourgeonnement.

Blastospore : Ancienne terminologie équivalant à blastoconidie.

Champignon : Organisme uni- ou pluricellulaire eucaryote hétérotrophe dépourvu de structures permettant la photosynthèse. Les champignons pluricellulaires sont constitués de filaments (appareil végétatif), de spores (cellules de la reproduction sexuée) et de conidies (cellules de la reproduction asexuée).

Chimiluminescence : Emission de lumière au cours d'une réaction chimique, liée à des phénomènes d'oxydo-réduction.

Chloramphénicol : Antibiotique bactériostatique de la famille des phénicolés. Cet antibiotique à large spectre interfère dans la synthèse protéique bactérienne.

Filament: Synonyme de hyphe.

Fluide gingival : Liquide dérivé du plasma, présent au niveau du sillon gingivo-dentaire. Il comprend des ions (sodium, chlorure, phosphate, calcium, magnésium,...), des protéines (anticorps, complément, enzymes,...) et des cellules (polynucléaires neutrophiles). Il évacue des cellules épithéliales desquamées et des bactéries. Il constitue une source potentielle de défenses locales : sa quantité augmente lors de l'inflammation gingivale.

Gel buccal : Gel prescrit pour l'hygiène bucco-dentaire.

Gentamycine : Antibiotique bactéricide de la famille des aminoglycosides, inhibiteur de la synthèse protéique particulièrement actif contre les bactéries aérobies à Gram négatif mais inefficace vis-à-vis des bactéries anaérobies dans lesquelles il ne pénètre pas.

Hyphe: Structure filamenteuse d'un diamètre variant selon les espèces (d'environ 3 à 10 microns) faite de cellules mycétales juxtaposées. Les filaments peuvent être cloisonnés (septés) ou non (cellules coenocytiques).

Intrados de prothèse : Partie de la prothèse amovible au contact de la muqueuse.

Mesh : Unité de tamisage déterminant la taille maximale des particules traversant un grillage (dépendant du nombre de vides par *inch* carré).

Mycélium : Ensemble de filaments.

Mycète : Synonyme de champignon.

Levure : Champignon unicellulaire (à au moins un moment de son cycle de développement) se reproduisant par bourgeonnement ; les principales levures pathogènes en médecine humaine sont *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. *C. albicans* peut se présenter sous forme de blastoconidie (état commensal) ou sous forme filamenteuse (état parasitaire).

Microbiome : 1. Biologie moléculaire : ensemble des génomes des espèces microbiennes présentes dans un milieu. 2. Ecologie : environnement du microbiote.

Microbiote : Ensemble des espèces microbiennes présentes dans un site.

Peroxydase : Enzyme catalysant en présence de peroxyde d'hydrogène l'oxydation d'un substrat (halogénure, thiocyanate appelé parfois pseudohalogénure). La myéloperoxydase des neutrophiles, la lactoperoxydase bovine, la sialoperoxydase ou peroxydase salivaire, la lacrymoperoxydase sont quelques exemples de peroxydase dont les produits sont antimicrobiens.

Sabouraud : La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. On y ajoute parfois des antibiotiques (gentamycine et chloramphénicol) pour inhiber la croissance des bactéries qui auraient contaminé le milieu.

Syndrome de Gougerot-Sjögren : Pathologie chronique auto-immune qui se caractérise par un dysfonctionnement et une destruction des glandes exocrines, associée à un infiltrat lymphocytaire et à une hyperréactivité immunitaire. Les glandes salivaires et lacrymales sont les parties les plus atteintes, ce qui provoque chez les patients une sécheresse à la fois buccale (xérostomie) et oculaire.

Twitching : Mouvement qui consiste en des soubresauts désordonnés. Parfois observé chez des microorganismes.

Quorum sensing : Mécanisme de régulation de l'expression de gènes dépendant de signaux moléculaires sécrétés, auto-inducteurs à partir d'un seuil critique de concentration atteignable par plusieurs micro-organismes confinés dans un espace restreint.

Unité formatrice de colonie : Se dit de chaque micro-organisme donnant naissance à une colonie visible macroscopiquement après culture sur milieu solide (CFU en anglais pour *colony forming unit*).

Unité Mac Farland : Unité de turbidité dépendant de la concentration en sulfate de baryum et permettant d'apprécier grossièrement, par comparaison visuelle, la densité d'une suspension microbienne.

Xérostomie : Sécheresse des muqueuses orales par tarissement des sécrétions salivaires.

XPS : Méthode physique d'analyse de surface de matériau soumis à un bombardement de rayons X. Celui-ci permet d'extraire des électrons avec une énergie cinétique spécifique de l'atome dont ils proviennent.

Droits intellectuels

Tous droits afférents aux observations à partir desquelles cette thèse a pu être développée, sont et restent la propriété du Laboratoire d'Hormonologie Expérimentale de l'Université Libre de Bruxelles et du promoteur de cette thèse.

I. Introduction

Les professionnels de la santé et leurs patients ne tiennent pas toujours compte de la nécessité d'une hygiène rigoureuse pour limiter la croissance des levures sur les biomatériaux placés dans la cavité orale. Cette introduction fait le point des connaissances actuelles sur la colonisation des surfaces orales par *Candida* et ses effets nocifs pour la santé du patient édenté. L'essentiel de cette introduction a été publié dans la *Revue de Stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale* (cfr annexe).

I. 1. Présentation de la microbiologie orale

On décrit dans la cavité buccale plus de 700 espèces bactériennes distinctes, des virus, des levures et des protozoaires (Marsh & Martin, 2009). La recherche en biologie orale se préoccupe surtout des bactéries et des levures, moins des virus; elle néglige les protozoaires (Courtois *et al*, 1995). Les bactéries vivent en double équilibre: en équilibre mutuel et en équilibre avec les tissus bordant la cavité orale. Une bonne compréhension de la microbiologie bucco-dentaire ne peut donc s'obtenir que dans une perspective de "niches écologiques" et les pathologies infectieuses (caries dentaires, gingivites, parodontites, péri-implantites, infections des muqueuses) de la bouche doivent être considérées comme des ruptures d'un équilibre écologique. Les micro-organismes buccaux sont présents soit en suspension dans la salive soit organisés en biofilm adhérent aux surfaces orales.

I. 2. Les biofilms oraux

On appelle biofilm, un amas de microorganismes adhérent à un support, enrobés d'une matrice exopolysaccharidique (Filloux & Vallet, 2003). Des biofilms se constituent sur tout interface solide / liquide. Ils préservent l'intégrité du support mais parfois entraînent corrosion et détérioration, ce à des degrés divers et à des vitesses variables. Sur les tissus vivants, ils constituent une barrière protectrice pour le tissu sous-jacent contre les agressions physiques, chimiques, thermiques et biologiques; par contre lorsque l'organisme s'affaiblit et que ses défenses sont perturbées, les biofilms peuvent être des réservoirs microbiens à l'origine d'infections. La structure d'un biofilm

est tout à la fois hétérogène, micellaire, filtrante, évolutive; son pouvoir de concentration peut aller jusqu'à 10^6 pour certaines molécules comme l'oxygène par exemple.

On distingue 4 étapes dans l'évolution d'un biofilm (Filloux & Vallet, 2003):

- *une phase planctonique*: les microorganismes sont à l'état libre au sein du liquide dans lequel le support est immergé;
- *une phase d'adhérence au support (anchoring phase)* : des microorganismes de la phase liquide se fixent sur le support et y forment des communautés pionnières;
- *une phase de recouvrement (attachment phase)* : les communautés pionnières prolifèrent jusqu'à recouvrir toute la surface disponible du support avec formation d'une monocouche; ceci facilite la fixation d'autres microorganismes sur de nouvelles couches (*cfr 4^{ème} phase*);
- *une phase de croissance ou phase sessile (growing phase)*: la prolifération des microorganismes déjà fixés sur le support et l'attachement de nouveaux microorganismes augmentent l'épaisseur du biofilm (formation de polycouches).

Dans la littérature (Manuila *et al*, 1970), voire dans cette thèse, le mot phase est utilisé de façon ambivalente : soit il a une dénotation temporelle (phase signifie alors étape), soit il a une dénotation physico-chimique (phase signifie alors toute partie homogène rencontrée dans un système hétérogène).

Lors du développement en 4 étapes du biofilm, les premiers micro-organismes (surtout des bactéries) adhèrent à la surface du support essentiellement par les polysaccharides qu'ils secrètent. Ils se multiplient sur la surface du support et forment des colonies. Progressivement le biofilm s'épaissit et d'autres microorganismes (bactéries, levures) s'y incorporent. Il existe un équilibre dynamique entre les microorganismes planctoniques et les microorganismes du biofilm : certains peuvent se détacher et repasser à l'état planctonique, d'autres peuvent s'intégrer au biofilm. Les biofilms présentent des caractéristiques biochimiques propres à chacun d'entre eux;

ces caractéristiques évoluent sans cesse. La formation de communautés par les microorganismes semble s'accompagner de modifications métaboliques avec des *turn on / off* de gènes bactériens. Les microorganismes vivant dans un biofilm présentent une meilleure résistance aux antiseptiques / antibiotiques/ antifongiques.

Dans la bouche, seule la 4^{ème} étape de l'évolution des biofilms (*growing phase*) est considérée comme pathogénique; elle est liée aux apports d'oxygène (O₂) et de nutriments (par exemple le glucose ou le saccharose). Les phases précoces (*anchoring phase, attachment phase*), elles, ne sont pas liées à la consommation de glucose. L'adhérence initiale des bactéries au niveau du support (surfaces dentaires, matériaux, muqueuses) se fait par l'intermédiaire d'une pellicule de (glyco)-protéines salivaires qu'on appelle « *pellicule exogène acquise* ». Lors de la phase de croissance, les germes microbiens sont agglomérés dans une matrice constituée de leurs propres polysaccharides sécrétés et de (glyco)-protéines salivaires adsorbées. La structure de cette matrice influence la porosité du biofilm et la diffusion de molécules (nutriments, médicaments) dans l'épaisseur du biofilm. Sur les surfaces dentaires, les biofilms sont mieux connus sous le nom de plaque dentaire. Une anaérobiose s'installe dans les couches les plus profondes favorisant la colonisation par des microorganismes anaérobies stricts.

La nature des surfaces (muqueuses, biomatériaux prothétiques) à coloniser et les propriétés physiques des biofilms (température, potentiel rédox, tension en oxygène, nutriments disponibles) sont fort différentes d'un site à l'autre de la cavité orale. Les caractéristiques des surfaces sélectionnent les espèces bactériennes qui composeront le biofilm sus-jacent.

Ainsi, l'étude des biofilms en milieu buccal doit prendre en considération les micro-organismes, les supports (hydroxyapatite des dents, muqueuses orales ou biomatériaux prothétiques) ainsi que les (glyco)-protéines salivaires.

I. 3. Contrôle de la microflore orale par la salive

Les surfaces orales sont lubrifiées par la salive et les sillons gingivo-dentaires baignés par un fluide gingival (appelé créviculaire lorsque les sillons gingivo-dentaires sont pathologiquement distendus). Salive et fluide gingival charrient des éléments nutritifs permettant la croissance bactérienne mais aussi des facteurs antiseptiques qui la contrôlent / modulent. Salive et fluide gingival contribuent à former une pellicule facilitant l'adhésion de micro-organismes sur toute nouvelle surface de la cavité orale. La composition de cette pellicule varie d'un site à l'autre de la bouche (lèvres, joues, palais, langue, gencives, dents, sillons gingivo-dentaires). Les caractéristiques (nutriments, pH, potentiel rédox, pO_2 , pCO_2 , composition de la salive) de ces habitats se modifient sans cesse. Ces caractéristiques évoluent aussi au cours de la vie (éruption dentaire de la petite enfance, passage de la denture lactéale à la denture permanente, changements hormonaux de l'adolescence, perte et remplacement des dents, modification de la salivation) et dépendent des défenses de l'hôte ainsi que de la prise de médicaments. Des (glyco)-protéines anti-bactériennes des sécrétions salivaires ou du fluide gingival (ou créviculaire) s'incorporent dans la matrice des biofilms et contribuent au contrôle de l'équilibre écologique.

La salive contient une grande variété (Tableau I) d'agents antimicrobiens essentiels pour maintenir la santé buccale. Ce sont des protéines qui contrôlent la croissance des micro-organismes buccaux. Ces facteurs antimicrobiens sont divisés en deux groupes, les facteurs innés et les facteurs acquis. De plus, des facteurs de croissance agissent indirectement sur les biofilms, en synergie avec les agents antimicrobiens, par modification, cicatrisation et régénération des supports muqueux.

Facteurs innés
Agglutinines
Lactoferrine
Lysozyme
Mucines
Myéloperoxydase
Peroxydase salivaire
Protéines riches en histidine
Protéines riches en proline
Cellules phagocytaires
Lymphocytes NK
Facteurs acquis
Immunoglobuline A (IgA)
Immunoglobuline A sécrétoire (sIgA)
Immunoglobuline G (IgG)
Immunoglobuline M (IgM)
Facteurs de croissance
<i>Epidermal growth factor (EGF)</i>
<i>Platelet derived growth factor (PDGF)</i>
<i>Transforming growth factor (TGF)</i>
<i>Fibroblast growth factor (PGF)</i>
IGF I et II : <i>Insulin I & II growth factor</i>

Tableau I. Facteurs antimicrobiens salivaires.

Un certain nombre de situations telles que la prise de médicaments, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la radiothérapie, la chirurgie au niveau de la tête et du cou, le diabète, la fatigue, le stress, ... peuvent provoquer une diminution de la production de salive et donc une sécheresse de la bouche. Une conséquence de cette sécheresse est une altération de la santé bucco-dentaire. La bouche étant un point d'entrée important pour les germes, cette altération de la protection buccale peut aboutir à des infections profondes (abcès) ou systémiques (généralisées). Les substituts salivaires peuvent donc être d'une grande aide pour les sujets présentant ce genre de problème afin d'en prévenir les complications. L'industrie cosmétique s'ingénie à mimer la nature et à recréer des produits substitutifs de la salive, contenant des facteurs antimicrobiens de la salive ou d'autres sécrétions exocrines (comme le lait par exemple). Le Tableau II énumère quelques produits cosmétiques commercialisés (dentifrices, gels oraux, bains de bouche) qui incorporent ces facteurs antimicrobiens.

Ingrédients	Source	Zendium™	Oral Balance™	BioXtra™
Lactoperoxydase	lait	+	+	+
KSCN	KSCN solide	+	+	+
Glucose-oxydase	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+
Lysozyme	lait, blanc d'œuf	-	+	+
Lactoferrine	lait	-	+	+
Immunoglobulines	colostrum	-	-	+
Facteurs de croissance	colostrum	-	-	+

Tableau II. Ingrédients contenus dans des gels oraux.

Les peroxydases orales furent parmi les premiers agents antimicrobiens étudiés dans la salive. Elles catalysent l'oxydation d'un (pseudo)-halogénure par du peroxyde d'hydrogène en un composé (pseudo)-hypohalogéneux (Thomas *et al*, 1994). Les halogénures oxydés par les peroxydases sont le chlorure, l'iode et le bromure. Le thiocyanate (SCN^-) est aussi oxydé comme les halogénures : pour cette raison, il est cité parfois comme un pseudo-halogénure. Le chlorure est ainsi oxydé en hypochlorite (OCl^-), le bromure en hypobromite (OBr^-), l'iode en hypoiodite (OI^-) et le thiocyanate en hypothiocyanite (OSCN^-). Dans le compartiment salivaire (Thomas *et al*, 1994) et dans les biofilms oraux, la myéloperoxydase provient des neutrophiles des sillons gingivo-dentaires et la sialoperoxydase est sécrétée par les glandes salivaires. Les pseudo-hypohalogéneux sont des oxydants puissants capables d'inhiber la croissance bactérienne et celle des levures (comme *Candida albicans*). Le système H_2O_2 - SCN^- - sialoperoxydase contrôle la croissance des germes oraux : le thiocyanate est sécrété par les glandes parotides et sous-mandibulaires ; le peroxyde d'hydrogène est lui produit par les glandes salivaires, par les neutrophiles et par les germes commensaux de la bouche. Les peroxydases orales permettent non seulement le contrôle des bactéries présentes dans la cavité orale mais aussi la protection des tissus sous-jacents contre les agressions chimiques. En effet, le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries est détoxifié et les substances mutagènes / carcinogènes provenant de l'alimentation sont inactivées par les activités peroxydasiques. La Figure 1 résume la physiologie des peroxydases orales.

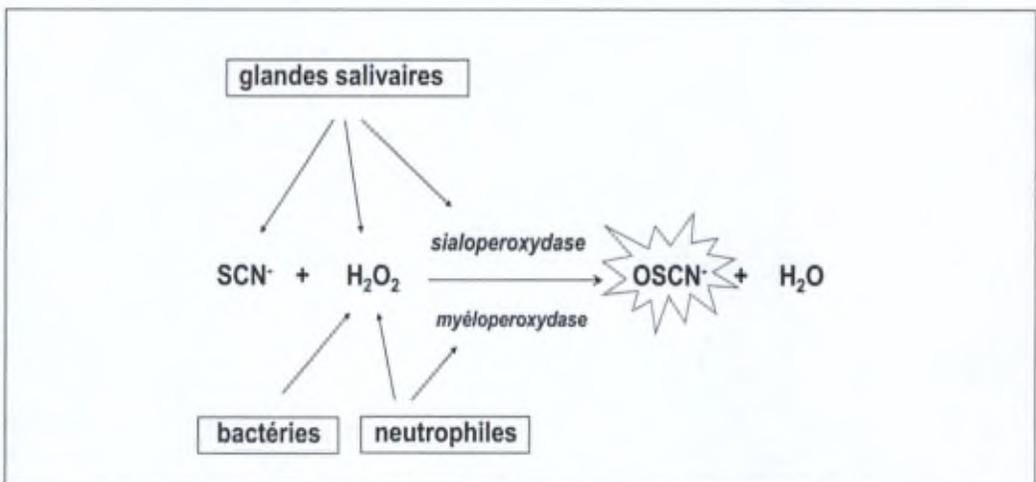


Figure 1. Les peroxydases orales.

Un système peroxydase est une formulation utilisée en biotechnologie permettant à une peroxydase de produire un produit oxydant doué d'effet biologique antimicrobien. Le peroxyde d'hydrogène, peu stable en solution, est ajouté sous forme d'un composé organique (peroxyde d'urée $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}\cdot\text{H}_2\text{O}_2$ ou peroxyde de magnésium MgO_2).

Le peroxyde d'hydrogène peut également être produit par une séquence enzymatique (glucose / glucose-oxydase). L'intérêt d'utiliser cette séquence est de pouvoir libérer le peroxyde d'hydrogène de manière continue dans le temps (durant plusieurs heures). Le produit hypo(pseudo)halogéneux exerce une activité antimicrobienne (Bosch *et al*, 2000). En effet, les hypohalogéneux formés sont de puissants oxydants antimicrobiens (antibactériens, antifongiques, antiparasitaires et antiviraux). Cependant, il est important de comprendre que, *in vivo*, un agent antimicrobien seul ne sera pas efficace contre tous les micro-organismes, vu l'existence de systèmes protecteurs spécifiques. Il faudrait davantage envisager des effets synergiques entre les agents antimicrobiens salivaires (innés et acquis) (Bosch *et al*, 2000 ; Courtois *et al*, 1995). Le système lactoperoxydase utilise deux enzymes : la glucose-oxydase qui est extraite de *Aspergillus niger* et la lactoperoxydase qui présente dans le lait, est extraite industriellement du lactosérum bovin. Comme montré dans le Tableau III, ce système permet la production d'un antimicrobien naturel: l'hypothiocyanite ou l'hypoiodite.

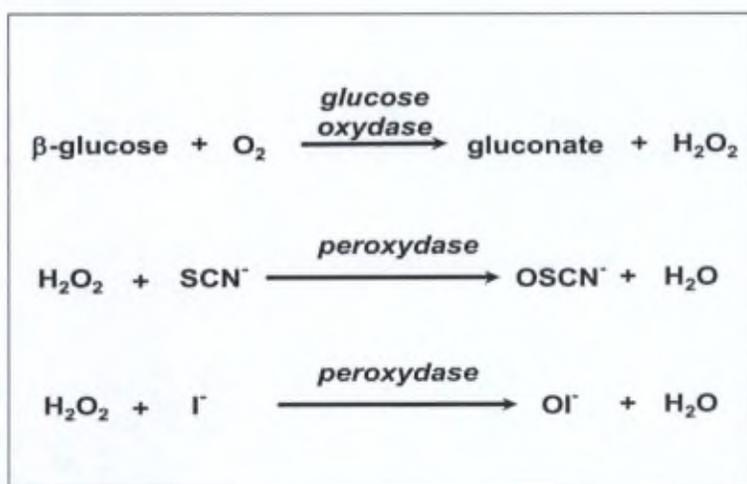


Tableau III. Systèmes peroxydases utilisés dans le cadre de cette thèse.

Le lysozyme est une enzyme que l'on rencontre dans un certain nombre de sécrétions (larmes, salive, ...) et dans le blanc d'œuf. C'est une hydrolase qui permet la destruction des peptidoglycanes des parois bactériennes. En effet, le lysozyme hydrolyse les liaisons covalentes entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine des peptidoglycanes. De par son activité, le lysozyme est surtout actif contre les bactéries Gram positif. En revanche, les bactéries Gram négatif sont généralement résistantes au lysozyme : elles possèdent, en effet, une couche externe de lipopolysaccharides (LPS) qui couvre la couche de peptidoglycanes et empêche donc l'accès de l'enzyme à son substrat.

La lactoferrine est une glycoprotéine antimicrobienne présente dans beaucoup de sécrétions exocrines telles que les larmes, la salive ou le lait. La lactoferrine est également présente dans les granules secondaires des polynucléaires neutrophiles: elle est libérée lors de la réponse inflammatoire dans l'environnement du foyer infectieux. La lactoferrine est purifiée surtout à partir du lait ; elle peut être produite par génie génétique. On la trouve en concentration plus élevée dans le lait des mammifères, y compris dans le colostrum (premier lait produit par le mammifère en période de lactation). La lactoferrine possède une activité antimicrobienne bactériostatique et bactéricide. L'activité antimicrobienne bactériostatique de la lactoferrine est due à son affinité élevée pour le fer libre trivalent (deux domaines de liaison par molécule) privant ainsi les microorganismes du fer présent dans le milieu. Son activité bactéricide est due à la production après protéolyse d'un métabolite : la lactoferricine. La lactoferricine est un petit peptide cationique ayant une activité antimicrobienne similaire aux défensines cationiques. La lactoferrine peut aussi réguler la réponse immune. En effet, de nombreux types cellulaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes,...) expriment des récepteurs à la lactoferrine. En interagissant avec ses récepteurs, la lactoferrine régule les réponses anti-inflammatoires en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires. Des auteurs (Singh *et al*, 2002) ont montré que de faibles concentrations de lactoferrine (inférieures à celles qui inhibent la croissance de certaines espèces bactériennes) produisent des mouvements bactériens (appelés *twitching*) empêchant leur incorporation à un biofilm.

Parmi les immunoglobulines, les IgA sécrétoires sont présentes dans la salive en quantité importante. On peut également y trouver des IgG et des IgM qui proviennent du fluide gingival. Les immunoglobulines sont des molécules dirigées spécifiquement contre les organismes étrangers. On les trouve également dans le colostrum. La composition de ce dernier est particulièrement riche en molécules antimicrobiennes, en immunoglobulines (IgA, IgG, IgM) et en facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance sont des peptides qui peuvent agir sur le support muqueux pour favoriser le détachement de cellules épithéliales superficielles et donc des biofilms qui y adhèrent. Les facteurs de croissance peuvent aussi se fixer sur les récepteurs spécifiques exprimés sur les cellules enflammées par le biofilm entraînant de ce fait un processus de cicatrisation.

1. 4. *Candida sp.* : aspects biologiques

Les levures du genre *Candida* sont des hôtes habituels de la cavité orale humaine (Odds, 1979 ; Cannon & Chaffin, 1999) : *Candida sp.* y est isolé en faible quantité chez 2 à 37 % des jeunes adultes en bonne santé (Odds, 1979 ; Brawner & Cutler, 1989). Les individus dont les défenses sont diminuées et dont la microflore orale est perturbée, peuvent développer une infection à partir de ce réservoir (Cannon *et al*, 1995). La colonisation de la bouche apparaît très tôt dans la vie ; des auteurs (Hannula *et al*, 1999 ; Rozkiewicz *et al*, 2006) ont montré que près de 40% des enfants sont porteurs du *Candida sp.* dès l'âge de 2 ans. Les appareils orthodontiques placés chez des adolescents s'accompagnent d'une augmentation du nombre de levures en bouche (Addy *et al*, 1982). Plus tard dans la vie, les levures colonisent les prothèses dentaires des patients édentés (Vandenbussche & Swinne, 1984, Marsh *et al*, 1992 ; Lyon *et al*, 2006).

Différentes espèces de *Candida* sont isolées dans la bouche : les plus fréquemment isolées sont *C. albicans*, *C. glabrata* (anciennement *Torulopsis glabrata*) et *C. tropicalis*. D'autres souches sont observées plus rarement : *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr* (Horgan & Powderly, 2003). *C. dubliniensis* est associé à des candidoses orales chez des patients infectés par le virus HIV (Kirkpatrick *et al*, 1998 ; Giammanco *et al*, 2002). Ces espèces colonisent les surfaces des

muqueuses orales sous forme de blastoconidies (cellules rondes bourgeonnantes de $\pm 4 \mu$ de diamètre) ; le passage au parasitisme se manifeste par la présence de filaments lors de l'envahissement des tissus (Borg & Rùchel, 1988). Les levures peuvent surinfecter les lésions de parodontites (Tanner & Stillman, 1993) ou de péri-implantites (Alcofarado *et al*, 1991; Leonhardt *et al*, 1999; Shibli *et al*, 2003). Des blastoconidies de *C. albicans* ont aussi été observées dans les tubuli dentinaires et dans les canaux dentinaires du système endodontique (Siqueira & Sen, 2004). *C. albicans* a aussi été retrouvé dans des caries profondes (Hagihara *et al*, 1988). Les cellules de *C. albicans* ont un haut potentiel acidogénique (produisant des acides) et sont aciduriques (résistant à un milieu acide). Elles peuvent croître lorsque le pH est compris entre 3 et 8 ; même si leur pH idéal est plutôt situé entre 5,1 et 6,9 (Odds & Bernaerts, 1994). Dans un environnement riche en hydrates de carbone, *C. albicans* va produire des acides acétique, formique, lactique ou propionique qui vont diminuer fortement le pH (Odds & Bernaerts, 1994), il produit également des protéases (Samaranayake *et al*, 1984) qui dégradent les fibres collagènes dentinaires (Hagihara *et al*, 1988) et les protéines salivaires humaines (Germaine *et al*, 1978). *C. albicans* est donc capable de créer un pH bas permettant cette activité protéolytique. Cette activité de protéase contribue à sa pathogénicité, les niches dans la cavité orale avec un pH très bas et des hydrates de carbone alimentaire étant fréquemment disponibles.

La salive protège les muqueuses orales contre les candidoses : la sécheresse de bouche (xérostomie) entraîne une augmentation du nombre de levures et du risque de candidoses orales (Horgan & Powderly, 2003). Les histatines salivaires (protéines sécrétées par les glandes salivaires, riches en histidine) inhibent les blastoconidies et la filamentation de la levure (Xu *et al*, 1991 ; Kavanagh & Dowd, 2004). D'autres protéines salivaires, le lysozyme et la lactoferrine, contribuent à diminuer la viabilité des blastoconidies (Samaranayake *et al*, 2001). Des études *in vitro* ont montré que *Candida albicans* était inhibé par des produits de peroxydases, que ce soit l'hypoiodite (Majerus & Courtois, 1992) ou l'hypochlorite (Tournay *et al*, 1993; Webb *et al*, 1995). Le peroxyde d'hydrogène à concentration dommageable pour les muqueuses (eau oxygénée à 3%) diminue de 90 % les spores de *C. albicans* en suspension (Tombes & Galluci, 1993). Les cellules épithéliales des muqueuses sécrètent des peptides appelés défensines doués de propriétés anti-*Candida* tel que diminution de l'adhérence, activité fongicide directe et inhibition de la filamentation (Feng *et al*, 2005; Jonard *et al*, 2006).

Les cellules épithéliales possèdent aussi à leur surface des récepteurs (famille des *Toll-like receptors* et des *C-type lectin receptors*) capables de se lier à *Candida* avec pour effet non seulement d'induire une réponse immunitaire innée mais aussi de moduler l'immunité cellulaire et humorale acquise (Weindl *et al*, 2010). Une fonction neutrophile adéquate protège l'organisme d'une invasion par *Candida*, d'une part en phagocytant les levures qui ont envahi un tissu et d'autre part en libérant du lysozyme, de la lactoferrine ainsi de la myéloperoxydase dans la salive. Enfin, la susceptibilité des patients HIV à une candidose orale plaide pour un rôle protecteur de l'immunité cellulaire (Challacombe & Naglik, 2006). De rares maladies soit des neutrophiles (maladie granulomateuse chronique) soit des lymphocytes T sont caractérisées par des infections dermiques et muqueuses récurrentes à *Candida* (Atkinson *et al*, 2000).

I. 5. Aspects cliniques : les candidoses

Les infections par les levures du genre *Candida* (Scully *et al*, 1994; Horgan & Powderly, 2003) sont appelées candidoses (anciennement moniliasés). L'envahissement des tissus par ces micro-organismes est responsable de nombreuses pathologies: des infections superficielles cutanées (intertrigo, onyxis et perionyxis, otite externe), gynécologiques, ophtalmiques (kératomycose) et des infections profondes du tube digestif, des bronches et des poumons. L'envahissement peut être généralisé à tout l'organisme. Dans la cavité orale, les levures peuvent provoquer différentes lésions des muqueuses (muguet, chéilite, perlèche, amygdalite, pharyngite). Le Tableau IV énumère les facteurs favorisant une candidose oropharyngée. L'utilisation des antibiotiques et le SIDA ont contribué à l'augmentation de la fréquence des candidoses orales (Soysa *et al*, 2008).

Symptomatologie (Horgan & Powderly, 2003)

La majorité de patients n'ont pas de plaintes ; certains se plaignent de sensation de brûlure, d'altération du goût ou de difficultés pour s'alimenter. L'examen clinique de la cavité orale montre des aspects variables.

La candidose pseudomembraneuse ou muguet apparaît sous forme de petites plaques blanchâtres sur les muqueuses; lorsque ces plaques sont grattées, la muqueuse érythémateuse sous-jacente peut légèrement saigner. Toutes les

muqueuses orales peuvent en être atteintes. Ces lésions doivent être différenciées de la leucoplasie ou du lichen plan.

– La candidose érythémateuse atrophique apparaît sous forme de plaques rouges sur le palais ou sur une langue atrophique décapillée. Cette forme de candidose est particulièrement associée à une xérostomie, des déficiences nutritionnelles ou des irritations locales; elle est souvent rencontrée chez les porteurs de prothèse.

Age	<ul style="list-style-type: none"> – enfance – vieillesse
Assuétudes	<ul style="list-style-type: none"> – tabagisme
Médicaments	<ul style="list-style-type: none"> – antibiotiques à large spectre – corticostéroïdes – chimiothérapie cytotoxique
Pathologie orale	<ul style="list-style-type: none"> – prothèses, appareillages orthodontiques – sécheresse de bouche (radiothérapie, prises de médicaments, maladie des glandes salivaires , ...)
Pathologie immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> – infection HIV – neutropénie – déficit de l'immunité cellulaire
Pathologie métabolique	<ul style="list-style-type: none"> – diabète
Pathologie nutritionnelle	<ul style="list-style-type: none"> – déficience en fer – malnutrition

Tableau IV. Facteurs favorisant une candidose (inspiré de Horgan & Powderly, 2003).

– La candidose hyperplasique concerne la langue, les commissures internes des lèvres ou la muqueuse vestibulaire. Ces lésions ne peuvent être détachées contrairement aux infections pseudomembraneuses. Deux facteurs associés particulièrement à cette candidose sont le tabagisme et le statut sécréteur du groupe sanguin (les non-sécréteurs sont plus susceptibles à l'infection: Thom *et al*, 1989; Lamey *et al*, 1991 ; Ben-Aryeh *et al*, 1995). Chez les patients chroniquement infectés, la nourriture ou le tabac peuvent colorer les lésions en brun.

Candida sp. peut aussi infecter les commissures des lèvres (chéilite angulaire ou perlèche) et produire des lésions fissurées associées à un inconfort, une brûlure ou une douleur. La complication majeure des candidoses oropharyngées est l'expansion à l'œsophage. Le diagnostic d'oesophagite peut être fait cliniquement chez des malades qui ont des symptômes tels que dysphagie ou douleur rétrosternale après un épisode de candidose oropharyngée.

Diagnostic (Horgan & Powderly, 2003)

Le diagnostic d'une candidose se fait par inspection de la cavité buccale. La recherche du microorganisme n'est pas toujours contributive puisque *Candida* est un commensal communément retrouvé en bouche. L'apparence de la lésion et la présence de levures à l'examen microscopique ne sont pas toujours suffisantes pour confirmer le diagnostic. Les grattages des lésions actives examinées avec 10% d'hydroxyde de potassium démontrent l'apparence caractéristique de pseudohyphes et de bourgeons de levures. La culture n'est pas nécessaire habituellement sauf si les lésions ne disparaissent pas avec la thérapie antifongique appropriée. Jadis, les laboratoires de microbiologie distinguaient *C. albicans* des autres espèces par un test de germination (ou filamentation). L'identification des autres espèces n'était pas réalisée en routine. Actuellement, la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet une identification rapide des espèces de *Candida* (Bader *et al*, 2010; Pinto *et al*, 2011). Les biopsies sont utiles et indiquées pour exclure une néoplasie.

Identification au laboratoire

Prélèvement. L'écouvillonnage des muqueuses orales ou des surfaces dentaires permet de récolter les levures qui y adhèrent. La recherche de levures peut aussi se faire après rinçage de la cavité orale.

Microbiologie. Les échantillons sont par la suite ensemencés sur un milieu de culture. Il existe différents milieux solides pour l'étude et l'isolement du *Candida*:

- le milieu de Sabouraud (Bridson, Oxoid manual, 1990), milieu universel: peptone 10 g/l, glucose 40 g/l et agar 15 g/l) dans lequel on incorpore un antibiotique à large spectre (chloramphénicol 0,1 g/l et/ou gentamycine 0.5 g/l) ainsi que de l'actidione (cycloheximide 0,001 % w/v) qui inhibe certains saprophytes ; il existe aussi un milieu de Sabouraud liquide (glucose 20 g/l),
- les milieux chromogéniques (Odds & Bernaerts, 1994 ; Perry & Freydière, 2007) dans lesquels des substrats d'enzymes de *Candida* permettent de différencier certaines espèces par la coloration des colonies,
- les milieux pauvres tel le *corn meal agar*, le *rice extract agar*, le *rice agar tween*, le *potato-carrot-bile agar* permettant d'observer outre eumycélium, pseudomycélium et blastoconidies, des chlamydoconidies spécifiquement pour *C. albicans* (Casal & Linares, 1981).

La conversion entre les différentes formes de *C. albicans* (blastoconidies ou pseudohyphes) peut être affectée par la température, le pH, le milieu gazeux, l'apport en nutriments, les conditions de croissance, par la présence d'un inducteur chimique comme du sérum, de la proline ou du N-acétylglucosamine (Odds, 1979; Buchan and Gow, 1991). Les deux formes ont été retrouvées chez des patients sains et malades ; pour certains auteurs, le lien de la forme pseudohyphes à la maladie est controversé (Gow & Gooday, 1987). Cependant, cette conversion est cliniquement importante car elle pourrait aider les cellules à proliférer et envahir les tissus, à tromper le système immunitaire par une altération de l'antigénicité de surface et à survivre à un traitement antifongique (Soll *et al*, 1987).

C. albicans produit des tubes germinatifs (test de germination ou filamentation) endéans les 60 minutes si on met une goutte de suspension de levures dans du sérum humain (ou de certains mammifères) placé à 37° C (Taschdjian *et al*, 1960 ; Hilmioglu *et al*, 2007).

Immunologie. De nombreux tests immunologiques reconnaissent tantôt la présence d'antigènes de *Candida sp.* (Marot-Leblond *et al*, 2006), tantôt d'anticorps (Clancy *et al*, 2008).

Biochimie. Des batteries de tests biochimiques (galerie API 20C AUX, RapID Yeast Plus System, VITEK Yeast Biochemical Card, ...) sont utilisées pour l'identification des espèces de *Candida* en se basant entre autre sur l'assimilation de différents sucres (Wadlin *et al*, 1999 ; Verweij *et al*, 1999). Récemment, l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet d'identifier rapidement les levures par comparaison de leurs spectres protéiques à des bibliothèques de référence (Bader *et al*, 2010; Pinto *et al*, 2011).

Biologie moléculaire. Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées dans les laboratoires spécialisés pour détecter, caractériser et identifier des souches de *Candida* (Williamsson *et al*, 1987 ; Williams *et al*, 1995 ; Basková *et al*, 2007).

Traitement

Ce paragraphe n'a pas la prétention d'exposer les traitements des différentes formes cliniques de candidoses, mais tente d'expliquer la nécessité de décontaminer les prothèses dentaires sans utiliser l'arsenal thérapeutique afin d'éviter l'émergence de souches résistantes. Il existe en effet une grande variété d'agents actifs pour le traitement des candidoses: polyènes, azoles, échinocandines. Le succès et l'utilisation préventive des premiers composés azoles chez les patients immunodéprimés (SIDA, ...) ont favorisé l'apparition de souches résistantes au miconazole (Carrilo-Muñoz *et al*, 1996), et au fluconazole (Ellepola & Samaranayake, 2000). La recherche pharmaceutique n'a cessé de développer des dérivés (itraconazole, voriconazole, posaconazole...) qui puissent échapper – fût-ce pour un temps – aux mécanismes adaptatifs des levures (Ellepola & Samaranayake, 2000). Tout comme pour les

antibiotiques, l'émergence de résistances aux antifongiques devient un problème de santé publique impliquant une prescription raisonnée de ces médicaments.

La Figure 2 illustre différents mécanismes envisagés dans la littérature (Prasad & Kapoor, 2005) pour expliquer la résistance aux azoles : inhibition d'enzymes de la voie métabolique de l'ergostérol, diminution de l'expression de certaines enzymes de cette voie, modification de la paroi de *Candida*, limitation de la diffusion des azoles au travers de la paroi, clairance par des pompes à azoles.

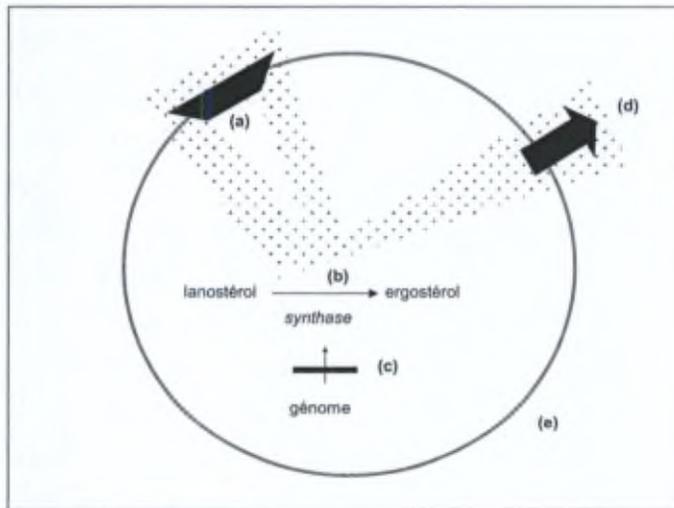


Figure 2. Mécanismes de résistance aux azoles (schéma original inspiré de Revankar & Graybill, *Antifungal Therapy in Anaissie et al. Clinical mycology*, 2003) : a) limitation de la diffusion des azoles au travers de la paroi, b) inhibition d'enzymes de la voie métabolique de l'ergostérol, c) diminution de l'expression de certaines enzymes de cette voie, d) clairance par des pompes à azoles, e) modification de la paroi de *Candida*.

II. But du travail

II. 1. *Candida sp.* et biomatériaux

Les biofilms (Dougherty, 1988 ; Filloux & Vallet, 2003) sont donc des communautés de microorganismes, soit de même espèce soit d'espèces différentes, maintenus dans une matrice polysaccharidique et qui se développent à la surface d'un support vivant (biotique) ou inerte (abiotique). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré la présence de la levure dans les biofilms sur cathéters (Dougherty, 1988), valvules

cardiaques artificielles (Utili *et al*, 2007), membranes biodégradables (Molgatini *et al*, 1988), fils de sutures (Merritt *et al*, 1999), prothèses dentaires amovibles (Vandenbussche & Swinne, 1984 ; Abu-Elteen & Abu-Elteen, 1998, Busscher *et al*, 2010) et matériaux de rebasage de prothèses (Kulak & Kazazoglu, 1998). Les biofilms à *Candida* sont associés à la colonisation des muqueuses digestives lorsque les défenses de l'hôte diminuent ; ils représentent un facteur de risque d'une candidose invasive. Ces microorganismes ainsi organisés se caractérisent par un phénotype distinct de celui exprimé en suspension et par une susceptibilité réduite aux antibiotiques ou antifongiques. Les souches invasives sont le plus souvent des souches capables de former des biofilms *in vitro* (Kuhn *et al*, 2002). *Candida albicans* produit plus de biofilm que *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* en terme de poids sec ; la structure architecturale observée en microscopie confocale (*confocal laser scanning microscopy*) est aussi plus complexe (Kuhn *et al*, 2002). Tous les traitements antifongiques actuels sont inefficaces ou peu efficaces contre les biofilms *in vitro* : les mécanismes de cette résistance sont encore mal compris. La matrice du biofilm ne paraît pas limiter la pénétration des molécules dans la mesure où les biofilms à *Candida* avec peu ou pas de matrice sont aussi résistants aux antifongiques. Par contre, des modifications du phénotype paraissent induire cette résistance en permettant par exemple l'expression de certains gènes liés aux pompes qui rejettent les drogues à l'extérieur des cellules (Prasad & Kapoor, 2005). Les membranes des levures organisées en biofilm contiennent moins d'ergostérol que celles des levures libres or les voies métaboliques de l'ergostérol constituent des cibles aux azoles. Les échinocandines (caspofungine et micafungine) qui sont des inhibiteurs de la synthèse de la matrice polysaccharidique, limitent la croissance des biofilms. L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens qui inhibent la synthèse des prostaglandines par les levures, inhibent aussi la croissance des biofilms. Le farnesol et le tyrosol sécrétés par l'ensemble des levures en biofilm atteignent un seuil critique (*quorum sensing*) avant d'induire des modifications morphologiques : le farnesol inhibe la formation des filaments tandis que le tyrosol la stimule (Chen *et al*, 2004).

II. 2. Hygiène des prothèses dentaires

Les prothèses dentaires offrent des surfaces à coloniser particulièrement propices à *Candida*. La stomatite prothétique reconnue comme complication chez les patients porteurs de prothèses (Ellepola & Samaranayake, 2000 ; Figueiral *et al*, 2007) est une inflammation chronique liée à une irritation mécanique ou à une colonisation de la prothèse par *Candida* associé à des bactéries. Elle est moins fréquemment liée à une réponse allergique au matériel prothétique qu'à une surinfection par *Candida* (Goon *et al*, 2006). S'il est absurde de vouloir éradiquer un commensal de son environnement, il est important de contrôler la croissance de *Candida* sur la prothèse pour prévenir une possible infection des muqueuses. Le brossage journalier reste le geste à encourager chez tous les porteurs de prothèse dentaire: il existe sur le marché des brosses spécifiquement pour les prothèses. Lors d'une candidose, la décontamination de la prothèse devient un versant obligé du traitement. Souvent, l'entourage - famille ou personnel soignant - doit suppléer aux difficultés (perte d'autonomie, de dextérité, de mémoire) que rencontrent les personnes âgées. Les antimycosiques doivent être réservés au traitement général du patient ; ils sont moins actifs contre les biofilms sur prothèse et peuvent engendrer l'émergence de résistance. L'utilisation de solutions antiseptiques rencontre un grand succès : beaucoup d'entre elles sont fongicides. Cependant des études comparatives qui examineraient toutes les facettes du problème font défaut. Rarement, sinon jamais, les auteurs prennent-ils en compte les points de vue de tous les professionnels qui interviennent : celui du dentiste qui soigne le patient, celui du prothésiste qui voit les éventuels effets délétères des procédures de décontamination et celui du microbiologiste qui étudie les levures *in vitro*. Les microbiologistes déterminent des concentrations minimales inhibitrices de la croissance de *Candida* sur des suspensions ou mieux (mais plus rarement) sur des biofilms à *Candida* fabriqués au laboratoire ; les prothésistes envisagent les relations entre leurs matériaux, les biofilms et les procédures de décontamination ; les cliniciens prescrivent des traitements mais manquent d'études cliniques (donc *in vivo*) fiables réalisées à grande échelle.

Beaucoup de molécules antiseptiques incorporées dans des bains de bouche ou dans des tablettes effervescentes sont candidacides. L'hypochlorite de sodium – composé majeur de l'eau de Javel et aussi produite *in vivo* par la myéloperoxydase –

présente un effet anti-*Candida*. L'eau ozonée avec ou sans ultrasons réduit les levures adhérentes à la résine. L'utilisation des ultrasons réduit les concentrations nécessaires de la plupart des antimycosiques ou antiseptiques fongicides. L'utilisation de four à micro-ondes n'est pas conseillée car les conditions qui suppriment les levures sont trop proches de celles qui abîment la prothèse. Mal utilisés, certains produits peuvent endommager les matériaux : l'usage répété de chlorhexidine colore les résines en brun, l'hypochlorite à forte dose les blanchit. L'eau oxygénée n'est active qu'à dose très élevée proche de la toxicité pour les muqueuses ; les *Candida* s'y adaptent en exprimant davantage de catalase et de glutathion-réductase (Vuddakul *et al*, 1989 ; Gonzales-Parraga *et al*, 2003). L'utilisation de molécules des sécrétions exocrines est une voie de recherche intéressante : des études *in vitro* (Majerus & Courtois, 1992; Tournay *et al*, 1993) ont déjà montré le bénéfice des systèmes peroxydases (avec du thiocyanate, du chlorure et surtout de l'iodure), du lysozyme et de la lactoferrine. Mais la transposition de ces données *in vitro* à l' *in vivo* ne donne pas encore les résultats escomptés tant la complexité du milieu oral est grande.

II. 3. But des investigations

Ce travail avait 2 objectifs :

1°) analyser *in vitro* les interactions entre *Candida albicans* et les surfaces des biomatériaux utilisés couramment en implantologie et en prothèse dentaires ;

2°) proposer un modèle clinique qui puisse permettre d'évaluer *in vivo* l'utilisation des peroxydases pour contrôler les biofilms à *Candida sp.*

Se focaliser ainsi sur les interactions entre un seul germe (*Candida albicans*), deux supports (le titane et la résine) et un mécanisme de régulation (le système peroxydase) équivaut à réduire la complexité de l'environnement oral. Cette thèse s'attache à l'étude et au contrôle des biofilms à *Candida albicans*, et non au traitement des candidoses. Elle se centre sur la prévention des effets délétères de ces biofilms. En aucun cas, elle ne vise à proposer de nouveaux traitements antifongiques.

III. Matériel et méthodes

III. 1. Matériel

III.1. 1. Réactifs

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM: 147,02 ; UCB™, référence 1226, Bruxelles, Belgique)
- Catalase: Cette enzyme (E.C.1.11.1.6) provenait de foie bovin (Sigma™, référence C-40, St-Louis, Etats-Unis). L'activité spécifique était 19 900 U / mg de poudre. Une unité est définie par le fabricant comme étant la quantité d'enzyme capable de décomposer 1 μmole de H_2O_2 par min à pH 7 et à 25° C lorsque la concentration en H_2O_2 décroît de 10,3 à 9,2 mM.
- Cystéine (PM : 175,6 ; Sigma™, référence C-7880, St-Louis, USA)
- D-Glucose (PM: 180,16; Merck™, référence 8337.0250, Darmstadt, Allemagne)
- DTNB: (PM: 396, 3, Sigma™, référence D-8130, St-Louis, Etats-Unis)
- Glucose-oxydase: Cette enzyme (E.C.1.1.3.4) isolée à partir de *Aspergillus niger* (Sigma™, référence G-7141, St-Louis, Etats-Unis) avait une activité spécifique de 157,5 U/mg de poudre; elle présentait une légère activité catalase (rapport des activités glucose-oxydase / catalase équivalant à 250:1). Une unité de GOD est définie comme la quantité d'enzyme capable d'oxyder 1 μmole de β -D-glucose en gluconate à pH 5,1 et à 35° C dans les conditions expérimentales décrites par le fabricant.
- HCl (2 M ; Merck™, référence 109063 , Darmstadt, Allemagne)
- Iodure de potassium ou KI (PM : 166,01; Merck™, référence 1089941, Darmstadt, Allemagne)
- Isopropanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$; 0,78 kg/l ; PM : 60,10 ; Merck™, référence 9634; Darmstadt, Allemagne)
- KCl (PM: 74,56; Merck™, référence 1.04936, Darmstadt, Allemagne)
- KH_2PO_4 (PM: 136,09 ; Merck™, référence 4873, Darmstadt, Allemagne)
- KSCN ou thiocyanate de potassium (PM: 97,18; Merck™, référence 5125, Darmstadt, Allemagne)

- Lactoperoxydase : Cette enzyme (E.C. 1.11.1.7) isolée à partir de lait bovin (Biopole™, Les Isnes, Belgique) avait une activité spécifique de ~ 12 U_{ABTS}/mg de poudre.
- Lucigénine (Sigma™, référence M8010, St-Louis, Etats-Unis)
- MgCl₂.6H₂O (PM: 203,3; VEL™, référence 1426, Leuven, Belgique)
- MTT (Sigma Aldrich™, référence 135038, Schnelldorf, Allemagne)
- Na₂HPO₄.H₂O (PM: 177,99; Merck™, référence 1.06580, Darmstadt, Allemagne)
- NaCl (PM: 58,44; Merck™, référence 1.06404, Darmstadt, Allemagne)
- Peroxyde d'hydrogène : le titre de la solution mère d'H₂O₂ (Perhydrol®, référence 1.07209, Merck™, Darmstadt, Allemagne) fut régulièrement déterminé par la procédure reprise à la page 31.

III. 1. 2. Solutions

Toutes les solutions furent stérilisées sur filtres Millipore™ 0,2 µ avant utilisation.

- Le milieu de culture liquide de Sabouraud (Oxoid™, CM147, Basingstoke, Grande-Bretagne) est recommandé pour la culture de *Candida albicans* et la détermination de l'activité de molécules antifongiques. Le Tableau V décrit sa composition : hydrolysats tryptiques de caséine (5 g/l), peptone pepsique de viande (5 g/l) et glucose (20 g/l soit 111 mM). Le bouillon de Sabouraud se prépare par dissolution de 30 g de milieu dans 1 l de H₂O. La stérilisation se fait à haute pression entre 10 et 20 psi pendant 15 min. Après refroidissement, il peut être conservé à 4° C au moins 1 semaine.

	concentration (g/l)
hydrolysats tryptiques de caséine	5,0
peptone pepsique de viande	5,0
glucose	20,0
pH	5,7 ± 0,2

Tableau V. Composition du milieu liquide de Sabouraud (Oxoid™).

- D-glucose: 80 mg / ml de bouillon (contenant déjà du glucose) ou d'un autre solvant (le plus souvent H₂O) ; parfois l'anomère α -D-glucose fut utilisé afin de mieux contrôler le déclenchement de l'activité de la glucose-oxydase.
- glucose-oxydase: 12,6 U/ml (80 μ g / ml de bouillon)
- lactoperoxydase: \sim 9,6 U_{ABTS} / ml de bouillon ou H₂O
- KSCN 12 mM : 1,2 mg/ml de bouillon ou H₂O
- KI 12 mM : 2 mg/ml de bouillon ou H₂O
- solution de Dulbecco (D-PBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) à pH 7,40: *cfr* Tableau VI
- thiocyanate : 12 mg / 10 ml de bouillon ou H₂O
- iodure : 20 mg / 10 ml de bouillon ou H₂O
- lucigénine : 6 mg / 100 ml H₂O

produit	PM	g/l	concentration (mM)
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	0,132	0,9
KCl	74,56	0,200	2,7
KH ₂ PO ₄	136,08	0,200	1,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	203,3	0,100	0,5
NaCl	58,44	8,000	140
Na ₂ HPO ₄	141,95	1,150	8

Tableau VI. Composition du PBS (formule de Dulbecco).

III.1.3. Gels oraux

Les composants du système peroxydase furent incorporés dans un gel qui consistait en polyglycérol méthacrylate polymérisé, amidon, hydroxyéthylcellulose et eau (formulation protégée par un brevet, Biopole™). Ce gel était conditionné en sachet de 5g ou en tube de 30 g.

La préparation des gels la veille de l'expérience :

- peser stérilement (port obligatoire d'un masque, de gants et flambage des spatules à l'alcool avant le prélèvement des différentes poudres) :
 - o 75 mg de α -D-glucose dans un tube Falcon stérile de 50 ml (utiliser une spatule passée à l'alcool et flambée) : préparer ainsi 4 tubes différents, conserver les tubes fermés à température ambiante ; éviter l'humidité ;
 - o 156 mg de KSCN dans un tube Falcon de 15 ml;
 - o 260 mg de KI dans un tube Falcon de 15 ml;
 - o 583 U de GOD dans un petit flacon stérile (conserver à -18° C);
 - o 1680 U_{ABTS} de lactoperoxydase (LPO) dans un petit flacon stérile bouché dans lequel se trouve une puce magnétique stérile (conserver à 4° C);
- mettre en solution les réactifs (stérilement) :
 - o KSCN 156 mg dans 1 ml d'eau déminéralisée stérile à 4° C;
 - o KI 260 mg dans 1 ml d'eau déminéralisée stérile à 4° C;
- préparer des seringues de 20 ml de gel et les conserver à 4° C;

Le jour de l'expérience

- préparer les gels en chambre froide
- mettre en solution les réactifs (stérilement) :
 - o lactoperoxydase dans 1 ml d'eau déminéralisée à 4° C
 - o GOD dans 148 μ l d'eau déminéralisée stérile à 4° C (pour avoir une concentration finale de 40 μ g/ml dans le gel);
- diluer la solution de GOD pour obtenir les différentes concentrations finales voulues;
- prélever 150 μ l de chaque solution de GOD à différentes concentrations et les diluer avec 150 μ l d'eau déminéralisée contenant la LPO;
- garder les réactifs à 4° C;
- peser dans un tube contenant de l' α -D-glucose:
 - 3 mg de lysozyme ;
 - 3 mg de lactoferrine ;
 - 7,5 mg de colostrum.

Les produits congelés doivent être mis à température ambiante avant d'être ouverts pour éviter toute condensation, ce qui amènerait humidité et anomérisation précoce de l' α -D-glucose.

- ajouter exactement 29,88 g de gel froid dans un tube Falcon contenant l' α -D-glucose (mettre le tube Falcon dans de la glace pilée);
- ajouter les réactifs froids comme indiqués dans le tableau VII;
- mélanger avec un fouet électrique jusqu'à homogénéisation des réactifs (la qualité du mélange est importante) ;
- remplir stérilement une seringue de 20 ml avec le mélange (travailler à froid et garder la seringue dans de la glace pilée);
- à température ambiante près d'un bec Bunsen, délivrer 2 g de gel froid sur une boîte de Sabouraud nappée de *Candida*; étendre le gel à l'aide d'un râteau pour étalement (N = 6);
- procéder de la même façon avec le gel suivant;

	<i>nil</i>	gel A	gel B	gel C	gel D
	blanc	gel contrôle	G/GOD/SCN/LPO	G/GOD/I/LPO	G/GOD/SCN/LPO COL/LYS/LF
gel (g)	-	29,88	29,88	29,88	29,88
KSCN (μ l)	-	-	30	-	30
KI (μ l)	-	-	-	30	-
H ₂ O (μ l)	-	120	30	30	30
GOD/LPO (μ l)	-	-	60	60	60

Tableau VII. Description des différentes conditions testées sur *C. albicans* ATCC 10231 pour évaluer l'effet de la GOD en présence d'un système peroxydasique.

III. 1. 4. Microorganismes

La souche *Candida albicans* ATCC 10231 a été cultivée à partir d'une anse bactériologique pré-ensemencée et commercialisée sous le nom de Culti-Loops™ (Oxoïd™, Basingstoke, Grande Bretagne). Après ouverture de l'emballage sous hotte (biosécurité : classe II), la souche est étalée sur milieu solide (agarose) de Sabouraud contenant de la gentamycine et du chloramphénicol (Becton Dickinson™, Franklin Lakes, Etats-Unis). Toutes les expériences ont été réalisées sur le troisième repiquage (3^{ème} subculture) après une incubation de 24 h à 37° C en aérobiose. Les boîtes du deuxième repiquage étaient conservées à 4° C. L'élimination des cultures et du matériel contaminé respectait les consignes de sécurité pour les micro-organismes de classe II.

Des isolements de souches sauvages ont été réalisés à partir d'écouvillonnages de prothèses et de muqueuses orales (palais et vestibules).

Caractères cultureux.

Les caractères cultureux de cette souche sont résumés dans le Tableau VIII. Les colonies de *C. albicans* sur milieu Sabouraud / Gentamycine / Chloramphénicol sont planes et de forme circulaire (1 à 4 mm de diamètre après 24 - 48 h), à bord régulier, de couleur blanchâtre (Photographie 3); on compare souvent l'aspect des colonies à des taches de bougie.

Milieu de culture solide	Description des colonies sur milieu solide après 24 h à 37° C	Examen à frais des cultures
Sabouraud/Gentamycine/ Chloramphénicol	<ul style="list-style-type: none"> - circulaires (1-4 mm Ø) - couleur blanchâtre (non spécifique) - surface plane, cireuse - à bord régulier 	<ul style="list-style-type: none"> - blastoconidies (4-8 µm Ø)
ChromAgar™	<ul style="list-style-type: none"> - circulaires (1-4 mm Ø) - couleur vert turquoise (spécifique) - surface plane, cireuse - à bord régulier 	<ul style="list-style-type: none"> - blastoconidies (4-8 µm Ø)
Rice Cream Agar	<ul style="list-style-type: none"> - circulaires (1-4 mm Ø) - non colorées (identiques à la gélose) - surface plane - à bord régulier 	<ul style="list-style-type: none"> - pseudohyphes - blastoconodies - microconidies - chlamydoconidies (spécifiques)

Tableau VIII. Quelques aspects cultureux de la souche étudiée.

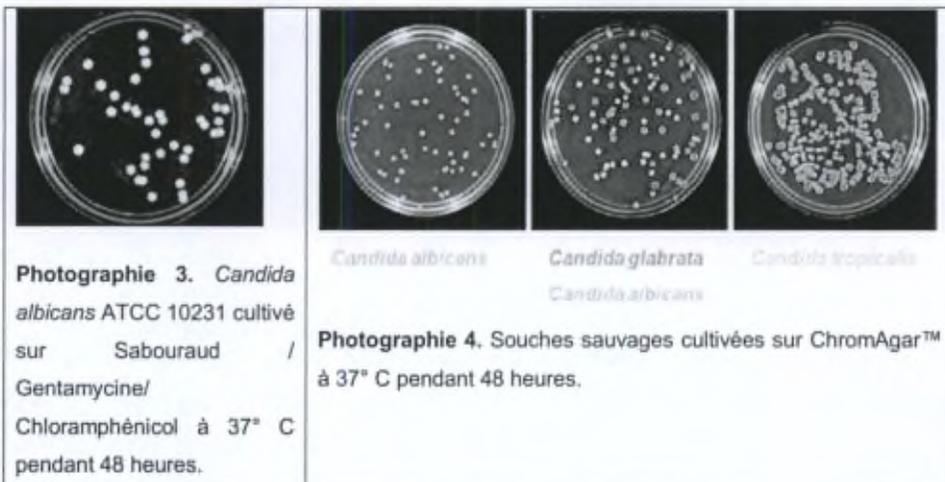


Photographie 1. Blastoconidies (microscopie à balayage, X 6000).

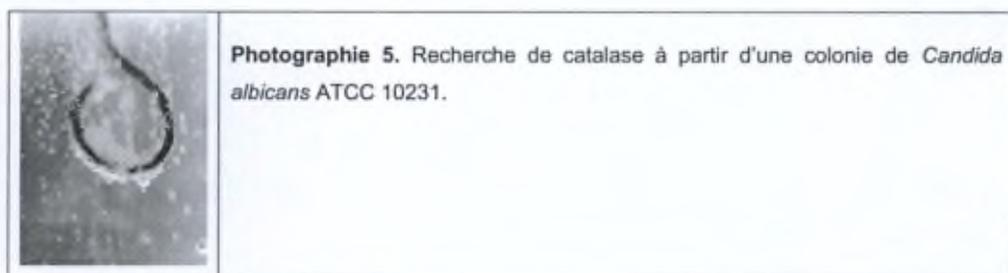


Photographie 2. Hyphes et chlamydoconidies (contraste de phase, x 500).

© Clinical Mycology. Anaissie *et al.* Churchill Livingstone, 2003.

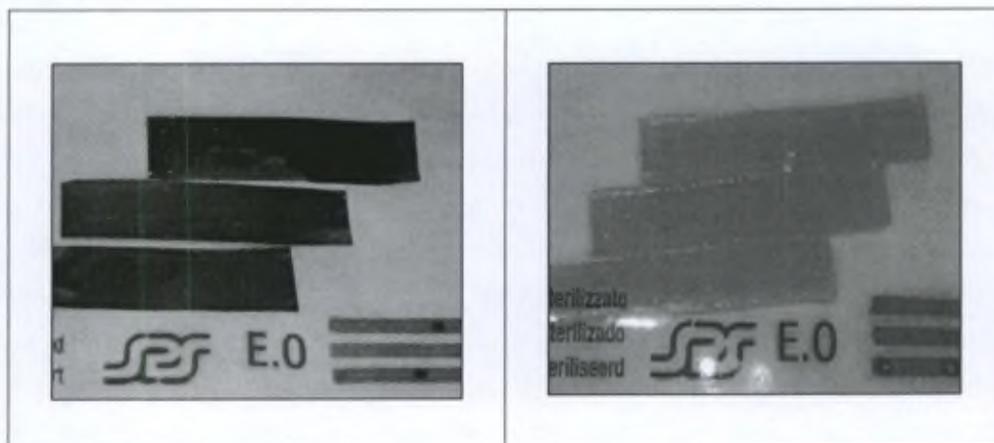


La culture sur milieu de type ChromAgar™ (Odds & Bernaerts, 1994), la formation de tubes germinatifs dans le sérum en 1-4 heures et la formation de chlamydoconidies sur milieu pauvre (par exemple *Rice Cream Agar*) sont les tests spécifiques habituels pour identifier *Candida albicans*. Les tests biochimiques (galerie API) permettent de confirmer l'identification et de reconnaître les autres espèces lorsque les premiers tests sont négatifs (autre couleur sur Chromagar™, pas de formation de tubes germinatifs ni de chlamydoconidies dans les conditions *ad hoc*). La coloration de Gram d'un examen à frais est positive. La présence de catalase chez *Candida albicans* fut confirmée en plongeant une colonie prélevée au moyen d'une anse bactériologique dans du Perhydrol™ dilué 10 fois (NaCl 0,9 %). Un dégagement gazeux témoignait d'une libération d'oxygène par la souche prélevée (photographie 5).



III. 1. 5. Biomatériaux

Le titane est un élément chimique métallique de numéro atomique 22 et de symbole Ti. C'est un métal de transition, léger, solide, d'un aspect gris métallique qui résiste bien à la corrosion. La biocompatibilité et les propriétés mécaniques de ce matériau en ont fait un composant de choix pour les prothèses enfouies (partiellement ou totalement) dans les tissus. Dans les expériences décrites ci-dessous, il a été utilisé sous forme de poudre (Alfa Aesar™, Karlsruhe, Allemagne) de 325 mesh et sous forme de feuilles de 25 microns d'épaisseur (Advent™, Oxford, Grande-Bretagne) (photographie 6).



Photographies 6. Feuilletts de titane et de résine après stérilisation gazeuse (oxyde d'éthylène).

Lors des différentes investigations avec des feuilles de titane, des languettes de 25 mm sur 5 mm (épaisseur 0.025mm) furent découpées et pesées dans un tube préalablement taré. L'algorithme suivant a été utilisé pour évaluer la surface totale (mm^2) mise en contact avec la peroxydase :

$$S = \underbrace{\left[\frac{m}{\rho} \cdot \frac{1}{h} \right] \cdot 2}_{\text{surface d'une base}} + \underbrace{[2 (h \cdot L) + 2 (h \cdot l)]}_{\text{surfaces latérales}}$$

$\underbrace{\hspace{15em}}_{\text{surface des deux bases}} \quad \underbrace{\hspace{15em}}_{\text{surfaces latérales}}$

$\underbrace{\hspace{25em}}_{\text{surface totale}}$

- où S : surface totale (mm²)
 m : masse de la languette (mg)
 ρ : masse volumique (4,544 mg/mm³)
 h : épaisseur de la languette (0,025 mm)
 L : longueur de la languette (mm)
 l : largeur de la languette (mm)

Le deuxième terme de l'algorithme est négligeable par rapport à la surface des deux bases car celui-ci n'exprime que 0,6 % de la surface totale.

La surface des languettes de titane fut analysée par spectrométrie photoélectronique à rayons X ou XPS (Briggs & Seah, 1983). Les électrons des orbitales les plus périphériques des atomes sont caractérisés par leur énergie de liaison au noyau. Le spectromètre mesure l'énergie cinétique des électrons périphériques extraits par un bombardement de rayons X. L'énergie de liaison est déduite de la loi de conservation de l'énergie d'Einstein. Les éléments atomiques composant la surface du matériau sont identifiés par des spectres spécifiques d'énergie de liaison.

Deux types de résines (polyméthacrylate de méthyle) pour prothèse ont été étudiées (Vertex soft™ et Vertex rapid simplified™, Vertex Dental, Zeist, Pays-Bas) avec ou sans vernis (Palaseal™, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Allemagne). Les pièces en résine (épaisseur ~ 2 mm, taille 25 mm x 5 mm) ont été utilisées selon les instructions du fabricant. La masse de chaque pièce en résine (photographie 6) était en moyenne de 222 ± 19 mg (moyenne ± SD, N = 96) avec un coefficient de variation de 8.35 %.

III. 2. Méthodes

III. 2. 1. Dosage du peroxyde d'hydrogène par chimiluminescence

La concentration en H_2O_2 produit enzymatiquement a été évaluée par une méthode de chimiluminescence à la lucigénine. Cette molécule est oxydée en milieu basique par le peroxyde d'hydrogène en 2 molécules de N-méthyl-acridon avec libération de photons.

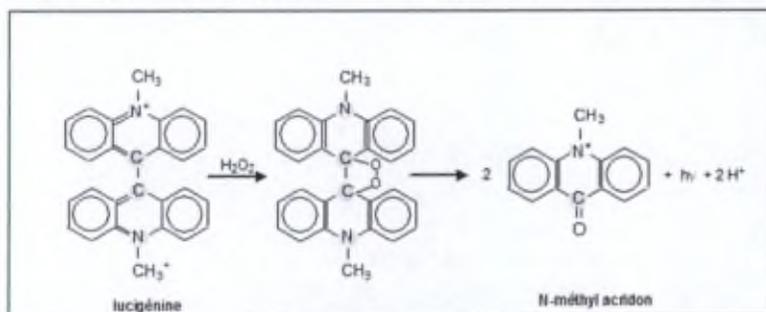


Figure 3. Chimiluminescence de la lucigénine en présence de H_2O_2 .

Préparation des standards

Les standards de peroxyde d'hydrogène provenaient de dilutions d'une solution titrée de Perhydrol™. La méthode de titrage est la suivante :

Titration du Perhydrol™ 30 % (Beutler, 1971)

Réactif

- Perhydrol™ 30 % Merck référence n° 1072.09.0250

Solution

- Tampon phosphate 0,1 M pH 7,0

Procédure

- Prendre 0,9 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,0
- Mesurer la D.O. dans une cuvette en quartz à 230 nm (D.O. $_1$)
- Ajouter 0,1 ml de H_2O_2 30% dilué 100 fois dans le tampon phosphate
- Mesurer la D.O. à 230 nm (D.O. $_2$)

Calcul

$$C \text{ (mM)} = [(D.O._2 - D.O._1) / \square] \times FD$$

Où $\square = 0,071 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

FD = facteur de dilution (1000 fois)

A partir du flacon titré (par exemple : 9,7 M), des dilutions dans de l'eau ont permis de disposer de solution 0,1 M, 1 mM et 200 μM en H_2O_2 :

- H_2O_2 0,1 M : 0,1 ml Perhydrol + 9,6 ml de H_2O

- H_2O_2 1 mM : 100 μL H_2O_2 0,1 M + 9,9 ml de H_2O
- H_2O_2 200 μM : 1 ml H_2O_2 1 mM + 4 ml de H_2O

A partir de la solution 200 μM , différents standards de 0 à 200 μM ont été réalisés *ex tempore* comme indiqué dans le tableau IX.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM)	solution H_2O_2 200 μM (μl)	H_2O (μl)
0	-	1000
10	50	950
25	125	875
50	250	750
100	500	500
150	750	250
200	1000	-

Tableau IX. Préparation de la courbe de calibration en H_2O_2 .

Procédure du dosage par chimiluminescence

Les cuvettes réactionnelles furent préparées *ex tempore* comme indiqué dans le Tableau X. Le mélange des réactifs fut standardisé : cuvette recouverte d'un parafilm et Vortex à mi-puissance pendant 5 secondes. La chimiluminescence fut mesurée avant et après l'ajout du standard ou de l'échantillon.

Réactif	volume (μl)
Na_2CO_3 (50 mM, ajusté avec HCl 1 N pH 10,40)	100
H_2O	200
lucigénine (6 mg / 100 ml H_2O)	100
solution contenant H_2O_2	200

Tableau X. Dosage de H_2O_2 par chimiluminescence.

Caractéristiques de la procédure

la lucigénine (NN'-diméthyl-9,9'biacridinium dinitrate) est une molécule chimiluminescente en présence de H_2O_2 mais pas en présence des produits des peroxydases (Archer et al., 1989 ; Yamaguchi et al., 2010). La chimiluminescence produite par la lucigénine est proportionnelle à la concentration en H_2O_2 : les limites de

linéarité étaient comprises entre 10 μM et au moins 200 μM . La Figure 4 montre une droite d'étalonnage représentative d'une expérience ; chaque standard a été dosé en triplicat. L'analyse de la précision montrait des coefficients de variation inférieurs à 3,1 % pour les standards compris entre 25 et 200 μM . Les coefficients d'exactitude étaient quant à eux inférieurs à 6,9 % pour ces mêmes concentrations. Le signal chimiluminescent en présence de H_2O_2 10 μM était déjà reproductible et exact avec un coefficient de variation et un coefficient d'exactitude de 13,7 et 10,5 % respectivement : cette concentration de 10 μM fut considérée comme limite de sensibilité (définie comme la plus petite concentration mesurable avec précision et exactitude). Une solution de 1000 μM en H_2O_2 put être dosée ($N = 3$) avec des coefficients d'exactitude et de variation inférieur à 5 % en choisissant un étalon de 200 μM comme référence. Une droite d'étalonnage fut réalisée conjointement à chaque série de dosage.

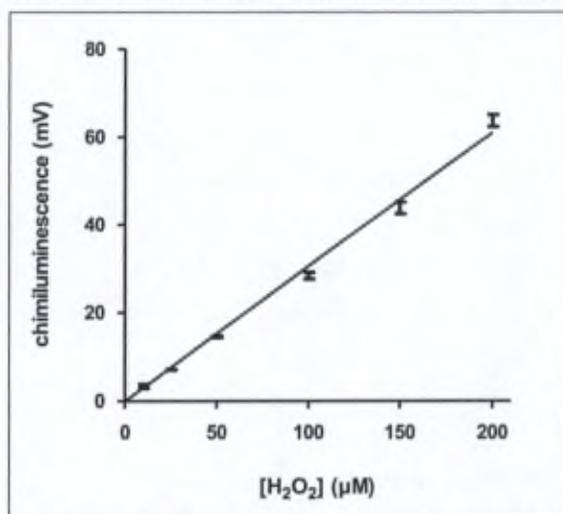


Figure 4. Droite d'étalonnage de l' H_2O_2 dosé par chimiluminescence. Chaque standard est dosé en triplicata. Equation de la droite de régression linéaire: $y = 0.30x$. Coefficient de régression : $r = 0,9973$.

La lucigénine en poudre doit être conservée sous azote à l'abri de l'air. L'intensité du signal chimiluminescent de la lucigénine conservée en solution (6 mg / 100 ml *in* H_2O) diminue d'un jour à l'autre, d'autant plus si elle n'est pas conservée à l'abri de la lumière: la figure 5 montre la diminution statistiquement significative de la chimiluminescence en présence de H_2O_2 200 μM sur une période de 1 à 6 jours à l'abri ou non de la lumière (papier d'argent autour du flacon et conservation dans une boîte fermée).

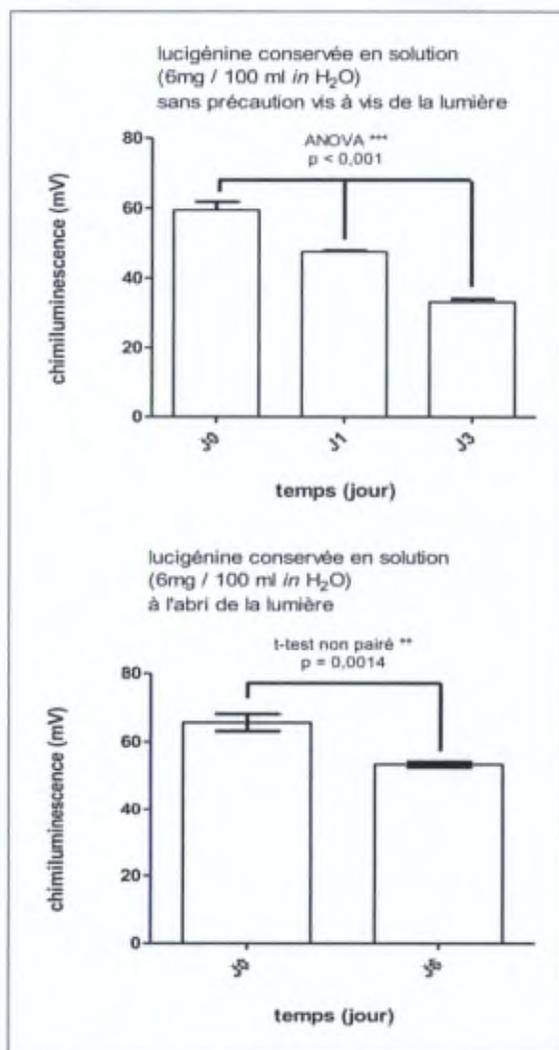


Figure 5. Evolution du signal chimiluminescent en présence de H₂O₂

200 µM avec de la lucigénine conservée à l'air et à la température ambiante.

Des incubations, de 10 ou 30 minutes, à 85° C d'une solution de H₂O₂ 200 µM ne réduisent pas le signal chimiluminescent en présence de lucigénine: le signal après chauffage à 85° C pendant 10 min vaut 100,8 % ± 1,7 % (N = 3) de la valeur trouvée en absence de chauffage. Ce signal vaut 99,7 % ± 5,2 % (N = 3) après 30 minutes de chauffage. Tous les dosages dans des solutions soumises à des incubations à 85° C, pour arrêter la production de H₂O₂ par la glucose-oxydase, par exemple, furent cependant réalisés conjointement à des standards incubés dans les mêmes conditions.

III. 2. 2. Utilisation du système peroxydase

Afin de mesurer la production de H_2O_2 par G/GOD en présence et en absence d'une séquence peroxydasique, des tubes ont été préparés comme indiqué ci-dessous dans le Tableau XI. Le pH des activités enzymatiques ne fut pas contrôlé par un tampon pour éviter la présence de molécules interférentes dans le phénomène de chimiluminescence d'une part, et pour se rapprocher des formulations dans lesquelles les systèmes enzymatiques allaient être incorporées d'autre part. La GOD était toujours le réactif déclenchant.

	G/GOD	G/GOD KSCN/LPO	G/GOD KI/LPO
H_2O	8 ml	6 ml	6 ml
glucose (20 mg / ml)	1 ml	1 ml	1 ml
KSCN (1,2 mg / ml)	-	1 ml	-
KI (2,2 mg / ml)	-	-	1 ml
LPO (13 U_{ABTS} / ml)	-	1 ml	1 ml
GOD (63 U / ml)	1 ml	1 ml	1 ml

Tableau XI. Compositions des cuvettes réactionnelles pour la mesure d' H_2O_2 produit par des séquences enzymatiques.

Après incubation des milieux réactionnels pendant des temps variables (0 à 4 heures) à 37° C, les activités enzymatiques (GOD, LPO) ont été arrêtées en plongeant les tubes dans un bain-marie à 85° C pendant 30 minutes. Le peroxyde d'hydrogène fut alors mesuré par chimiluminescence en présence de lucigénine. Outre les tubes contenant les séquences enzymatiques explorées, un tube contenant du H_2O_2 à concentration connue, incubant dans les mêmes conditions (temps et température), permettait d'en évaluer la récupération après chauffage du tube réactionnel.

La production d'oxydant par une séquence peroxydasique fut déduite du dosage de la cystéine résiduelle après incubation en présence du système peroxydase standardisé.

- Faire une solution de cystéine 1 mM.
- Faire une solution de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0,1 M.
- Faire une solution de DTNB 0,17 mM et la diluer dans du $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.

- Réaliser une courbe standard comme indiqué dans le tableau XII:

[cystéine] (μM)	volume de cystéine (μl)	volume d' H_2O (μl)
0	-	500
100	50	450
200	100	400
300	150	350
400	200	300
500	250	250
600	300	200

Tableau XII. Composition des cuvettes réactionnelles.

- Ajouter 4 ml de DTNB.
- Mesurer la D.O. à 412 nm.

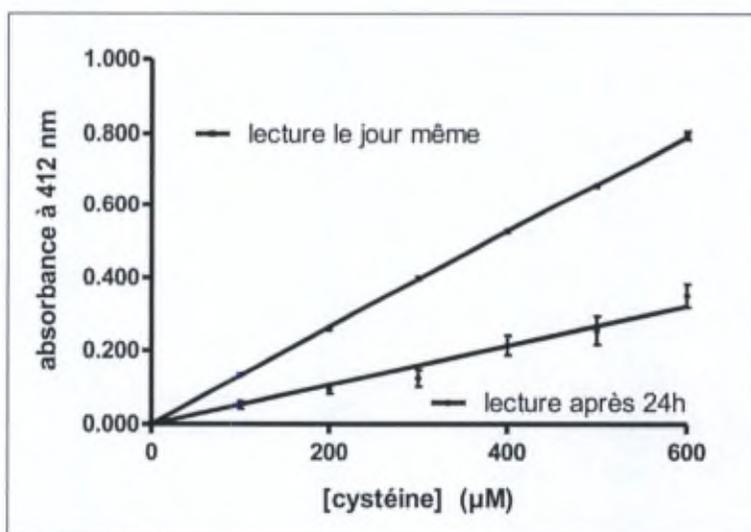


Figure 6. Dosage de la cystéine par spectrophotométrie: droite étalon (lectures spectrophotométriques le jour même et après 24 heures).

La figure 6 montre l'absorbance observée à 412 nm après coloration de la cystéine par le DTNB 0,17 mM. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de cystéine comprise entre 100 et 600 μM : le coefficient de régression linéaire vaut $r = 0,9995$ et l'équation de la droite est $y = 0,001320 x - 0,00061$. Après 24 heures, une relecture des cuvettes montre une diminution de l'absorbance. En effet, les valeurs ne représentaient alors que $33,0 \pm 6,1 \%$ des valeurs trouvées le jour de l'expérience.

III. 2. 3. Courbe de croissance des levures en milieu liquide

La croissance de *C. albicans* fut suivie par turbidimétrie à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (SpectraCount Spectrophotometer™, Packard™, Etats-Unis) pendant 16 h. Le jour de l'expérience, une suspension (3^{ème} subculture) de *C. albicans* ATCC 10231 dans un milieu liquide de Sabouraud fut ajustée à une absorbance de 0,800 à 600 nm (ce qui correspond à $1,55 \pm 0,32 \times 10^7$ CFU/ml, moyenne \pm ESM, N = 6). Le Tableau XIII détaille la composition du milieu d'incubation de la microplaque ELISA. Il faut noter que la concentration finale du glucose était de 115 mM (glucose ajouté plus glucose déjà présent dans le milieu liquide de Sabouraud). Dans quelques expériences, après 16 h d'incubation à 37° C, le milieu réactionnel fut dilué (de 10 à 10⁴ fois) dans du NaCl 0,9 % stérile froid (4° C) puis étalé sur boîte de Petri. Après une nouvelle incubation de 48 heures à 37° C, les colonies furent comptées.

Bouillon	<i>cfr page 23</i>	175 μ l
Glucose	80 mg / ml	25 μ l
Levures	suspension ajustée à une D.O. _{600 nm} de 0,800	25 μ l
GOD (déclenchant)	entre 95 μ U / ml et 12,6 U / ml	25 μ l

Tableau XIII. Composition des puits réactionnels de la plaque ELISA pour le suivi de la turbidimétrie durant 16 h.

III. 2. 4. Comptage des levures sur milieu solide

Les comptages de levures sur milieu solide (milieu Sabouraud – gentamycine – chloramphénicol) permirent d'évaluer le taux de survie des levures après incubation de 16 heures en présence de différentes solutions oxydantes (G/GOD, G/GOD/KI/LPO, G/GOD/KSCN/LPO). Le contenu de chaque puits réactionnel fut dilué (de 10 à 10⁴ fois) dans du NaCl 0,9 % stérile froid (4° C) puis étalé sur boîte de Petri pour comptage. Les blastoconidies survivantes formaient alors, après 24 - 48 heures à 37° C, des colonies macroscopiquement visibles (*colony forming unit* ou CFU). Elles furent dénombrées au moyen d'un compteur de colonies (BIO™, Kobe, Japon). Le nombre de levures est calculé à partir du nombre de colonies comptées sur une boîte de Petri ajusté par ml de suspension et multiplié par le facteur de dilution.

Reproductibilité des comptages des colonies

Le tableau XIV montre la moyenne, la déviation standard et le coefficient de variation des données obtenues dans la suspension initiale de levures après ajustement de l'absorbance $_{600\text{ nm}}$ à 0,800 tantôt exprimées en CFU/ml tantôt exprimées en log CFU/ml.

	CFU/ml	log CFU/ml
<i>moyenne ± DS (N)</i>	$1,55 \pm 0,32 \cdot 10^7$ (6)	$7,19 \pm 0,09$ (6)
CV (%)	20,7 %	1,3 %

Tableau XIV. Comptage des levures dans une suspension ajustée à une $DO_{600\text{nm}}$ de 0,800. Les résultats sont exprimés en CFU/ml ou en log CFU/ml. (DS : déviation standard, N : nombre de cas, CV : coefficient de variation).

Des comptages successifs (N = 6) sur 4 boîtes de Petri différentes ont permis de calculer un coefficient de variation de 0,27%, 0,37%, 1,63% et 1,38% pour une moyenne (\pm déviation standard) de 912 ± 3 , 840 ± 3 , 356 ± 6 et 75 ± 1 CFU respectivement.

Par ailleurs, les comptages de 8 boîtes par 2 observateurs indépendants ont donné des résultats (Figure 7) non statistiquement différents ($p = 0,7403$, test t païré de Student). L'écart dû au 2^{ème} observateur par rapport au premier représente $1,0 \pm 0,4$ % (N = 6) pour des comptages compris entre 77 et 948 CFU/boîte et $10,2 \pm 2,1$ % (N = 2) pour des comptages de 2021 et 2212 CFU/boîte.

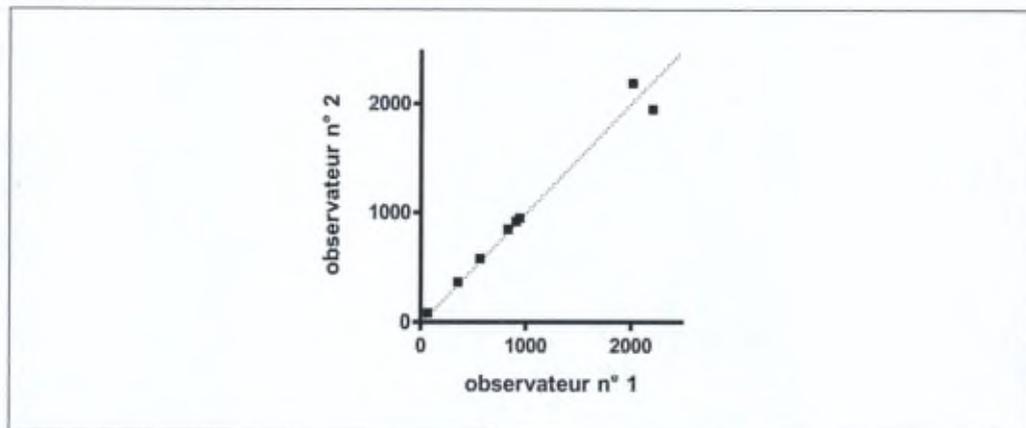


Figure 7. Corrélation entre les comptages de CFU par 2 observateurs indépendants.

Des investigations préliminaires ont permis de vérifier la fiabilité des écouvillonnages de muqueuses orales et de prothèses amovibles. La Figure 8 illustre la reproductibilité des comptages sur 2 frottis successifs de la même prothèse ou du même palais. A cette fin, deux patients furent re-écouvillonnés (prothèses et palais) immédiatement après le premier frottis. Les variations observées entre le 1^{er} et le 2^{ème} frottis sont comprises dans les limites d'un dixième d'unité logarithmique.

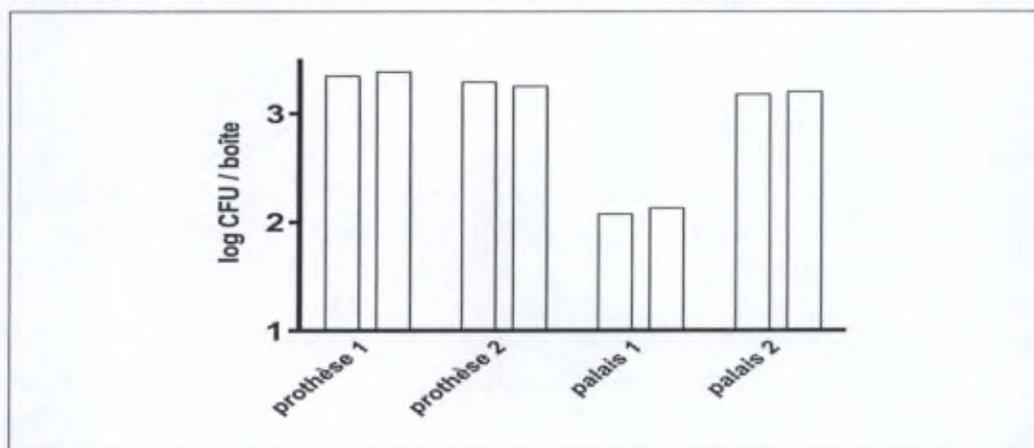


Figure 8. Reproductibilité de 2 frottis successifs de prothèse et de palais.

La Figure 9 illustre les résultats de 3 ensemencements successifs sur boîte de Petri à partir d'un même écouvillon. A cette fin, deux prothèses et deux palais furent écouvillonnés et chaque écouvillon ensemencé successivement sur trois boîtes de Petri. Des variations sont observées dans les limites d'une demi-unité logarithmique.

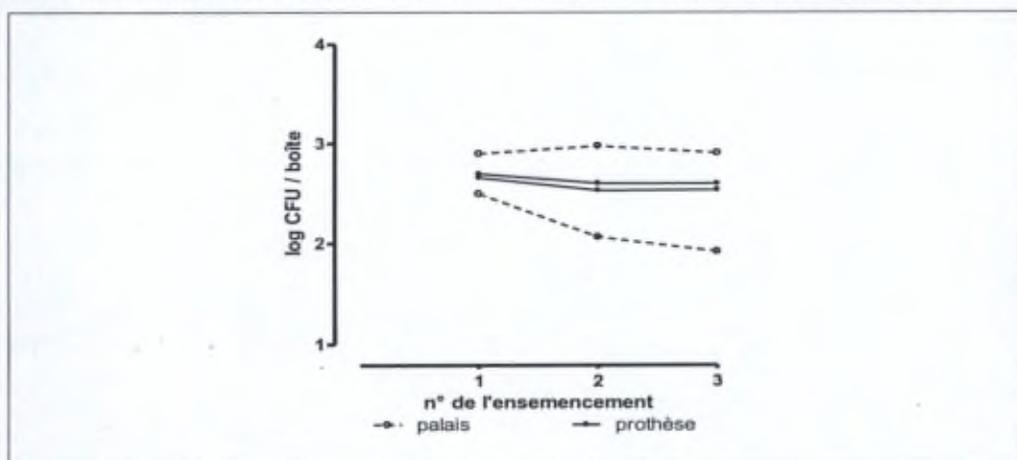
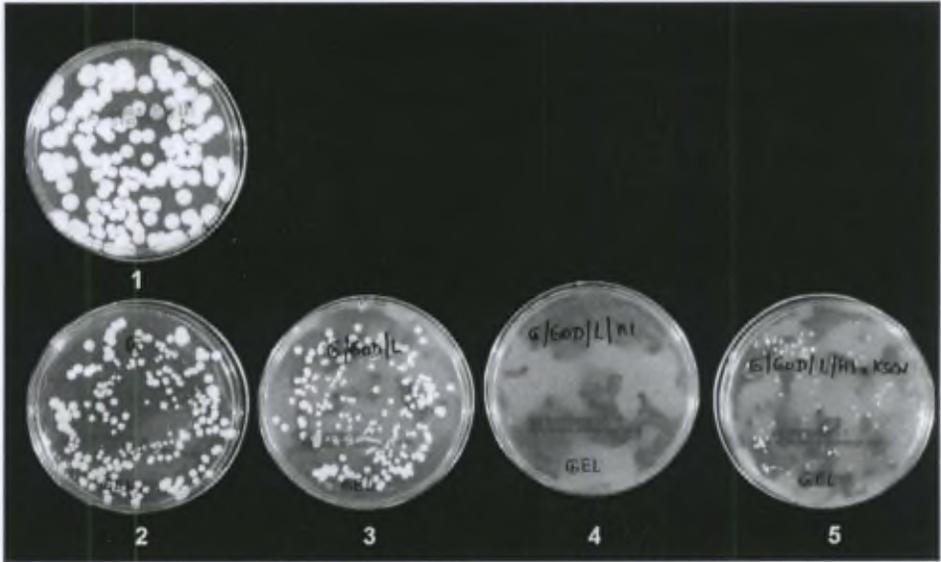


Figure 9. Résultats de 3 ensemencements successifs à partir d'un même frottis.

D'une part, ces investigations préliminaires permettent de s'assurer de la fiabilité des données par écouvillonnage lors des investigations cliniques : coefficient de variation pour plusieurs comptages d'une même boîte < 2% ; variation inter-observateur de l'ordre de 1% pour des nombres de CFU inférieur à 1000. D'autre part, elles indiquent que les variations imputables à l'écouvillonnage et à l'ensemencement sont comprises dans les limites de 0,1 et 0,5 unité logarithmique respectivement.

Nappage de gélose de Sabouraud par un gel oral

L'effet des systèmes enzymatiques a été étudié après incorporation dans des gels oraux. Les différents gels étaient nappés sur une gélose préalablementensemencée par une suspension de *C. albicans*. Chaque expérience se composait de 5 conditions différentes (Photographie 7) : 1°) une condition contrôle sans gel, 2°) une condition contrôle avec le gel sans addition (à l'exception de glucose), 3°) un gel enrichi de glucose et d'enzymes (GOD et LPO) mais sans substrat de la lactoperoxydase (dans ce cas, seul H₂O₂ est produit), 4°) un gel contenant un système peroxydase complet (G/GOD/KI/LPO) produisant de l'hypoiodite, 5°) un gel avec le même système peroxydase enrichi de thiocyanate en quantité variable. Iodure et thiocyanate sont deux substrats que la lactoperoxydase transforme respectivement en hypoiodite et hypothiocyanite (Vanden Abbeele, 1995). La 4^{ème} condition avait pour but de montrer l'inhibition de *C. albicans* par l'hypoiodite tandis que la 5^{ème} condition explorait l'effet du thiocyanate. Le coefficient de variation intra-essai des étalements de la suspension de levures sur le milieu de Sabouraud puis recouverts de gel sans ingrédients est de (9,5 ± 1,8 % ; N = 9). Près d'un bec Bunsen, 2 g de gel froid étaient délivrés sur une boîte de Sabouraud nappée de *Candida*; puis étendus à l'aide d'un râteau pour étalement. Après incubation (37° C), les colonies étaient comptées et parfois leur diamètre mesuré par un logiciel d'analyse d'image (Image-Pro software version 6.0, Media Cybernetics™, Bethesda, Etats-Unis).



Photographie 7. Structure d'un essai. Les 5 conditions sont explicitées dans le texte du paragraphe précédent.

Test de diffusion radiale

Les gels oraux ont aussi été soumis à un test de diffusion radiale. La manipulation consistait à faire un puits dans l'agar d'une boîte de Sabouraud à l'aide d'un tube à essai passé à la flamme (le morceau de gélose découpé était enlevé à l'aide d'une pipette pasteur flambée). Après étalement de 50 μ L d'une suspension de *Candida albicans* (McFarland 2 puis ajustée à une DO de 0,800 à 600 nm) sur la gélose (faire en sorte que la souche soit bien étalée sur toute la gélose mais pas dans le puits), du gel (0,5 à 2 g) était déposé sans débordement dans le puits central. Les boîtes étaient alors incubées 48 heures à 37° C. L'importance de l'inhibition est évaluée par la distance moyenne entre le front de croissance et le bord du puits, et ce dans 4 directions orthogonales. La figure 10 schématise la couronne d'inhibition observée lors d'un test de diffusion radiale tandis que la photographie 8 montre à titre d'exemple le diamètre d'inhibition de la croissance de *Candida* autour d'un puits central contenant 1 g d'un gel composé de G/GOD/KI/LPO.

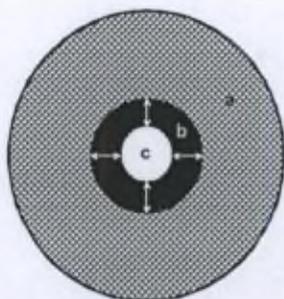
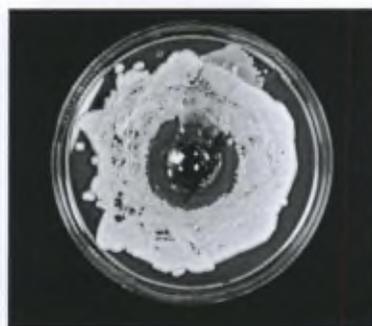


Figure 10. Représentation schématique d'une boîte de Petri après une incubation de 48h à 37° C: a. colonies de *Candida albicans*, b. zone sans levures résultant de la diffusion des produits antifongiques à partir du puits central, c. puits central contenant 1 g du produit testé. Les 4 flèches correspondent aux différentes mesures du rayon d'inhibition pour chaque boîte.



Photographie 8. Inhibition de la croissance de *Candida albicans* autour d'un puits central rempli avec 1 g d'un gel contenant G/GOD/KI/LPO.

III. 2. 5. Evaluation de la biomasse par un sel tétrazolé (MTT)

Les cellules vivantes (y compris les levures) transforment le MTT-tétrazolium en MTT-formazan qui absorbe la lumière entre 560 et 570 nm (Levitz & Diamond, 1985). Le réactif est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan qui y précipite. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle au nombre de cellules (ici, des levures) vivantes et à leur activité métabolique.

Solutions :

- MTT (bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényltétrazolium)
 - o 5 mg/ml de PBS
 - o protéger la solution de la lumière
 - o prévoir 0,5 ml par essai
- isopropanol
 - o mélanger 98 volumes d'isopropanol avec 2 volumes de HCl 2 M

Procédure :

- préparer des suspensions McFarland 2 de *C. albicans* dans un milieu de Sabouraud ; diluer 10 fois
- compter les blastoconidies dans une cellule de Thoma
- préparer des suspensions de levures entre $0,1 \cdot 10^6$ et $0,8 \cdot 10^6$ blastoconidies/ml
- préparer des tubes comme indiqué dans le tableau XV
 - o transférer 1 ml de chaque suspension dans un tube Eppendorf à fond conique, ajouter 0,5 ml de MTT et faire un blanc réactif contenant 1 ml de milieu de Sabouraud et 0,5 ml de MTT

	blanc	essai
suspension de <i>C. albicans</i> (ml)	-	1
MTT (ml)	0,5 ml	0,5 ml
PBS (ml)	1 ml	-

Tableau XV. Composition des cuvettes réactionnelles pour la mesure de la biomasse évaluée par la méthode au MTT.

- fermer et inverser les tubes
- incuber à 37° C pendant 3 heures
- centrifuger pendant 10 min à 1800 g
- écarter le surnageant
- suspendre le culot dans 1,2 ml d'isopropanol
- attendre 5 min
- mélanger vigoureusement
- centrifuger pendant 10 min à 1800 g
- reprendre le surnageant dans une cuvette de spectrophotomètre
- lire l'absorbance à 570 nm

La quantité de levures encore adhérentes aux biomatériaux après 3 lavages (phase attachée d'un biofilm) fut également évaluée par la méthode au MTT.

Quelques caractéristiques de la méthode:

La vitesse de réduction du sel de tétrazolium MTT pour un nombre fixe de levures est fonction de sa concentration (en tant que substrat) comme le montre la figure 11. Il y a une proportionnalité entre le nombre de levures et l'absorbance à 570 nm pour autant qu'elle soit inférieure à 1,000.

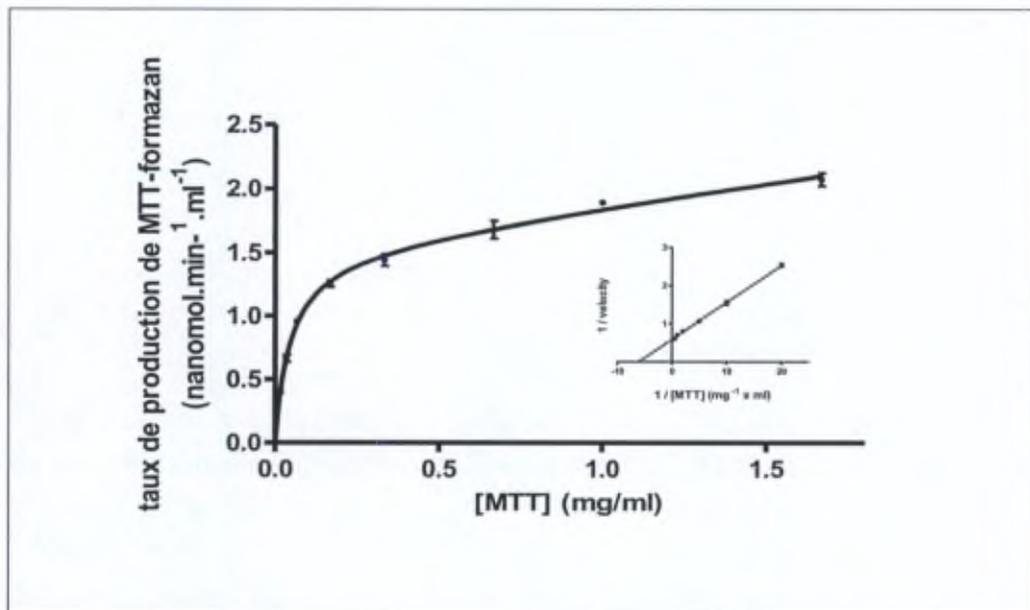


Figure 11. Procédure MTT. Taux de production de MTT-formazan en fonction de la concentration de substrat pour un nombre fixe de blastoconidies (présentation cartésienne des données inverses affiché dans l'insert).

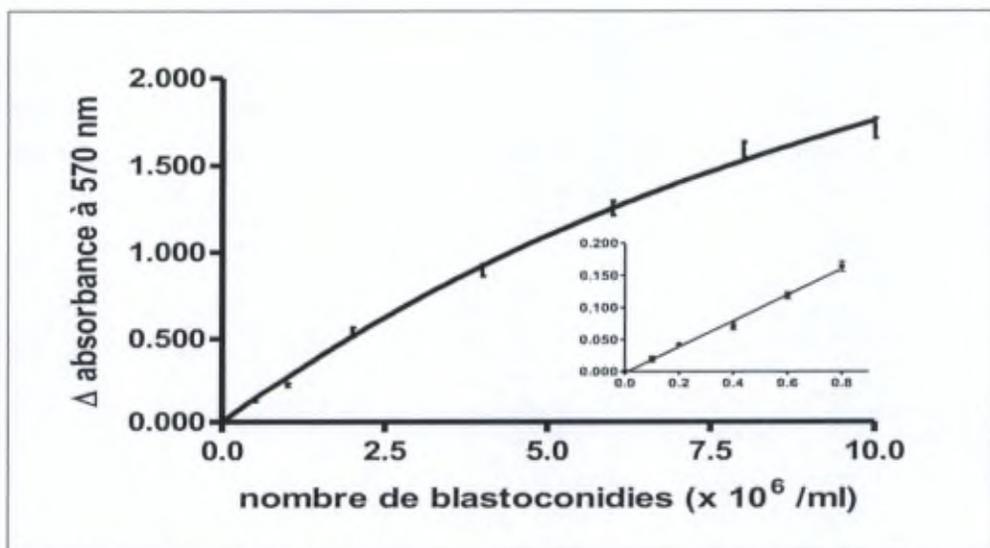


Figure 12. Procédure MTT. Réduction du sel de tétrazolium MTT (temps d'incubation : 3 heures à 37° C) en fonction du nombre de blastoconidies de *Candida albicans* (les données pour les valeurs les plus faibles sont présentées dans l'encart avec des coordonnées plus appropriées).

La figure 12 montre la proportionnalité entre l'intensité de la coloration développée en présence de MTT et le nombre de blastoconidies (compris entre $0,1 \cdot 10^6$ et $0,8 \cdot 10^6$ / ml). Ces résultats proviennent de 2 expériences indépendantes normalisées pour lesquelles chaque condition était réalisée en triplicat. Une concentration cellulaire de $0,8 \cdot 10^6$ / ml correspondait à une absorbance (570 nm) de $0,192 \pm 0,004$ (moyenne \pm ESM, N = 6). La limite de quantification est de $0,2 \cdot 10^6$ blastoconidies par ml de suspension avec une absorbance statistiquement différente de celle obtenue pour le blanc réactif (test t de Student non pairé avec $p = 0,0428$ et $p = 0,0352$ lors de 2 expériences indépendantes). A la plus petite concentration cellulaire mesurable, les coefficients de variation étaient de 2,6 et 8,8 % lors des 2 mêmes expériences indépendantes.

La figure 13 montre l'effet du tampon sur la mise en évidence de la phase attachée par la méthode au MTT. Le chromogène précipitait dans un tampon phosphate 0,1 M mais pas dans une solution PBS comme l'atteste l'absorbance du culot remis en solution dans de l'isopropanol: $0,299 \pm 0,018$ (N = 4) versus $0,013 \pm 0,002$ (N = 4). La présence de titane ne modifie pas cet effet du tampon : $0,343 \pm 0,020$ (N = 2) versus $0,012 \pm 0,002$ (N = 2). La présence de *Candida albicans* dans le milieu d'incubation

produit une augmentation significative (test t non pa r  de Student : $p < 0,05$) des densités optiques à 570 nm par rapport au contrôle correspondant stérile.

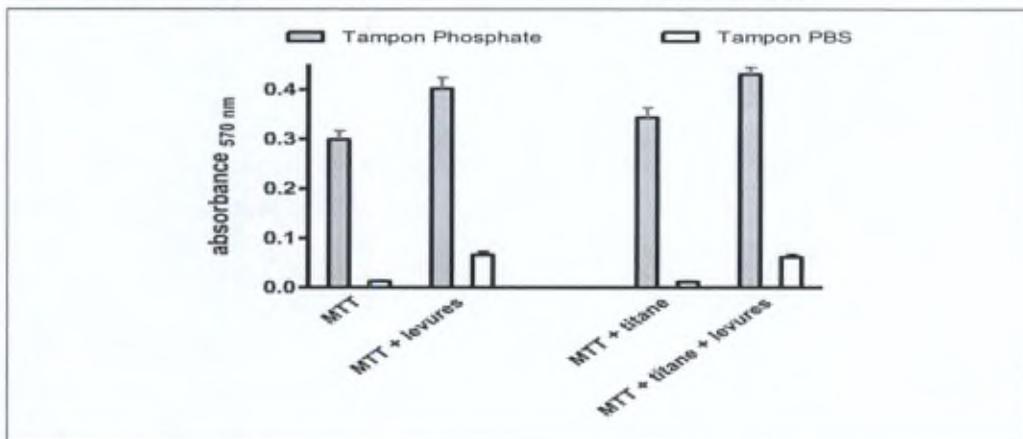


Figure 13. Absorbance (570 nm) du MTT incubé dans deux tampons différents.

III. 2. 6. Adsorption de la peroxydase sur biomatériaux

Le biomatériau est plongé dans 5 ml d'une solution de lactoperoxydase (8 mg / 10 ml H₂O). Un échantillon contrôle est plongé dans 5 ml d'eau distillée. Les tubes sont incubés pendant 30 min à 37  C. Les phases liquides sont ensuite aspirées et le biomatériau lavé 3 fois avec 5 ml d'eau distillée (agitation au vortex) et enfin transféré dans un nouveau tube avec l'eau du 3^{ème} lavage. Ce cycle de lavage est répété 5 fois et s'achève par une dernière aspiration.

III. 2. 7. Production expérimentale de biofilms à *C. albicans* sur biomatériaux

Des biofilms à *Candida albicans* ont été produits sur de la poudre de titane (0,5 g), sur des feuilles de titane (5 x 25 x 0,025 mm), ou sur des morceaux de résine (5 x 25 mm) en suivant le protocole ci-après:

- préparer des tubes stériles contenant le biomatériau (Tableau XVI)

condition	Sabouraud	SCN ⁻	I ⁻	LPO	<i>Candida</i>	GOD
contrôle -	4ml	-	-	-	-	-
contrôle +	3,9ml	-	-	-	0,1ml	-
G/GOD/SCN ⁻ /LPO	2,7ml	0,4 ml	-	0,4ml	0,1ml	0,4ml
G/GOD/I ⁻ /LPO	2,7ml	-	0,4 ml	0,4ml	0,1ml	0,4ml

Tableau XVI. Composition des milieux réactionnels pour la production de biofilms sur matériaux.

- ajouter le matériau dans des tubes Falcon à fond rond : soit avec une spatule flambée, 0,5 g de poudre (particule 325 mesh) de titane, soit avec une pince flambée une languette de titane ou de résine
- préparer une suspension de *C. albicans* ajustée à une absorbance de 0,800 (à 600 nm)
- ajouter stérilement les réactifs comme indiqué dans le tableau XVI (volume final: 4ml) : 4 ml de milieu de Sabouraud stérilisé dans les tubes contrôles et 2,7 ml dans les autres tubes
- ajouter 100 µl de la suspension de levures dans les essais
- placer les tubes Falcon sur un agitateur rotatif à température ambiante
- après incubation avec agitation continue, laisser sédimenter 10 min
- mesurer l'absorbance des surnageants à 600 nm
- grouper les surnageants des essais, en prendre aussi l'absorbance (600 nm)
- aspirer avec une trompe à eau le surnageant encore présent sur les culots
- ajouter 4 ml du pool des surnageants des essais à 3 tubes contrôles
- mélanger ces 3 contrôles immédiatement infectés, laisser sédimenter 10 min et mesurer l'absorbance à 600 nm du surnageant avant de le jeter
- faire 3 lavages de chaque tube avec du Sabouraud stérile en ayant soin de mesurer chaque fois l'absorbance à 600 nm des surnageants rejetés
- reprendre finalement le titane dans 3 ml de milieu de Sabouraud
- ajouter 1,5 ml de la solution de MTT
- mélanger et laisser incuber 3 heures à 37° C avec une agitation douce continue (Rotator®, Stuart™) 3 tours par minute
- centrifuger pendant 10 min à 1000 g
- écarter le surnageant
- suspendre le culot dans 1,2 ml d'isopropanol
- attendre 5 min
- mélanger vigoureusement, puis centrifuger pendant 10 min à 1000 g
- reprendre le surnageant dans une cuvette de spectrophotomètre
- lire l'absorbance à 570 nm.

III. 2. 8. Investigations cliniques

Démonstration de la présence de peroxydase orale adsorbée sur les piliers de cicatrisation en titane

Lors du traitement de patients par implants en deux temps chirurgicaux, des piliers de cicatrisation stériles en titane ont été vissés dans les implants lors du second stade chirurgical. Après 2 semaines dans l'environnement oral, les activités peroxydasiques adsorbées sur 18 piliers de cicatrisation (de patients totalement édentés) ont été mesurées. Une corrélation fut recherchée entre les peroxydases orales adsorbées et la localisation de l'implant correspondant (numéro de sextant).

Quantification de la colonisation des prothèses dentaires par *C. albicans*

L'écouvillonnage de 155 personnes (109 femmes et 46 hommes âgés de 42 à 96 ans) porteuses de prothèses amovibles complètes supérieures a été réalisé pour déterminer la prévalence des porteurs de *Candida sp.* Ces patients ne présentaient aucun signe clinique de stomatite prothétique (douleur ou érythème muqueux). Cet ensemble de patients a été subdivisé en plusieurs groupes pour les besoins spécifiques à chaque investigation.

Pour 135 patients, des écouvillonnages de l'intrados de la prothèse et de la surface muqueuse du palais en regard de celle-ci ont permis de rechercher une contamination simultanée de *Candida sp.* sur les deux surfaces correspondantes.

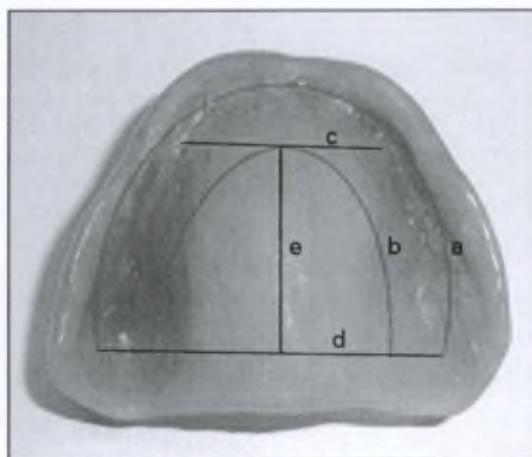
Parmi ces 135 patients, 23 (16 femmes et 7 hommes âgés de 48 à 87 et de 42 à 78 ans respectivement) ont été soumis, en plus d'un écouvillonnage séparé de l'intrados de la prothèse supérieure et de la muqueuse palatine, à une mesure du flux salivaire et à une identification des souches de *Candida* isolées. Après enlèvement de la prothèse, le flux salivaire a été évalué avec un rouleau de coton (Salivette®, Starstedt™, Allemagne) laissé en bouche pendant exactement 1 minute sans mouvement masticatoire et pesé avant et après la collection de la salive (assumant que 1 g de salive correspond à 1 ml). Les souches sauvages cultivables de *Candida species* ont été identifiées directement sur boîtes de Petri (sur milieu Chromagar™) à partir de la morphologie macroscopique des colonies et à partir de tests additionnels (test de germination dans du sérum humain, formation de chlamydoconidies sur milieu RAT, système d'identification sur galeries API™).

Effet clinique d'un gel enrichi en système peroxydasique

Une étude clinique préliminaire (phase I) fut réalisée chez un troisième groupe de 26 personnes (20 femmes et 6 hommes) pour évaluer l'efficacité clinique d'une préparation galénique contenant des facteurs salivaires antimicrobiens et un système peroxydase. De ces 26 personnes porteuses d'une prothèse amovible complète testées quant à la présence ou non de *Candida sp.*, 20 étaient positives et 16 ont accepté d'être enrôlés dans une étude clinique. Pendant 15 jours, quotidiennement, un gel a été appliqué par le même opérateur en double aveugle sur l'intrados de leur prothèse. Il s'agissait soit d'un gel actif contenant tout le système G / GOD / KSCN/ LPO / lysozyme / lactoferrine /colostrum soit d'un gel placebo (même gel inactivé par chauffage à 85° C pendant 6 heures).

Détermination de la quantité de gel à étaler sur une prothèse

Afin de déterminer la quantité de gel à étaler sur l'intrados d'une prothèse, diverses mensurations furent réalisées sur 7 empreintes de l'arcade dentaire supérieure et de la surface palatine de patients âgés de 35 à 80 ans. La photographie 9 représente les mesures effectuées.



Photographie 9. Mesures de l'intrados d'une prothèse.

- (a) la longueur de l'arc dessiné par la crête alvéolaire entre les tubérosités maxillaires gauche et droite,
- (b) la longueur de l'arc situé à 1 cm de la crête versant palatin entre les premières molaires gauche et droite,
- (c) la distance entre les crêtes des bosses canines gauche et droite dans un plan frontal,
- (d) la distance entre les tubérosités maxillaires gauche et droite dans un plan frontal,
- (e) la distance entre les 2 lignes précédentes dans un plan sagittal.

Ces mesures permirent d'évaluer d'une part la surface (exprimée en cm²) recouverte par l'intrados d'une prothèse en la réduisant en un trapèze, et d'autre part l'épaisseur du film de gel après étalement d'un volume de 1 cm³.

$$\text{surface (cm}^2\text{)} = (\text{grande base} + \text{petite base})/2 \times \text{hauteur} = (c + d)/2 \cdot e$$

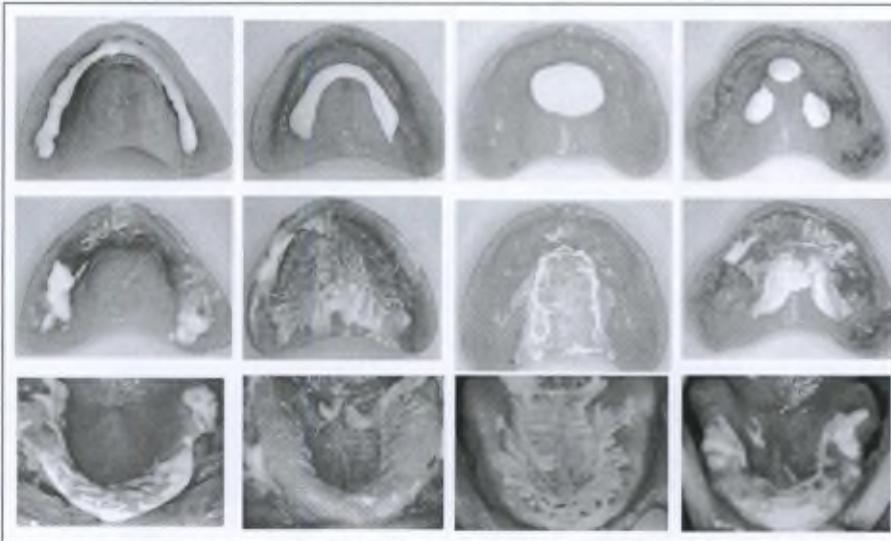
Formule 2. Algorithme permettant d'évaluer la surface de l'intrados d'une prothèse.

$$\text{épaisseur } (\mu\text{m}) = (\text{volume en cm}^3 / \text{surface cm}^2) \cdot 10000$$

Formule 3. Algorithme permettant de calculer l'épaisseur d'un film de gel après étalement.

Optimisation de l'application de l'étalement d'un gel sur une prothèse

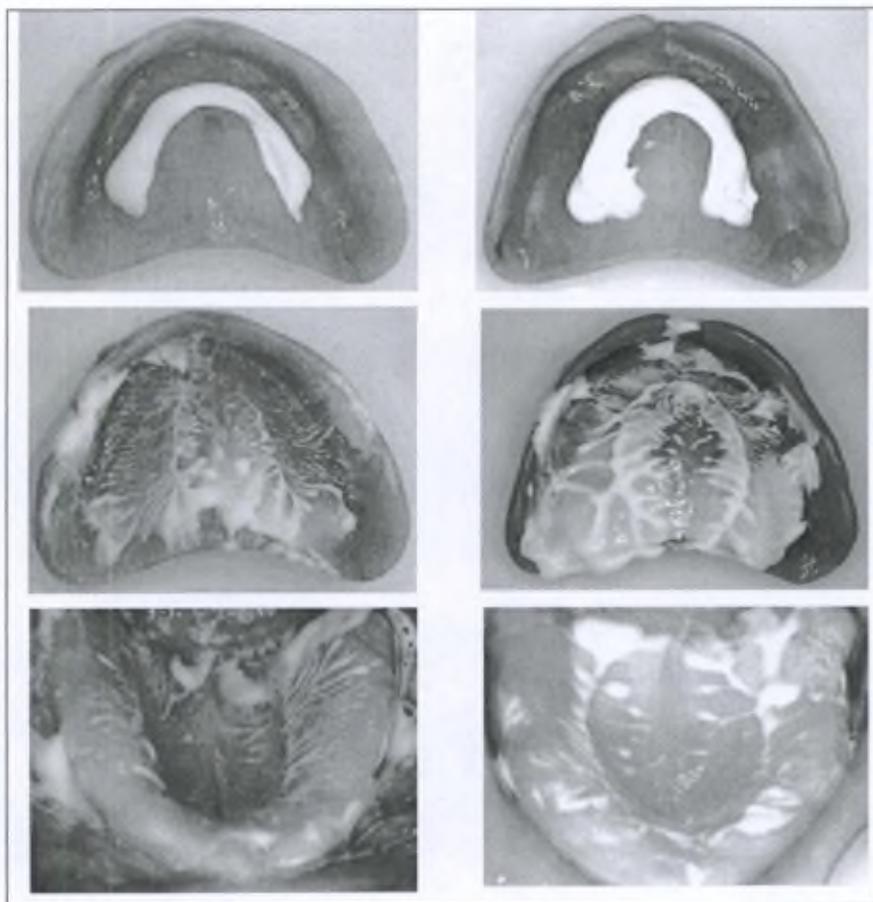
La Photographie 10 résume l'étude de l'étalement de 1 g de dentifrice sur un intrados de prothèse mis bouche pendant 5 min : Le dentifrice, plutôt qu'un gel, présente l'avantage de pouvoir être aisément visualisé.



Photographie 10. Evaluation de différentes procédures d'étalement de 1 g de dentifrice sur prothèse.

- première ligne : type d'application:
 - 1^{ère} colonne : application sur la crête,
 - 2^{ème} colonne : application sur le bord palatin de la crête,
 - 3^{ème} colonne : application sur la moitié antérieure de l'intrados,
 - 4^{ème} colonne : application en 3 spots au centre de l'intrados ;
- deuxième ligne : dentifrice étalé sur l'intrados après mise en place,
- troisième ligne : dentifrice étalé sur la muqueuse palatine.

L'application du dentifrice sur la crête (1^{ère} colonne) ne permet qu'un étalement limité. L'application sur le bord palatin (2^{ème} colonne) produit un étalement sur la crête et sur le palais. L'application sur la partie antérieure de l'intrados (3^{ème} colonne) ne recouvre que la muqueuse palatine sans diffusion vers les vestibules. Enfin, l'application en 3 spots sur la moitié antérieure de l'intrados laisse toute la partie palatine non recouverte.



Photographie 11. Etalement de 1 g et 2 g d'un dentifrice sur le bord palatin de l'intrados mis en place dans la bouche pendant 5 min chez 2 patients.

1^{ère} colonne : patient n°1 (1 g de dentifrice)

2^{ème} colonne : patient n°2 (2 g de dentifrice)

1^{ère} ligne : application du dentifrice sur l'intrados

2^{ème} ligne : dentifrice étalé sur l'intrados après mise en place pendant 5 min

3^{ème} ligne : dentifrice étalé sur les muqueuses.

La Photographie 11 montre l'étalement de 1 g et 2 g d'un dentifrice sur l'intrados mis en place dans la bouche pendant 5 min chez 2 patients et le bon recouvrement tant de l'intrados que des muqueuses.

Décontamination ex vivo des prothèses par un système peroxydase / iode

Après avoir été écouvillonnées, 10 prothèses sont plongées pendant 30 minutes à température ambiante dans des bains contenant soit G (800 mg / 100 ml) / GOD (126 U / 100 ml) (N = 5) produisant H₂O₂ soit le système entier (N = 5) G (800 mg / 100 ml) / GOD (126 U / 100 ml) / KI (20 mg / 100 ml) / LPO (96 U_{ABTS} / 100 ml) puis re-écouvillonnées.

Une dernière expérience *ex vivo* vise à décontaminer des prothèses par incubation à 37° C dans une solution contenant un système iodure / peroxydase et une quantité de GOD plus importante (1260 U / 100 ml). Après avoir été écouvillonnées, 6 prothèses sont plongées pendant 30 min dans des bains à 37° C contenant d'abord de l'H₂O en guise de contrôle, et ensuite (lors d'une autre consultation) dans une solution contenant G (800 mg / 100 ml) / GOD (1260 U / 100 ml) / KI (20 mg / 100 ml) / LPO (96 U_{ABTS} / 100 ml). Les intrados des prothèses furent re-écouvillonnés après incubation.

III. 2. 9. Statistiques

La gestion des données, l'analyse mathématique et statistique ainsi que la mise en graphique furent réalisées grâce au logiciel Prism™ version 5.00 de GraphPad Software™ (San Diego, CA, Etats-Unis). Sauf indication contraire, tous les résultats sont exprimés par la moyenne des réplicats ± ESM avec le nombre de cas (N).

IV. Résultats

IV. 1. Effet du peroxyde d'hydrogène sur *Candida albicans*

Mesure de l' H_2O_2 produit par la glucose-oxydase

La Figure 14 étudie la production d' H_2O_2 en milieu aqueux (H_2O) par la GOD (0,63 U / ml) en l'absence de peroxydase LPO (cfr tableau III page 8). La production d' H_2O_2 par la GOD atteint un plateau après 3,5 heures d'incubation à 37° C *in H_2O*. La concentration en H_2O_2 produit était alors $3,26 \text{ mM} \pm 0,25 \text{ mM}$ lors de 3 expériences indépendantes. Après 24 heures d'incubation à température ambiante en présence des mêmes quantités de réactifs (et toujours en l'absence de lactoperoxydase), la concentration de peroxyde d'hydrogène était de $1,5 \pm 0,4 \text{ mM}$ (N = 6). La figure 15 présente les concentrations de H_2O_2 produit après 4 heures d'incubation à 37° C *in H_2O* en présence d'une activité glucose-oxydase variable (une seule expérience). Dans les conditions expérimentales, la concentration atteinte après 4 heures est directement proportionnelle à l'activité en glucose-oxydase.

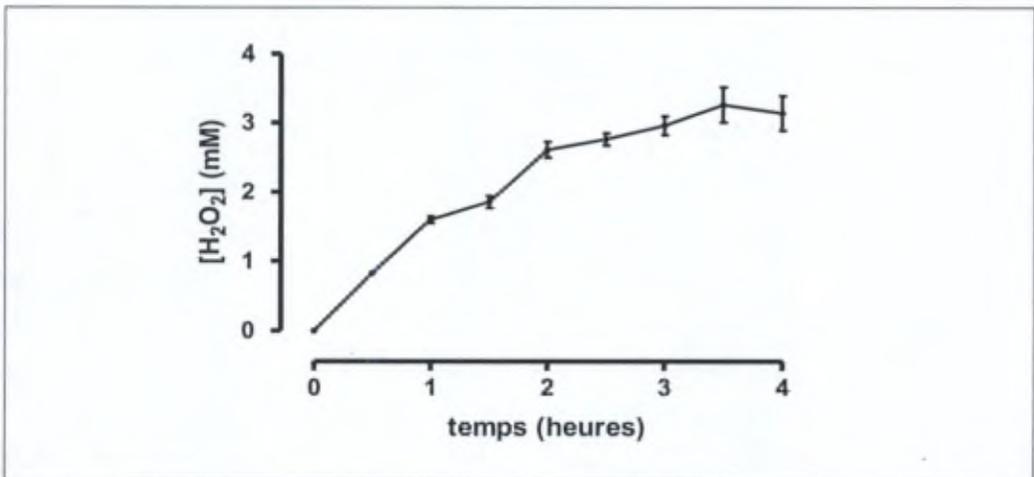


Figure 14. Production au cours du temps de H_2O_2 par une séquence G (11,1 mM) / GOD (0,63 U / ml) *in H_2O*.

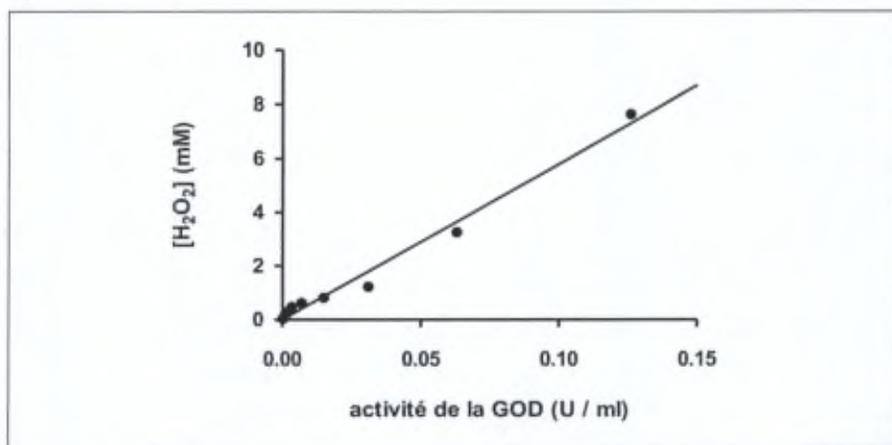


Figure 15. Production de H₂O₂ par une séquence G (11,1 mM) / GOD (variable) in H₂O après 4 heures d'incubation à 37° C. Equation de la droite d'ajustement : $y = 58,07x$ ($r = 0,9924$).

Activité minimale inhibitrice de la GOD vis-à-vis de *Candida*

Des cultures en milieu liquide (N = 6) à 37° C de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 ont permis de suivre la croissance de la levure pendant 16 heures en présence de différentes concentrations de glucose-oxydase et d'une quantité fixe de glucose (155 mM). La figure 16 montre l'évolution de l'absorbance à 600 nm de différentes suspensions de *C. albicans* ATCC 10231 exposées à des activités de glucose-oxydase variant de à 0,006 à 1,260 U / ml. Des dilutions (jusqu'à 20 fois) de la solution mère de glucose-oxydase (12,6 U / ml) inhibaient totalement la croissance de la souche pendant 16 h. L'inhibition de la croissance d'un microorganisme est considérée totale lorsque la croissance est nulle pendant 16 h d'incubation (Prescott *et al.*, 1995): cela équivaut à dire lorsque l'absorbance à 600 nm après 16 h n'est pas statistiquement (test t de Student non pairé) différente de celle mesurée au temps initial. L'activité minimale inhibitrice en glucose-oxydase était, dans nos expériences, de 0,63 U/ml. Les données obtenues peuvent être utilisées pour une analyse dose - effet. A cette fin, la surface sous les courbes de croissance fut calculée puis portée sur graphe en fonction de la concentration de glucose - oxydase. L'encart de la figure 16 montre que la surface sous la courbe présente une décroissance exponentielle en fonction de la concentration en GOD. L'ajustement de la courbe qui passe au mieux par tous les points, permet de calculer une activité inhibitrice 50 % égale à 0,60 U/ml.

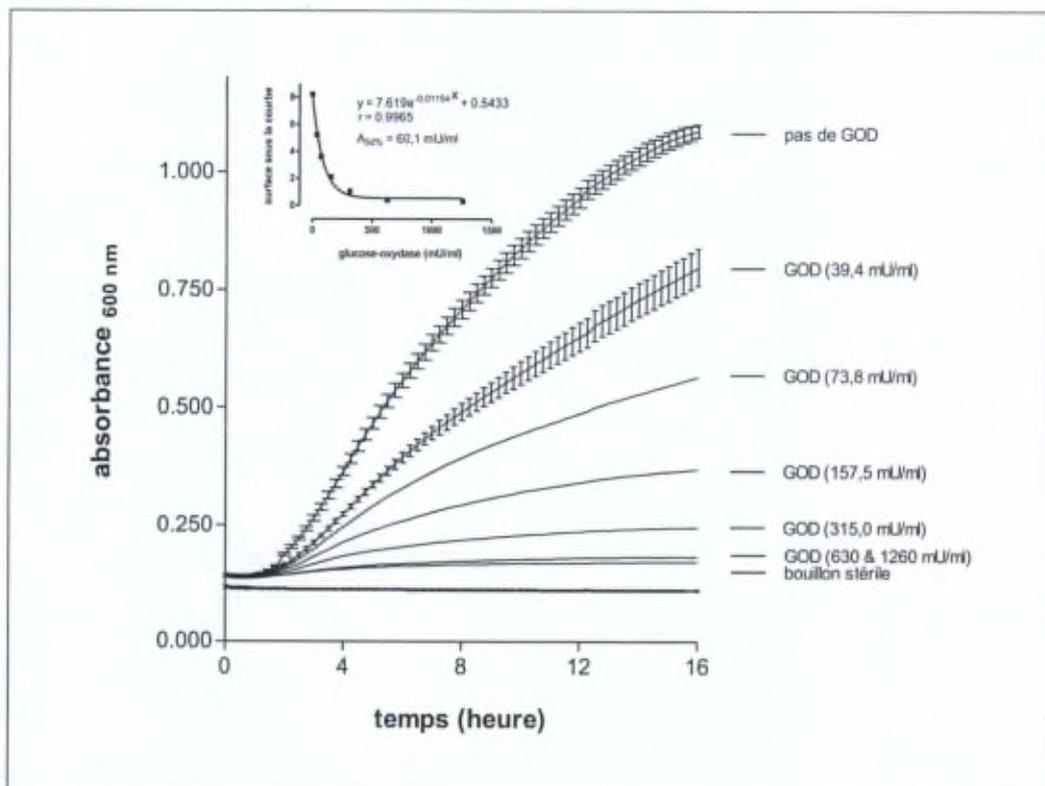


Figure 16. Courbes de croissance de *C. albicans* ATCC 10231 en milieu liquide en présence de la séquence glucose (155 mM) / glucose-oxydase (activité variable). Encart: Surface sous la courbe de croissance versus activité de la glucose-oxydase.

La figure 17 illustre la différence d'absorbance à 600 nm entre la valeur observée après 16 heures d'incubation et la valeur initiale. L'encart de cette figure montre que l'absorbance à 600 nm suit une décroissance exponentielle en fonction de l'activité de la GOD; l'ajustement de la courbe qui passe au mieux par tous les points expérimentaux, permet de calculer une activité inhibitrice 50 % égale à 0,95 U/ml.

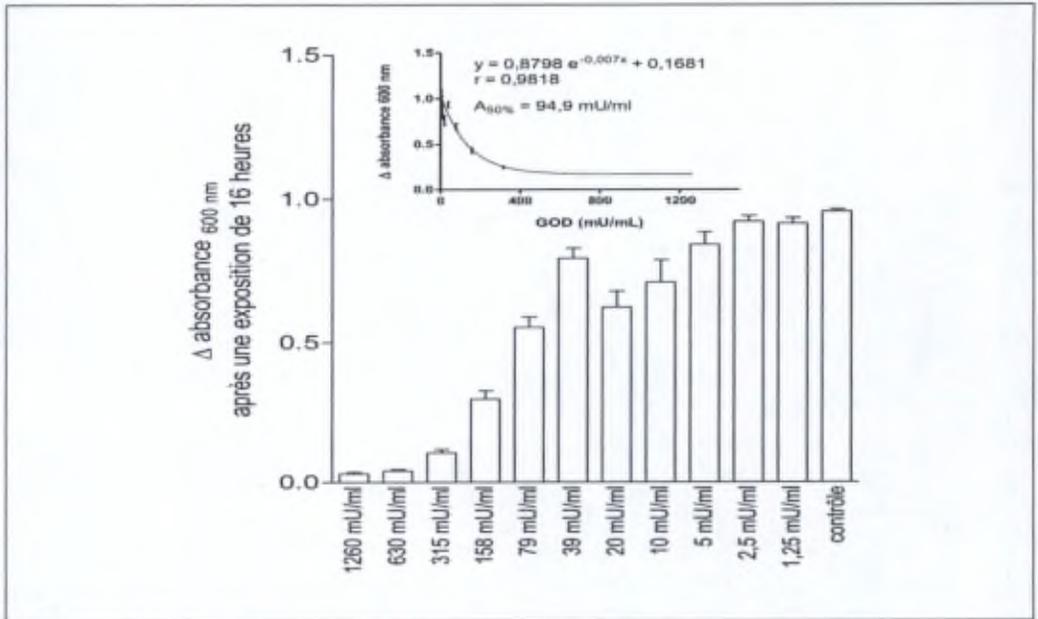


Figure 17. Différence d'absorbance à 600 nm après 16 h d'incubation en fonction de différentes activités de GOD.

La figure 18 résume tous les résultats des comptages d'unités formatrices de colonies (CFU) après 16 heures de croissance à 37° C. Les données sont exprimées en logarithme du nombre de CFU par ml de suspension (log CFU/ml). Une différence de 3 unités logarithmiques équivaut donc à un taux de survie inférieur à 1 ‰.

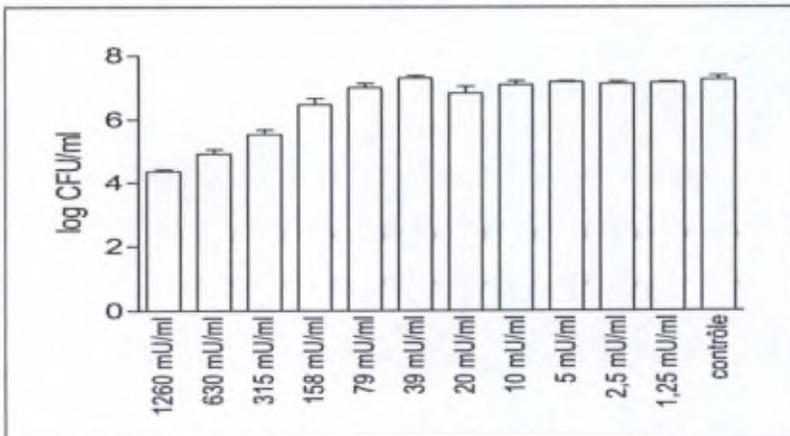


Figure 18. Comptage des unités formatrices de colonies (CFU) après 16 heures d'incubation en présence de différentes activités de glucose-oxydase.

Effet de la catalase sur le système glucose/glucose-oxydase

La Figure 19 illustre l'inhibition de la croissance en milieu liquide (suivie par turbidimétrie à 600 nm) de *C. albicans* ATCC 10231 en présence du système glucose (155 mM) / glucose-oxydase (1260 mU/ml) après une incubation de 5 heures. L'absorbance à 600 nm était de $0,033 \pm 0,002$ (N = 6) alors qu'elle valait $0,170 \pm 0,004$ (N = 6) pour le contrôle. La catalase (5000 U/ml) levait totalement cette inhibition : l'accroissement de l'absorbance était alors $0,185 \pm 0,007$ (N = 6). Un test ANOVA complété par un test de Bonferroni montrait une inhibition de la croissance statistiquement significative en présence du système G/GOD sans catalase ($p < 0,001$). L'accroissement de la turbidité en présence du système G/GOD avec catalase (5000 U/ml) n'était pas statistiquement différent de celui du contrôle.

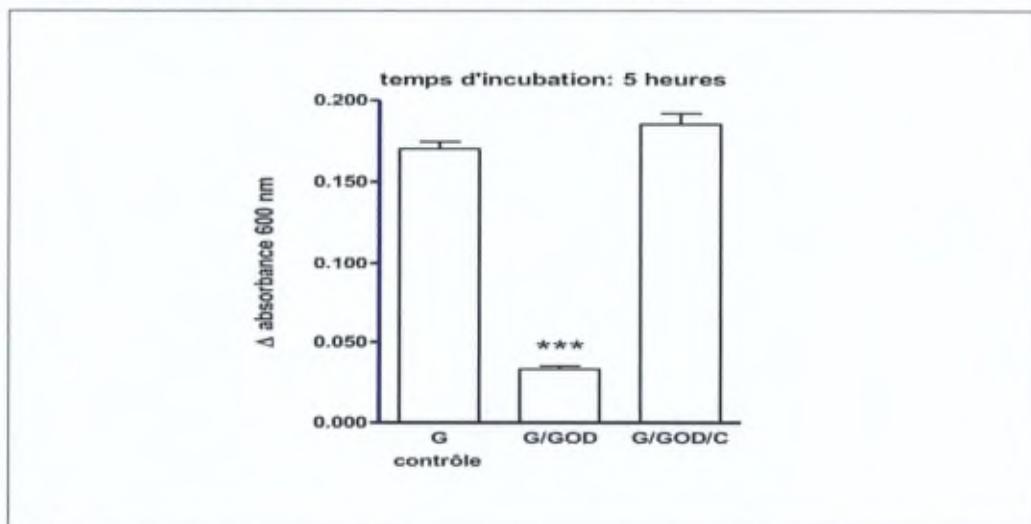


Figure 19. Effet de la catalase (C, 5 000 U/ml) sur l'inhibition des levures par le système G / GOD.

Effet d'une seconde exposition au système G/GOD

Des suspensions de levures, ajustées à une absorbance de 0,800, furent diluées 10 fois dans un bouillon ($0,071 \pm 0,002$; N = 5) contenant du glucose 155 mM et de la glucose-oxydase à des activités comprises entre 1,5 et 12,6 mU / ml. Après 24h à 37° C, les absorbances furent mesurées (Tableau XVII) puis réajustées à une densité optique (600 nm) de 0,800.

	GOD (mU/ml) lors de la 1 ^{ère} incubation				
	0	1,5	3	6	12
A _{600nm} au temps 0	0,071	0,070	0,074	0,071	0,071
A _{600nm} au temps 24 h	1,543	1,228	1,159	1,100	0,991
Δ A _{600nm}	1,472	1,158	1,085	1,029	0,920

Tableau XVII. Absorbances (A) à 600 nm initiale et finale de la 1^{ère} croissance en présence de GOD.

La figure 20 présente la variation de l'absorbance à 600 nm au cours du temps lors d'une 2^{ème} exposition au système G/GOD. Les suspensions pré-incubées en présence de glucose et de GOD à des concentrations comprises entre 1,5 et 12 mU/ml, présentent une résistance accrue à une 2^{ème} incubation en présence de GOD 12 mU/ml. Ceci se manifeste par une courbe de croissance résiduelle caractérisée par une absorbance plus élevée de la phase stationnaire (plateau) et par une surface sous la courbe qui varie dans un rapport de 1 à ≈ 2 (surface sous la courbe de croissance d'une suspension non pré-exposée à G/GOD: 1,252; surface sous la courbe de croissance d'une suspension pré-exposée à G/GOD 12 mU / ml: 2,459).

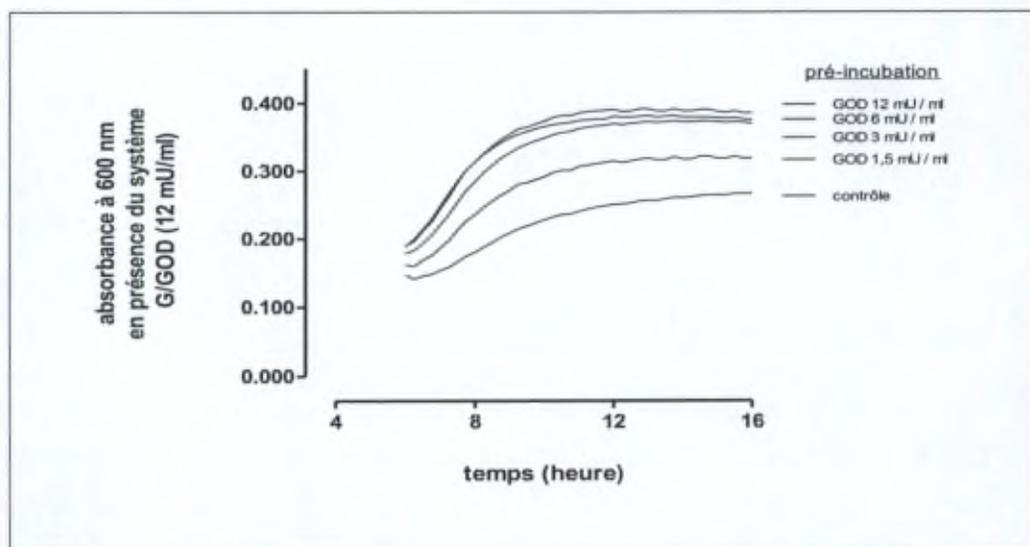


Figure 20. Effet d'une première exposition à différentes concentrations de GOD sur la croissance de *C. albicans* soumise à une 2^{ème} exposition de GOD 12 mU/ ml.

IV. 2. Effet d'un système peroxydasique sur *Candida albicans*

Effet d'une activité peroxydase sur la concentration en H_2O_2

La Figure 21 compare la production d' H_2O_2 en milieu aqueux (H_2O) par la GOD (0,63 U / ml) et son substrat le glucose (11,1 mM) en absence et en présence de peroxydase (KI ou KSCN 1,2 mM; LPO 1,3 U_{ABTS} / ml). En absence de peroxydase, l' H_2O_2 produit par la GOD atteignait des concentrations comprises entre 0,5 et 4 mM endéans les 4 heures d'incubation à 37° C. Par contre, en présence de peroxydase, aucun H_2O_2 ne peut être mis en évidence. Après 24 heures d'incubation à température ambiante en présence des mêmes quantités de réactifs, la concentration de peroxyde d'hydrogène était de $1,5 \pm 0,4$ mM (N = 6) en l'absence de lactoperoxydase tandis que sa présence (système G/GOD/SCN⁻/LPO) annulait toujours la concentration d' H_2O_2 mesurable (N = 6).

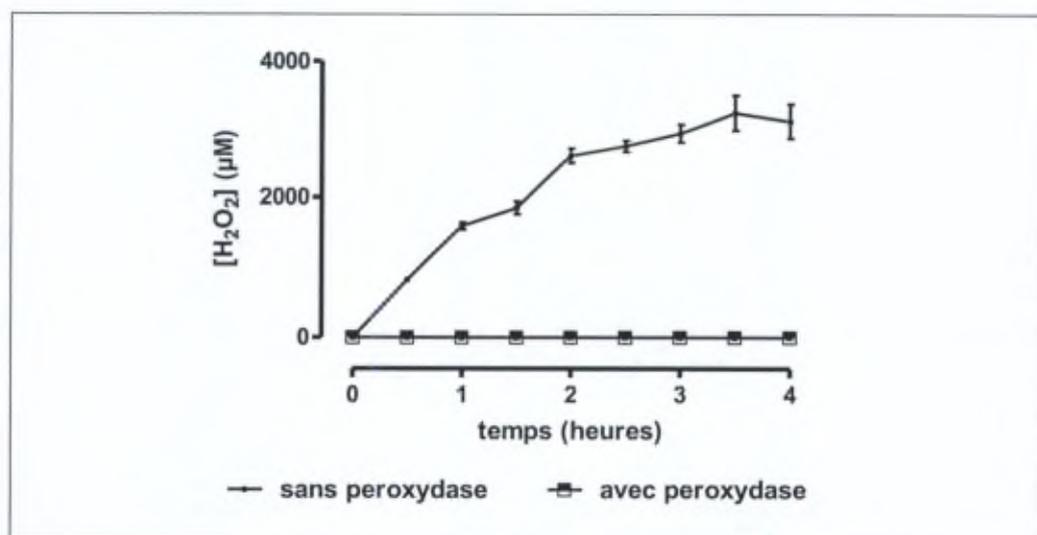


Figure 21. Effet d'une activité peroxydase sur la concentration H_2O_2 produite par G / GOD;
■ G / GOD / KSCN / LPO ; □ G / GOD / KI LPO.

La figure 22 montre que l'addition du KI et de la LPO au système G / GOD, induit une oxydation des groupes thiols (-SH) de la cystéine témoignant de la production d'oxydant (dans ce cas : OI^{\cdot}). La quantité de OI^{\cdot} mesurée est statistiquement

équivalente à la concentration de H_2O_2 produite en absence de KI / LPO (test t de Student non pairé, $p = 0,8806$) et dosée par la méthode à la lucigénine.

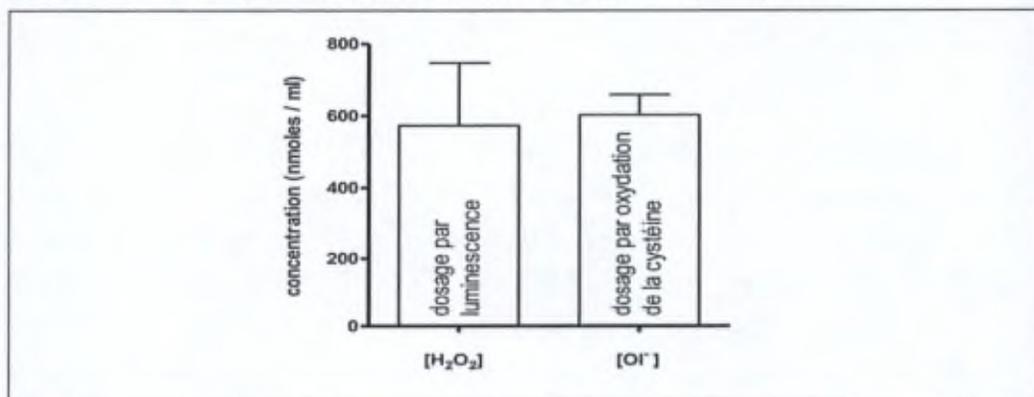


Figure 22. Comparaison entre la $[H_2O_2]$ produite par G / GOD seule et la $[OI^-]$ produite par la même séquence G / GOD supplémenté de KI / LPO.

Inhibition de *C. albicans* par le système G/GOD/KI/LPO

La figure 23 illustre l'effet candidacide (évalué par comptage sur milieu solide) de plusieurs combinaisons des composants des systèmes peroxydases. La glucose-oxydase a été utilisée à une concentration de 0,2 U / ml. A cette concentration, le peroxyde d'hydrogène produit ne présente aucun effet inhibiteur sur la survie de *C. albicans* après une incubation de 16 h 00 : le logarithme du nombre de CFU vaut $5,975 \pm 0,114$ (N = 6). La lactoperoxydase présente un effet inhibiteur en présence des 2 substrats : iodure et peroxyde d'hydrogène produit par G/GOD. En présence de glucose 155 mM, de GOD 0,2 U / ml, de lactoperoxydase (960 mU/ml) et d'iodure (1,2 mM), le taux de survie est nul (N = 6). L'hypothiocyanite produit en présence de thiocyanate 1,2 mM diminue le nombre de CFU compté de l'ordre d'1 unité logarithmique : $4,625 \pm 0,527$ (N = 6). En présence de NaCl, le taux de survie reste identique : $5,741 \pm 0,181$ (N = 6) (rappelons que le Cl⁻ n'est pas un substrat de la lactoperoxydase) : cette donnée confirme que la séquence G/GOD aux concentrations utilisées ne présente aucun effet sur *Candida*.

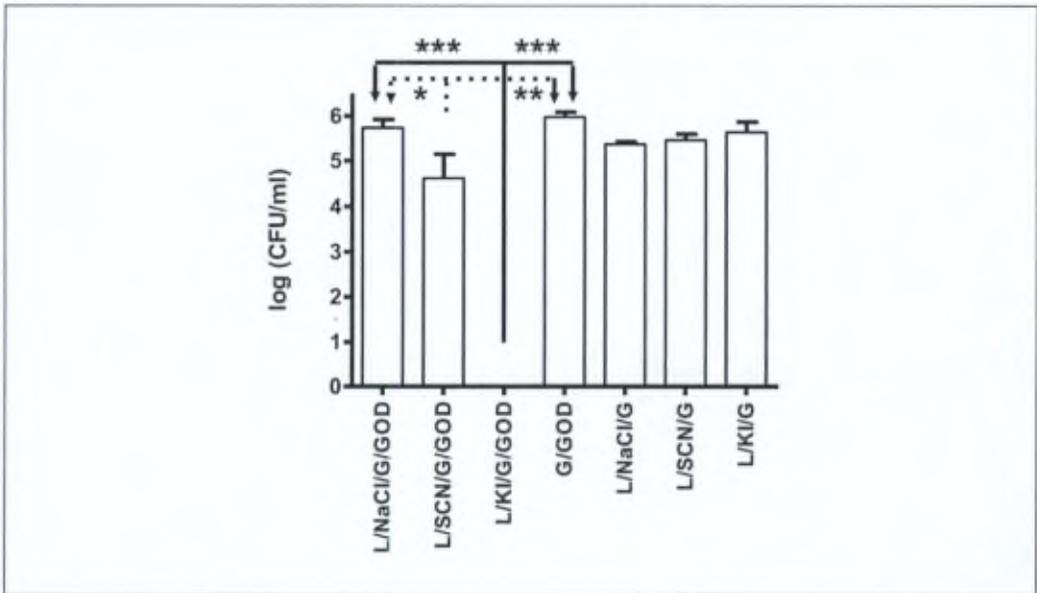


Figure 23. Effet d'une exposition à différentes combinaisons d'un système lactoperoxydase (6 expériences indépendantes). Les astérisques indiquent les significations statistiques trouvées avec un test ANOVA complété par un test de comparaison multiple de Bonferroni (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Enfin, plusieurs combinaisons regroupant tous les composants d'un système peroxydasique à l'exception de son déclenchant, la glucose-oxydase, n'induisaient aucune modification de la survie de *Candida* après 16 heures d'incubation : $5,468 \pm 0,137$ (N = 6) pour G / LPO / KSCN, $5,640 \pm 0,227$ (N = 6) pour G / LPO / KI et $5,381 \pm 0,055$ (N = 6) pour G / LPO / NaCl.

Détermination du CMI de l'iodure

Le Tableau XVIII montre l'absorbance à 600 nm de différentes suspensions de *C. albicans* incubées pendant 16 h en présence d'un système peroxydasique avec des concentrations variables de KI. La concentration minimale inhibitrice de KI peut être ainsi estimée à 0,6 mM. Un contrôle négatif (sans levure) permet de constater une petite augmentation de l'absorbance sans doute liée à la formation d'I₂ quelle que soit la concentration de KI (0,07 à 1,2 mM). Le contrôle positif (levures sans GOD, ni LPO, ni KI) permet de démontrer d'une part l'innocuité du système G/GOD 0,2 U / ml avec ou sans lactoperoxydase et, d'autre part, l'absence d'effet anti-*Candida* du système

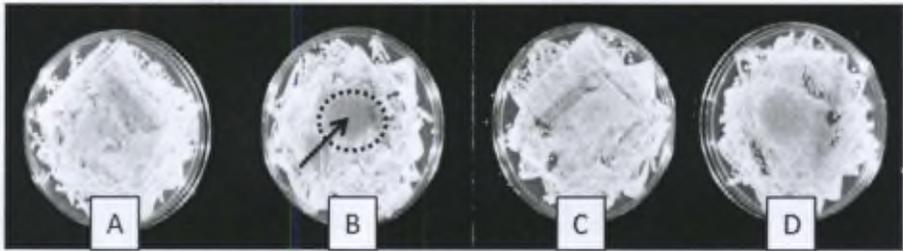
peroxydasique lorsque les concentrations en KI sont inférieures à 0,15 mM. En l'absence de lactoperoxydase, la combinaison G/GOD/KI est inefficace.

		Absorbance 600 nm moyenne \pm ESM (N)
contrôle négatif (avec 1.2 mM KI)		0.294 \pm 0.009 (6)
contrôle négatif (avec 0.3 mM KI)		0.243 \pm 0.009 (6)
contrôle négatif (avec 0,15mM KI)		0.234 \pm 0.009 (6)
contrôle négatif (avec 0,07 mM KI)		0.225 \pm 0.009 (6)
contrôle négatif (sans KI)		0.225 \pm 0.020 (6)
Conditions de culture	Δ Absorbance 600 nm moyenne \pm ESM (N)	%
contrôle positif	0.894 \pm 0.022 (6)	100.0 \pm 3.5 (6)
G/GOD	0.917 \pm 0.020 (6)	102.6 \pm 3.4 (6)
G/GOD/LPO	0.935 \pm 0.021 (6)	104.6 \pm 3.5 (6)
G/GOD/1.20 mM KI	0.929 \pm 0.011 (6)	103.4 \pm 2.8 (6)
G/GOD/LPO/1.20 mM KI	0.026 \pm 0.011 (6)***	2.9 \pm 1.2 (6)***
G/GOD/LPO/0.60 mM KI	0.029 \pm 0.013 (6)***	3.2 \pm 1.5 (6)***
G/GOD/LPO/0.30 mM KI	0.659 \pm 0.033 (6)***	73.7 \pm 4.1 (6)***
G/GOD/LPO/0.15 mM KI	0.891 \pm 0.010 (6)	99.7 \pm 2.7 (6)
G/GOD/LPO/0.07 mM KI	0.884 \pm 0.026 (6)	98.9 \pm 3.8 (6)
contrôle négatif	0.000	0.0

Tableau XVIII. Effet d'une exposition à différentes concentrations d'hypoiodite sur *Candida albicans*. Les astérisques indiquent les significations statistiques trouvées avec un test ANOVA complété par un test de comparaisons multiples de Dunnett (***) = $p < 0,001$.

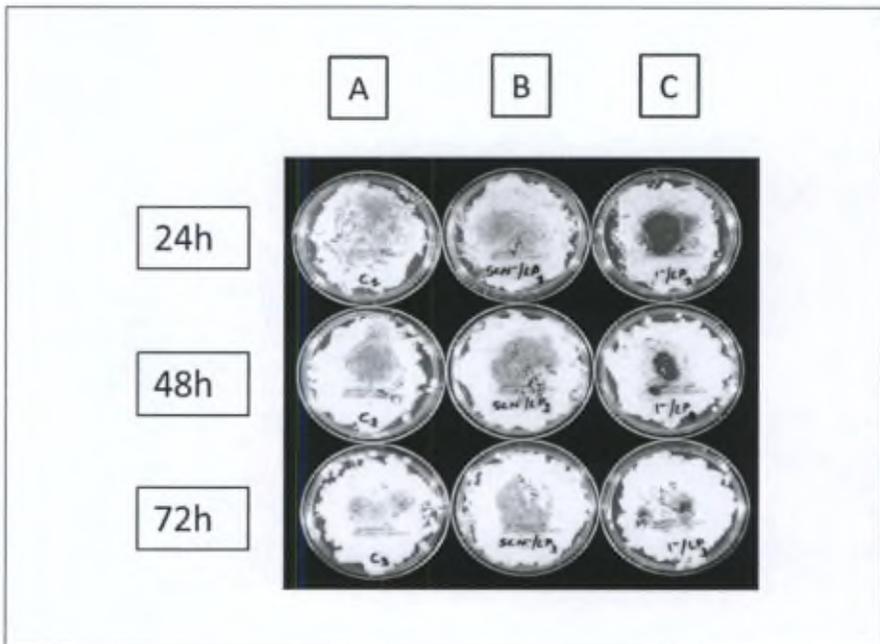
Activité d'un gel oral enrichi en système peroxydase

Les données obtenues en solution aqueuse ont été confirmées après incorporation des composants des systèmes peroxydasiques dans un gel applicable en milieu oral. Après étalement de ces gels sur un milieu solide (Sabouraud / Gentamycine / Chloramphénicol) ensemencé en nappe avec une suspension de *C. albicans*, seul le gel G/GOD/LPO/KI 1,2 mM permet de mettre en évidence une plage d'inhibition. La photographie 12 est représentative de 6 expériences indépendantes. La boîte A correspond au système G/GOD/LPO/KSCN : aucun effet inhibiteur ne peut être mis en évidence après 48 h de culture par comparaison avec le contrôle (gel sans LPO, ni GOD, ni KSCN, ni KI, boîte D). La zone d'inhibition visible en présence de G/GOD/LPO/KI 1,2 mM (boîte B) est absente pour une concentration 20 fois plus faible en KI (boîte C).



Photographie 12. *Candida albicans* ATCC 10231 cultivé sur Sabouraud / Gentamycine / Chloramphénicol à 37° C pendant 48 h. A : gel G/GOD/LPO/KSCN 1,2 mM; B : gel G/GOD/LPO/KI 1,2 mM; C : gel G/GOD/LPO/KI 0,06 mM ; D : gel contrôle. Le cercle pointillé indique la zone d'application du gel. La flèche indique la zone stérile.

La photographie 13 montre l'évolution au cours du temps de la zone d'inhibition observée en présence de KI 1,2 mM (colonne C). Celle-ci est déjà maximale après 24 h de culture à 37° C puis disparaît progressivement en 3 jours. La condition A correspond au contrôle et la condition B au gel G/GOD/LPO/KSCN. La photographie 13 est représentative de 6 expériences indépendantes.



Photographie 13. *Candida albicans* ATCC 10231 cultivé sur Sabouraud / Gentamycine / Chloramphénicol à 37° C pendant 24, 48 et 72 heures. A : gel contrôle, B : gel G/GOD/LPO/KSCN 1,2 mM, C : gel G/GOD/LPO/KI 1,2 mM.

L'activité minimale inhibitrice de la GOD a été évaluée par comptage et par un test de diffusion radiale après 2 jours d'incubation à 37° C. Le taux de survie a été exprimé en pourcentage du contrôle pairé sans GOD et le rayon d'inhibition autour d'un puits (rempli de 1 g de gel) exprimé en millimètres (mm). Le Tableau XIX résume les données.

Système oxydatif	activité GOD (U/gel ml)	Taux de survie (%)	Rayon d'inhibition (mm)
G/GOD	0.000	100.0 ± 9.8 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	0.150	105.9 ± 8.7 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	1.500	4.9 ± 2.4 (6) ***	0.0 ± 0.0 (3)
	3.000	0.0 ± 0.0 (6) ***	0.0 ± 0.0 (3)
G/GOD/KSCN/LPO	0.000	107.4 ± 9.3 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	0.050	88.5 ± 4.6 (6) *	0.0 ± 0.0 (3)
	0.250	66.9 ± 4.2 (6) ***	0.0 ± 0.0 (3)
	0.500	16.9 ± 1.8 (6) ***	0.0 ± 0.0 (3)
	1.000	13.6 ± 4.1 (6) ***	0.0 ± 0.0 (3)
	1.500	3.0 ± 1.3 (6) ***	0.3 ± 0.2 (3)
	3.000	0.0 ± 0.0 (6) ***	0.0 ± 0.0 (3)
	6.000	0.0 ± 0.0 (6) ***	0.7 ± 0.2 (3) *
G/GOD/KI/LPO	0.000	113.9 ± 1.9 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	0.005	43.0 ± 10.9 (6) ***	0.3 ± 0.1 (3)
	0.010	0.0 ± 0.0 (6) ***	1.0 ± 0.3 (3)
	0.020	0.0 ± 0.0 (6) ***	1.8 ± 0.3 (3) **
	0.040	0.0 ± 0.0 (6) ***	4.9 ± 0.1 (3) ***
	0.400	0.0 ± 0.0 (6) ***	5.2 ± 0.3 (3) ***
	1.000	0.0 ± 0.0 (6) ***	6.9 ± 0.7 (3) ***

Tableau XIX. Croissance de *Candida albicans* (ATCC 10231) sur milieu solide de Sabouraud recouvert par un gel contenant le système oxydatif (G/GOD produisant H₂O₂ ; G/GOD/KSCN/LPO produisant l'hypothiocyanite et G/GOD/KI/LPO produisant l'hypiodite). G: glucose, GOD: glucose-oxydase, LPO: lactoperoxydase. Les activités minimales inhibitrices de GOD sont indiquées sur fond grisé; les astérisques correspondent au niveau de signification statistique obtenu par un test ANOVA complété par un test de comparaisons multiples de Dunnett (* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

IV. 3. Adsorption de la lactoperoxydase sur des biomatériaux

Lorsque l'évolution dans le temps de la peroxydation de l'orthophénylènediamine fut suivie sur un spectrophotomètre (Figure 24) pour différentes concentrations de lactoperoxydase libre (de 0,24 à 0,96 U_{ABTS} / ml), l'absorbance à 492 nm a toujours atteint un plateau après 15 minutes. La différence entre la valeur initiale et celle du plateau (avec ou sans addition de HCl - l'HCl est ajouté pour augmenter la sensibilité de la révélation du chromogène oxydé et arrêter la réaction enzymatique) étaient proportionnelle à l'activité présente de la lactoperoxydase. Des mesures répétées à différents niveaux d'activité en lactoperoxydase ont montré un coefficient de variation inférieur à 6 %. Une telle courbe étalon permet de déduire l'activité de la lactoperoxydase adsorbée sur une surface de titane.

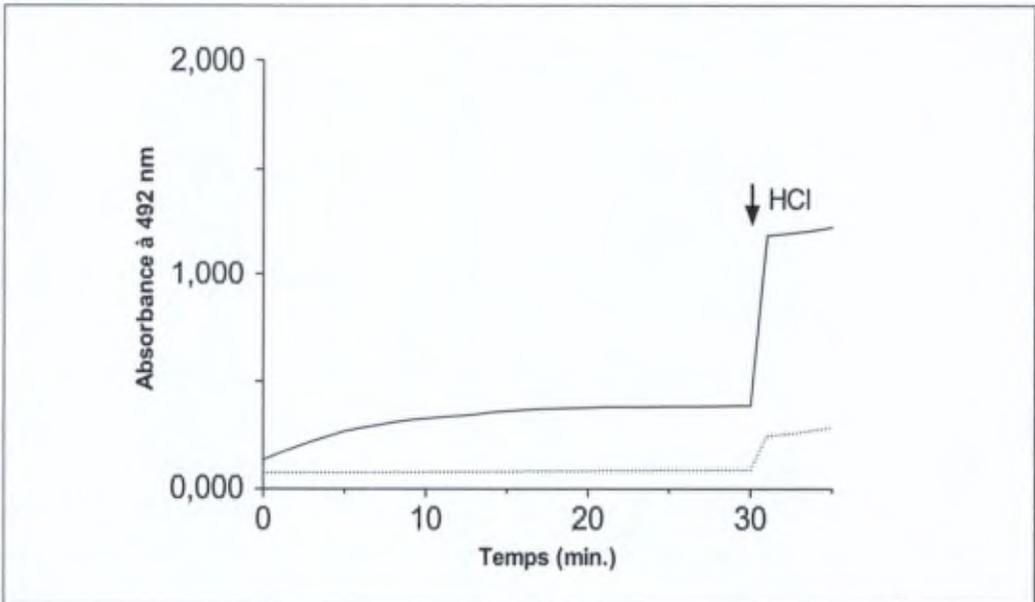


Figure 24. Evolution dans le temps de l'activité peroxydasique (0,48 U_{ABTS} / ml lactoperoxydase dans 0,1M de tampon acétate pH 5,0): pointillé et ligne pleine représentent le contrôle et l'essai respectivement.

La saturation de la surface de titane (Figure 25) était déjà atteinte à une concentration de lactoperoxydase de 0,96 U_{ABTS} / ml avec une valeur d'adsorption maximale moyenne de $4,2 \pm 0,4 \mu\text{U}_{\text{ABTS}}/\text{mm}^2$ (N = 4 pour 1 expérience indépendante).

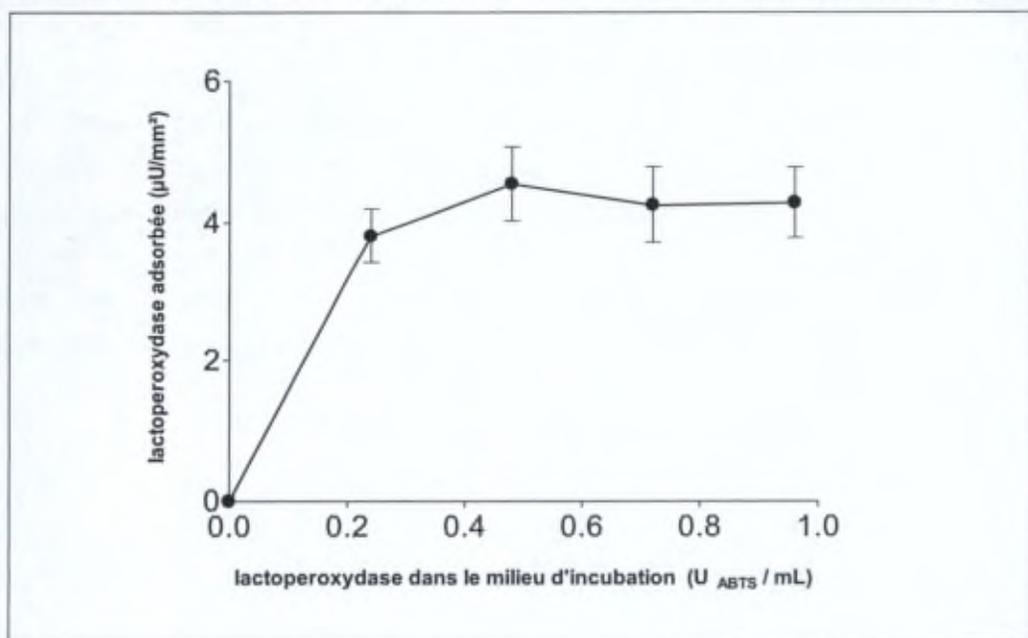


Figure 25. Effet de la concentration en lactoperoxydase dans le milieu d'incubation sur la capacité d'adsorption des surfaces de titane (moyenne \pm ESM, N = 4).

Le tableau XX montre les valeurs de la peroxydase adsorbée sur les surfaces de verre et de titane. La présence de lactoperoxydase adsorbée sur le verre a été démontrée dans le tube essai d'incubation malgré l'enlèvement du feuillet de titane et 3 lavages différents. La présence de lactoperoxydase adsorbée sur la surface en titane a été montrée dans le dernier tube essai où le feuillet de titane a été finalement placé après 5 transferts d'un tube à l'autre et 15 lavages. Il n'y avait pas d'activité peroxydasique dans les tubes de lavage intermédiaires (photographie 14). La quantité de lactoperoxydase adsorbée, calculée sur la base de l'activité de la lactoperoxydase, valait $25,2 \pm 6,84 \mu\text{U}_{\text{ABTS}}/\text{mm}^2$ (N = 6, 1 expérience indépendante) sur les surfaces en verre et de $8,4 \pm 0,6 \mu\text{U}_{\text{ABTS}}/\text{mm}^2$ (N = 30, 5 expériences indépendantes) sur les surfaces en titane. La précision intra-essai se situait entre 11 et 24 % (N = 6) alors que la précision d'un jour à l'autre atteignait 37 % (N = 30, 5 expériences indépendantes).



Conditions expérimentales	Lactoperoxydase adsorbée ($\mu\text{U}/\text{mm}^2$)
---------------------------	---

Sur la paroi en verre du tube d'incubation	25,2 \pm 6,84 (N = 6)
Sur le 1 ^{er} tube de lavage	0.00 (N = 6)
Sur le 2 ^{ème} tube de lavage	0.00 (N = 6)
Sur le 3 ^{ème} tube de lavage	0.00 (N = 6)
Sur le 4 ^{ème} tube de lavage	0.00 (N = 6)
Sur la surface de titane	12,8 \pm 2,28 (N = 6)

Photographie 14 et tableau XX. Adsorption de lactoperoxydase sur des surfaces de verre et de titane suivant la procédure décrite. Chaque tube d'incubation et chaque tube intermédiaire ont été lavés 3 fois avant de transférer le feuillet de titane dans un autre tube. Les différents tubes et les feuillets de titane, finalement transférés dans un 5^{ème} tube propre, ont été testés par addition des réactifs de la réaction enzymatique.

Lorsque les propriétés cinétiques de la lactoperoxydase liée ou libre sont comparées, aucune différence d'activité n'est observée. En effet, l'activité de la peroxydase liée atteignait 94.3 ± 10.8 % (moyenne \pm ESM, N = 8) de l'activité d'une quantité équivalente de lactoperoxydase libre en présence de différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène comprises entre 0.12 et 7 mM, et 93.5 ± 7.9 % (moyenne \pm ESM, N = 4) en présence de différentes concentrations d'ortho-phénylènediamine comprises entre 5.5 et 82.8 mM. L'adsorption de la lactoperoxydase mesurée pour différentes conditions d'incubation (N = 6) est résumée dans le tableau XXI. Parmi différentes concentrations de NaCl de 0 à 15 g/l, la concentration physiologique de 9 g/l était la condition optimale pour l'adsorption de la lactoperoxydase (ANOVA complété par un test de Bonferroni : $p < 0.05$). Les tampons testés n'ont pas affecté l'adsorption *in vitro* de lactoperoxydase à l'exception du tampon acétate qui était inhibiteur (ANOVA complété par un test de Bonferroni : $p < 0.05$). Le pré-traitement des feuillets de titane

dans 100 mM de CaCl_2 a permis une fixation de peroxydase plus importante : $16,4 \pm 2,6$ au lieu de $10,0 \pm 1,2 \mu\text{U}/\text{mm}^2$ ce qui correspondait à $163,6 \pm 4,7 \%$ de la valeur initiale ($N = 6$). Cette différence était statistiquement significative (test t de Student, $p < 0,001$).

Conditions expérimentales	Lactoperoxydase adsorbée (%)
[NaCl] 0 g/l	100
[NaCl] 3 g/l	$98,2 \pm 6,9$
[NaCl] 6 g/l	$76,8 \pm 8,3$
[NaCl] 9 g/l	$144,6 \pm 8,9$
[NaCl] 12 g/l	$66,1 \pm 6,9$
[NaCl] 15 g/l	$98,2 \pm 5,8$
H_2O	100
0.1 M tampon phosphate pH 7.0	$110,5 \pm 7,9$
0.1 M HEPES pH 7.0	$110,5 \pm 6,8$
0.1 M TRIS pH 7.0	$63,3 \pm 13,9$
0. 1 M tampon acétate pH 5.5	$17,7 \pm 21,3$
0. 1 M tampon citrate pH 5.5	$133,1 \pm 12,2$
Feuillet titane non prétraité	100
Feuillet titane prétraité au CaCl_2	$163,6 \pm 4,7$

Tableau XXI. Effet de différentes conditions expérimentales d'incubation sur l'adsorption de la lactoperoxydase à des surfaces en titane. Tous les résultats sont exprimés en pourcentage (moyenne \pm ESM, $N = 6$) de la lactoperoxydase adsorbée / mm^2 surface dans le contrôle interne pairé (100 % représentant $6,7 \pm 0,5$ – dans le premier encart; $8,0 \pm 0,6$ - dans le deuxième encart et $10,0 \pm 0,5 \mu\text{U}_{\text{ABTS}}/\text{mm}^2$ dans le troisième encart).

L'analyse XPS (*cf*r page 29) des feuillets immergés dans une solution de lactoperoxydase (Sigma™, USA) pendant 30 min ou 24 heures a confirmé l'adsorption d'azote protéique sur les surfaces en titane. Les pourcentages de titane et d'oxygène ont décréu alors que carbone et azote augmentaient comme montré dans le tableau XXII. Le pourcentage d'azote a augmenté de 0.9 à 12.7 % et de 3.7 à 14.1 % après une incubation de 30 min et 24 h respectivement.

	Ti	O	C	N
Feuillet contrôle (N=3)	12.9 ± 0.5	46.1 ± 1.0	39.4 ± 0.3	0.9 ± 0.5
Feuillet prétraité 30 min LPO (N=3)	3.7 ± 0.3	23.0 ± 1.0	60.7 ± 0.9	12.7 ± 0.3
Feuillet contrôle (N=3)	12.0 ± 1.5	41.7 ± 0.9	42.7 ± 2.7	3.7 ± 0.3
Feuillet prétraité 24 h LPO (N=5)	1.4 ± 0.2	20.4 ± 0.6	63.0 ± 0.4	14.4 ± 0.9
Pourcentages atomiques relatifs de la lactoperoxydase	-	29.9	56.4	13.7

Tableau XXII. Pourcentages atomiques relatifs (obtenus par XPS) du titane (Ti), de l'oxygène (O), du carbone (C) et de l'azote (N) sur des surfaces en titane après incubation (30 min ou 24 h) en présence de lactoperoxydase (LPO). Les pourcentages atomiques relatifs des mêmes espèces dans la lactoperoxydase, calculés à partir de données de la littérature (Thomas *et al*, 1991), ont été indiqués pour comparaison.

L'analyse des spectres XPS (Briggs & Seah, 1983) montra le pic caractéristique de l'azote N1s à 400.5 eV pour le contrôle et pour le titane après incubation dans la lactoperoxydase (figure 26).

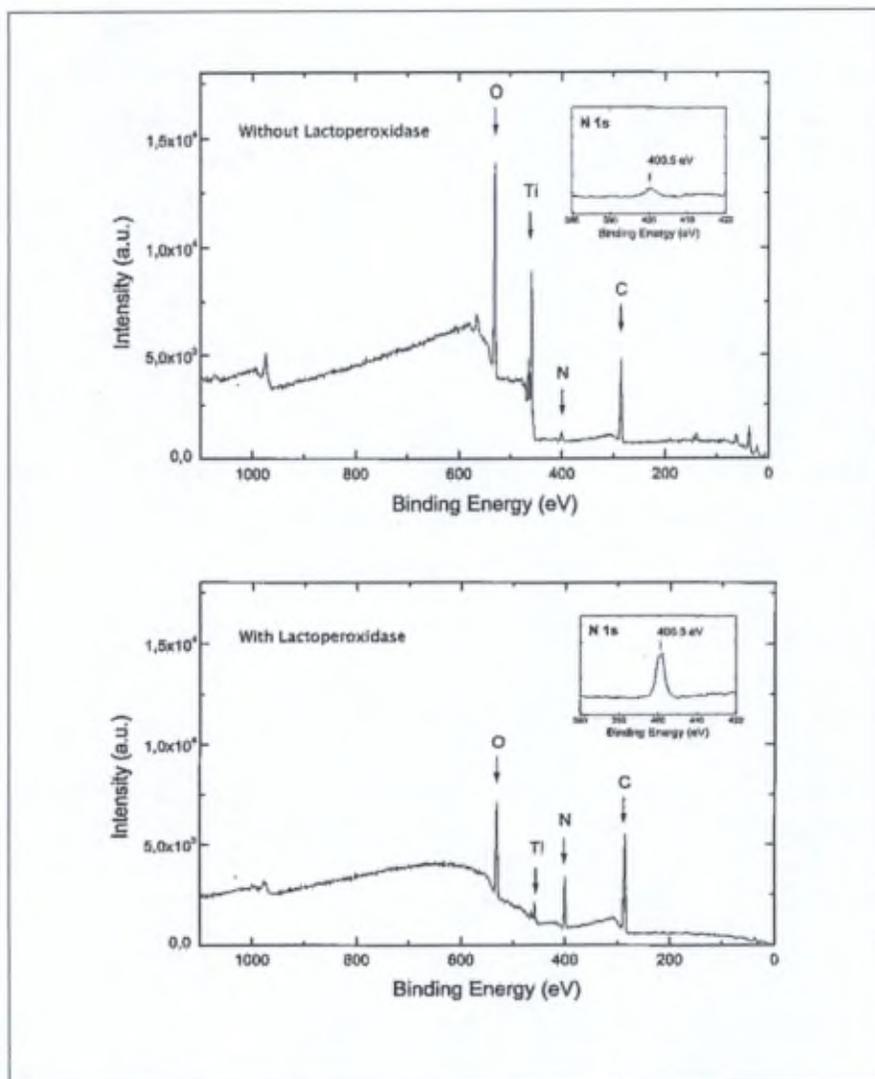


Figure 26. Spectres XPS de surfaces de titane exposées à de l'eau (cadre supérieur) ou à de la lactoperoxydase (0.8 mg/ml) dissoute dans de l'eau (cadre inférieur). Encart : agrandissement du signal azote. *a.u.*: unités arbitraires.

IV. 4. Validation d'un modèle de biofilm à *Candida albicans*

Evaluation de la phase planctonique

Des suspensions de poudre de titane en milieu liquide de Sabouraud ont été contaminées par des blastoconidies de *Candida albicans* (ATCC 10231). La figure 27 montre l'évolution de la turbidimétrie de la phase planctonique au cours du temps pendant 3 semaines. Le développement de la phase planctonique se caractérise par une augmentation de la turbidité du milieu de Sabouraud dans lequel baigne la poudre de titane. L'absorbance à 600 nm du surnageant passe de 0.020 ± 0.000 (N = 4) à 0.653 ± 0.010 (N = 21) après 2 jours. La densité optique atteint un maximum après 14 jours (0.929 ± 0.142 ; N = 4) puis diminue à 21 jours (0.161 ± 0.058 ; N = 4).

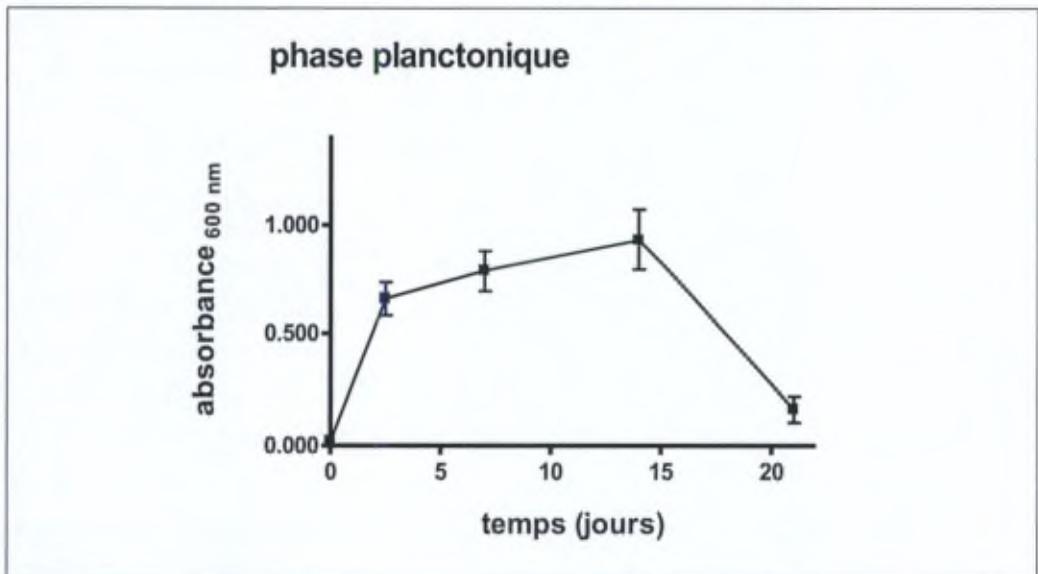


Figure 27. Evolution au cours du temps de la biomasse de levure dans la phase planctonique.

Après une incubation de 2 jours et l'élimination de la phase planctonique, trois lavages successifs dans un volume identique de Sabouraud stérile ont montré une turbidité plus importante que celle du premier surnageant (figure 28). En effet, la turbidité après le premier lavage représentait 764.2 ± 115.4 (N = 32) % de la turbidité de la phase planctonique (soit le premier surnageant). Après le deuxième et troisième lavage ; la

turbidité valait encore 499.8 ± 74.2 % (N = 32) et 292.2 ± 50.4 % (N = 28) de la valeur initiale.

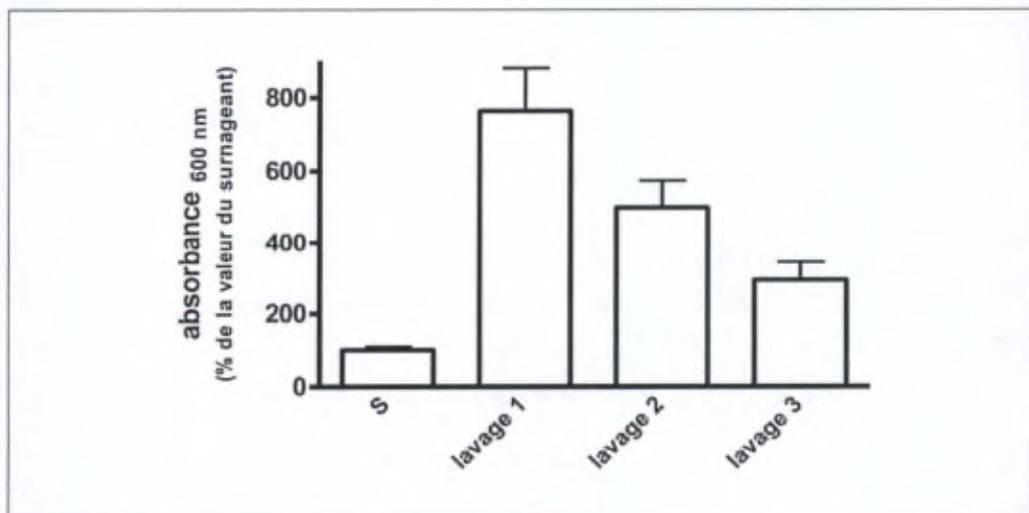


Figure 28. Effet des lavages sur la turbidité du liquide dans lequel baigne la poudre de titane.
S : surnageant.

Dans une autre série d'expériences (figure 29), l'effet des lavages a été étudié sur 3 biomatériaux immédiatement et après incubation de 2 jours à température ambiante. Le titane en poudre (N = 21), les feuillets de titane (N = 12) et de résine (N = 24) ont été lavés 3 fois (lavage 1 à 3) dans du bouillon stérile. La turbidité du surnageant après sédimentation a été mesurée à 600 nm. Les contrôles sans incubation avaient été contaminés par le premier surnageant infecté juste avant les procédures de lavages. Les colonnes noires représentent les expériences où la poudre de titane a été lavée immédiatement après contamination par des levures. Les données sont exprimées en pourcentage de l'absorbance (A_{600nm}) mesurées dans le premier surnageant.

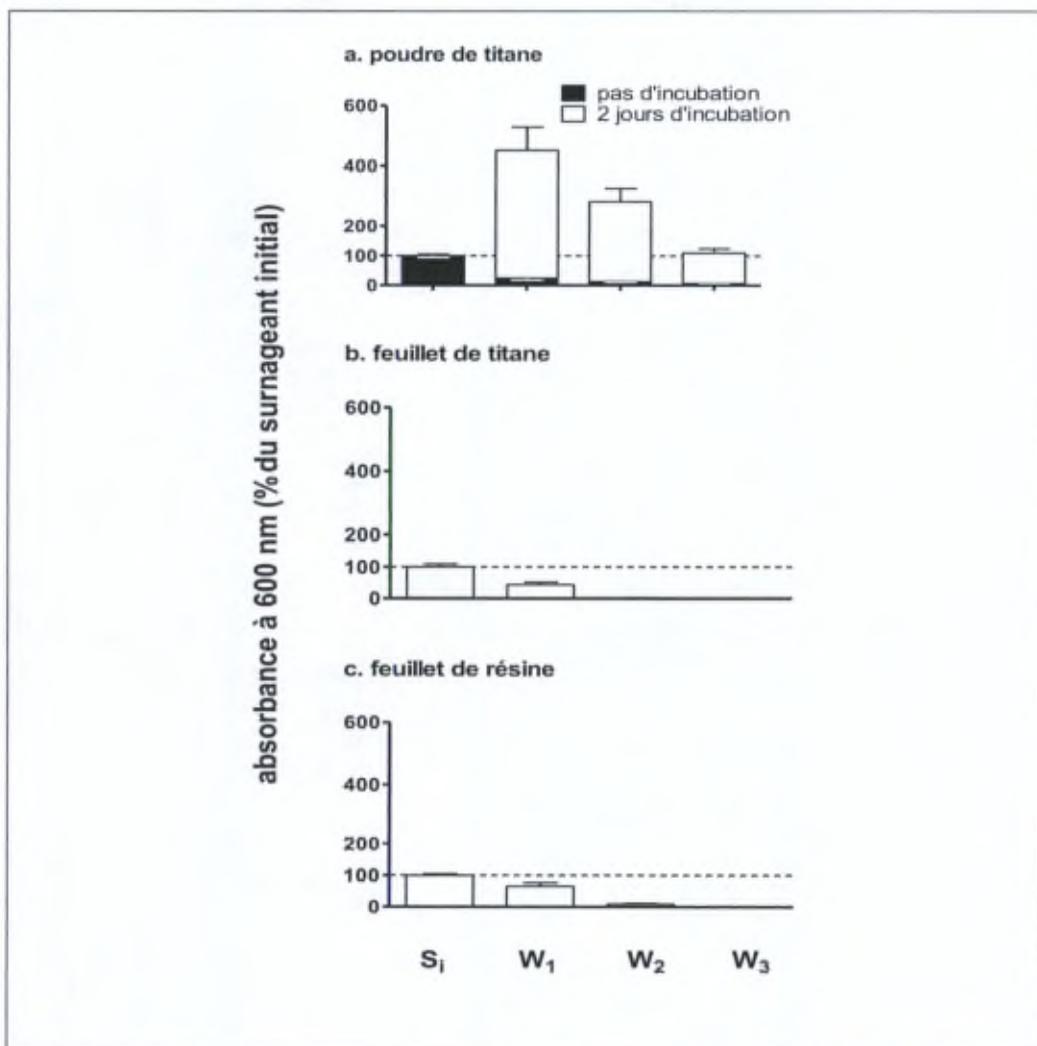


Figure 29. Suivi du processus de lavage des matériaux par turbidimétrie (600 nm). S₁: premier surnageant après une incubation de 2 jours ; W_n: surnageant après chacune des 3 étapes de lavage.

Evaluation de la phase attachée

La mesure de l'absorbance à 570 nm permet de démontrer une biomasse de *Candida* adhérente à la poudre de titane, faible lorsque le biomatériau fut infecté sans être incubé par la suite, plus importante lorsque le biomatériau infecté fut incubé pendant 2 jours (figure 30).

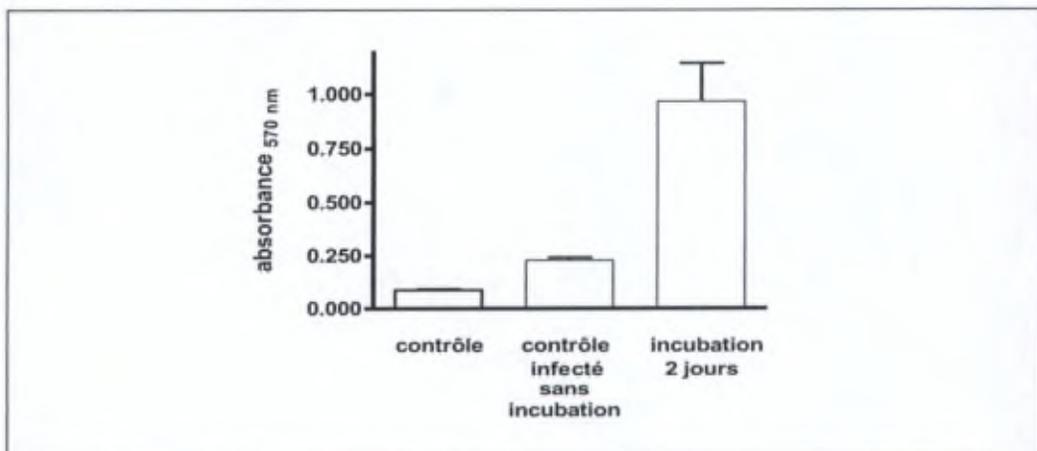


Figure 30. Biomasse de levures évaluée par la méthode de réduction du MTT après incubation de 2 jours.

La figure 31 indique l'évolution de la phase attachée au cours du temps. La densité optique à 570 nm, après incubation en présence de MTT, atteint un maximum ($1,280 \pm 0,112$; $N = 4$) après 14 jours puis diminue ($0,887 \pm 0,044$; $N = 4$) à 21 jours.

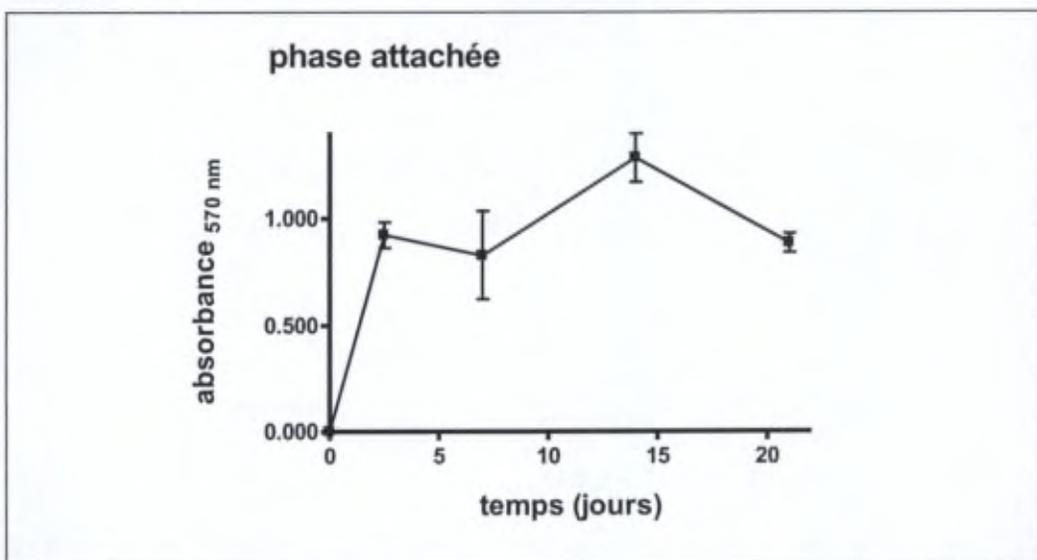
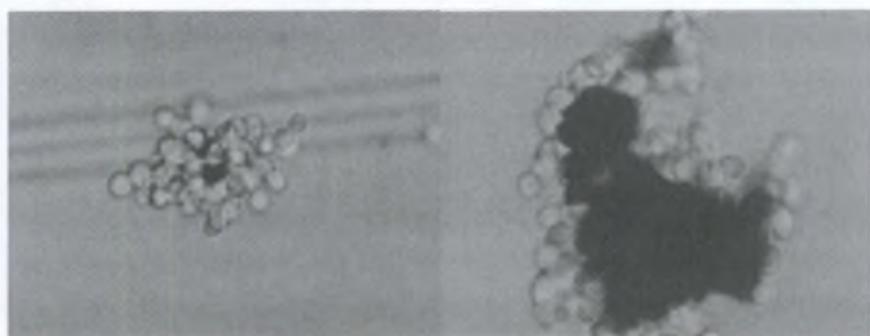


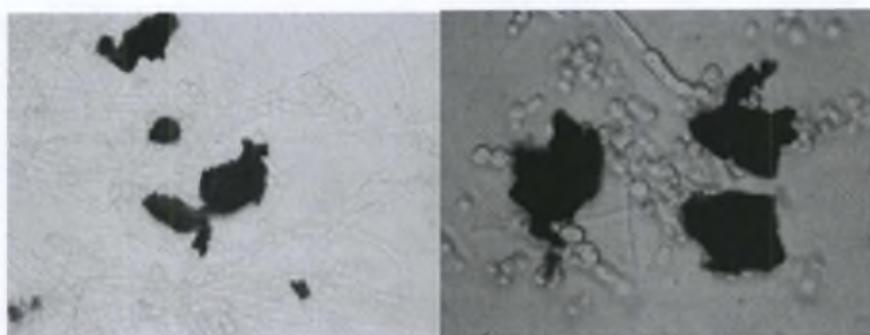
Figure 31. Evolution au cours du temps de la biomasse de levure dans la phase attachée sur poudre de titane.

La formation de biofilm à *Candida* fut confirmée par des examens microscopiques à frais et en fluorescence après coloration au calcofluor.

La photographie 15 (gauche et droite) montre l'aspect de grains de titane plongés dans un bouillon de Sabouraud infecté par *Candida albicans* ATCC 10231 pendant 2 jours à température ambiante. Les grains ont été prélevés à l'aide d'une pipette Pasteur effilée puis transférés dans une gouttelette de H₂O stérile. Cette photographie montre plusieurs couches de blastoconidies centrées sur un grain, apparues donc en 2 jours d'incubation. La photographie 16 montre l'architecture plus complexe d'un biofilm à *Candida* formé sur grains de titane après 3 semaines d'incubation à température ambiante : plusieurs grains sont entourés de blastoconidies, d'hyphes et pseudohyphes ; les blastoconidies ne constituent plus nécessairement la première couche attachée au support. La photographie 17 montre 2 feuillets de titane : celui de gauche, feuillet contrôle, a été conservé pendant 1 jour dans un bouillon gardé stérile ; celui de droite a incubé dans un bouillon infecté par la souche *Candida* ATCC10231. Une observation attentive permet de constater la présence de blastoconidies sur la surface du titane. La photographie 18 montre des biofilms à *Candida* observés sur le tranchant d'un feuillet de titane (épaisseur : 25 microns) après 1 semaine d'incubation à température ambiante : les blastoconidies constituaient alors toujours la structure prédominante et attachée au support. La photographie 19 montre quelques grains de titane après 3 jours d'incubation dans un bouillon infecté et 3 lavages : quelques blastoconidies étaient encore attachées au matériau. De plus, on pouvait observer un matériel pas nécessairement filamenteux tendu entre différents grains. Enfin, la photographie 20_{gauche} montre des grains infectés après 3 semaines d'incubation avec une structure trabéculaire émettant une fluorescence en présence de calcofluor (photographie 20_{droite}) et interprétée comme du matériel polysaccharidique sécrété par les levures.



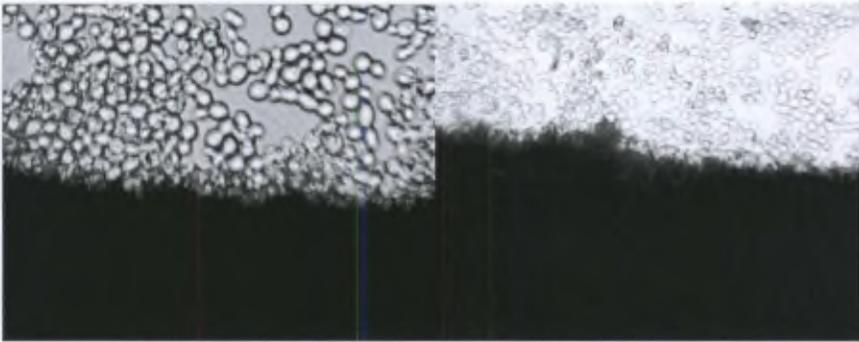
Photographie 15. Biofilm à *Candida* sur grains de titane en microscopie optique à un grossissement de 400 X après incubation pendant 2 jours à température ambiante.



Photographie 16. Biofilm à *Candida* sur grains de titane en microscopie optique après incubation pendant 3 semaines.



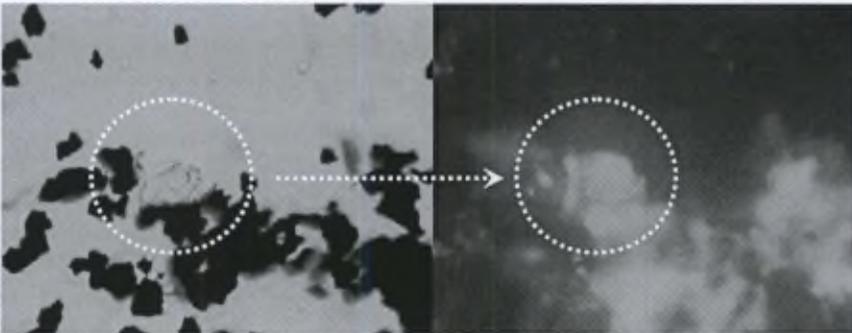
Photographie 17. Biofilm à *Candida* sur feuillet de titane en microscopie optique après incubation pendant 1 jour.



Photographie 18. Biofilm à *Candida* sur feuillet de titane en microscopie optique après incubation pendant 1 semaine.



Photographie 19. Micrographie de grains de titane contaminés par *C. albicans*, après 3 jours d'incubation et 3 lavages. Observation en microscopie photonique.



Photographie 20. Micrographie de grains de titane contaminés par *C. albicans*, après 3 semaines d'incubation et 3 lavages. A gauche : observation en microscopie photonique; à droite : observation en épifluorescence (coloration au calcofluor). Le cercle en pointillé indique du matériel exopolysaccharidique sécrété par les levures.

IV. 5. Effet des systèmes peroxydasiques sur les biofilms à *Candida albicans*

Différents biomatériaux furent incubés pendant 2 jours avec *Candida albicans*, en absence et en présence de systèmes peroxydasiques. Le tableau XXIII résume le nombre de blastoconidies adhérentes par unité de masse ou de surface sur des matériaux contrôles non infectés.

Matériel	Incubation	Nombre blastoconidies adhérentes
<i>poudre:</i>		<i>(nombre / g)</i>
titane	traitement immédiat	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6 / \text{g}$ (N = 3)
	2 jours	$7.5 \pm 0.6 \times 10^6 / \text{g}$ (N = 30)
<i>feuille:</i>		<i>(nombre / cm²)</i>
titane	2 jours	$494.9 \pm 40.2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ (N = 12) (équivalent à $35.6 \pm 2.9 \times 10^6 / \text{g}$)
résine molle	2 jours	$20.5 \pm 3.9 \times 10^3 / \text{cm}^2$ (N = 12)
résine dure	2 jours	$13.7 \pm 3.2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ (N = 12)
polystyrène	2 jours	$36.7 \pm 3.7 \times 10^3 / \text{cm}^2$ (N = 4)

Tableau XXIII. Nombre de blastoconidies adhérentes sur différents biomatériaux (titane, résine, polystyrène) après une incubation à température ambiante. Les données sont exprimées par unité de masse pour la poudre ou par unité de surface pour les feuillets.

Afin d'étudier l'effet des systèmes peroxydasiques sur l'adhérence de *C. albicans* au titane, de la poudre de titane (mesh 325; 0,5 g) fut incubée pendant 2 et 4 jours dans un bouillon de Sabouraud (4 ml) ensemencé avec *C. albicans* en absence et en présence d'un système peroxydasique. Deux systèmes furent étudiés (*cf*r Tableau XXIV):

- glucose (115 mM), GOD (0,2 ou 1,3 U/ml), KSCN (1,2 mM), LPO (7,9 U_{ABTS}/ml) ;
- glucose (115 mM), GOD (0,2 ou 1,3 U/ml), KI (1,2 mM), LPO (7,9 U_{ABTS}/ml).

Les particules (325 mesh) de titane sans système peroxydasique renaient l'équivalent de 910.10^3 à $1\ 658.10^3$ blastoconidies par g de titane malgré les lavages. Par contre, en présence d'un système peroxydasique produisant de l'hypiodite, on

notait une diminution des levures fixées sur les grains de titane. En présence de GOD 1,3 U / ml, les 2 systèmes peroxydasiques G / GOD / KSCN / LPO et G / GOD / KI / LPO empêchait la croissance de *Candida* à la fois dans les phases planctonique et attachée pendant au moins 4 jours. En effet, les absorbances à 600 nm des surnageants (phase planctonique) étaient de $0,017 \pm 0,008$ (N = 9) et $0,059 \pm 0,023$ (N = 9) respectivement *versus* $0,658 \pm 0,056$ (N = 12) pour le contrôle sans système oxydatif : cette diminution de la turbidité des surnageants était statistiquement significative (test ANOVA : $p < 0,0001$, Dunnett : $p < 0,001$). Les absorbances à 570 nm après coloration au MTT (reflétant la phase attachée du biofilm) étaient $0,065 \pm 0,021$ (N = 9) et $0,040 \pm 0,018$ (N = 9) respectivement *versus* $0,788 \pm 0,061$ (N = 13) pour le contrôle sans système oxydatif : cette réduction de la coloration par le MTT était elle aussi statistiquement significative (ANOVA : $p < 0,0001$, Dunnett : $p < 0,001$). En présence de 0,2 U / ml de GOD, le système G / GOD / KI / LPO stérilisait à la fois la phase planctonique et la phase attachée pendant 4 jours alors que le système G / GOD / KSCN / LPO ne retardait l'attachement de *Candida* sur le titane que du jour 2 au jour 4 sans aucun effet sur la croissance planctonique. En effet, au jour 2, l'absorbance à 600 nm était en moyenne de $0,453 \pm 0,005$ (N = 3) en présence de thiocyanate et de $0,030 \pm 0,001$ (N = 3) pour l'iodure *versus* $0,452 \pm 0,075$ (N = 3) pour le contrôle sans système oxydatif : la diminution de la turbidité des surnageants en présence d'hypoiodite était statistiquement significative (ANOVA : $p = 0,0007$, Dunnett : $p < 0,001$). Les absorbances à 570 nm étaient $0,366 \pm 0,019$ (N = 3) et $0,112 \pm 0,059$ (N = 3) respectivement *versus* $1,153 \pm 0,073$ (N = 3) pour le contrôle (ANOVA : $p < 0,0001$, Dunnett : $p < 0,001$). Une incubation de 2 jours en présence d'hypothiocyanite diminuait la biomasse attachée jusqu'à $31,7 \pm 2,6$ % (N = 3) du contrôle pairé sans aucun effet sur la croissance planctonique de *Candida* ($100,2 \pm 2,8$ % du contrôle pairé, N = 3). Cependant, après une exposition de 4 jours au système G / GOD / KSCN / LPO, la biomasse attachée atteignait $95,5 \pm 6,6$ % (N = 3) du contrôle mesuré à 2 jours. Les absorbances à 600 nm étaient alors (au jour 4) $0,927 \pm 0,042$ (N = 3) pour le système avec SCN⁻ et $0,029 \pm 0,001$ (N = 3) pour celui avec KI *versus* $0,757 \pm 0,100$ (N = 3) pour le contrôle. La diminution en présence du système G / GOD / KI / LPO était statistiquement significative (ANOVA : $p < 0,0001$, Dunnett : $p < 0,001$) alors que l'augmentation en présence de G / GOD / KSCN / LPO ne l'était pas. Les absorbances à 570 nm étaient $1,101 \pm 0,030$ (N = 3) et $0,125 \pm 0,007$ (N = 3) respectivement *versus* $0,820 \pm 0,027$ (N = 3) pour le contrôle sans système oxydatif : l'augmentation en

présence d'hypothiocyanite et la diminution en présence d'hypiodite étaient statistiquement significatifs (ANOVA : $p < 0,0001$; Dunnett : $p < 0,001$).

			contrôle	G/GOD/KSCN/LPO	G/GOD/KI/LPO
GOD: 0.2 U/ml	incubation: 2 jours	phase planctonique (absorbance à 600 nm)	0.452 ± 0.075 (3)	0.453 ± 0.005 (3) NS	0.030 ± 0.001 (3) ***
		phase attachée (absorbance à 570 nm)	1.153 ± 0.073 (3)	0.366 ± 0.019 (3) ***	0.112 ± 0.059 (3) ***
	incubation: 4 jours	phase planctonique (absorbance à 600 nm)	0.757 ± 0.100 (3)	0.927 ± 0.042 (3) NS	0.029 ± 0.001 (3) ***
		phase attachée (absorbance à 570 nm)	0.820 ± 0.027 (3)	1.101 ± 0.030 (3) ***	0.125 ± 0.007 (3) ***
GOD: 1.3 U/ml	incubation: 4 jours	phase planctonique (absorbance à 600 nm)	0.658 ± 0.056 (12)	0.017 ± 0.008 (9) ***	0.059 ± 0.023 (9) ***
		phase attachée (absorbance à 570 nm)	0.788 ± 0.061 (13)	0.065 ± 0.021 (9) ***	0.040 ± 0.018 (9) ***

Tableau XXIV. Développement de *Candida albicans* après une incubation de 2 versus 4 jours en présence de OSCN⁻ et OI⁻ produits en présence de 0.2 versus 1.3 U/ml GOD. La phase planctonique a été monitorée par turbidimétrie (absorbance à 600 nm) et la phase attachée par la méthode au MTT (absorbance à 570 nm). G: glucose, GOD: glucose-oxydase, LPO: lactoperoxydase. Les astérisques indiquent la signification statistique obtenue par un test ANOVA complété par le test de comparaisons multiples de Dunnett (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Le développement de biofilms à *Candida* sur poudre de titane fut suivi pendant 3 semaines en absence et en présence de système peroxydasique.

En présence de GOD (1,3 U / ml) et de glucose (115 mM), les 2 systèmes peroxydasiques G / GOD / KSCN / LPO et G / GOD / KI / LPO empêchaient la croissance de la levure aussi bien dans le milieu de culture (phase planctonique) que dans la phase attachée au matériau au moins pendant 21 jours. Le Tableau XXV montre les données du suivi des 2 phases sous forme d'absorbances à 600 nm et à 570 nm exprimées en pourcentage du contrôle pairé (même temps d'incubation) sans système oxydant. Les 2 systèmes peroxydasiques permettaient de protéger la poudre de titane des levures pendant une période de 3 semaines. Les absorbances à 600 nm restaient toujours nulles. Ces mesures répétées (4 expériences indépendantes) à 1, 2 et 3 semaines montraient une inhibition persistante de la croissance de *Candida*. Cependant, une phase attachée, limitée mais réelle, a pu être démontrée sur la poudre

de titane par coloration au MTT. En présence du système avec SCN⁻, une phase attachée a été observée, représentant de 11,3 ± 12,3 % du contrôle pairé à 7 jours, 24,9 ± 8,3 % à 14 jours et 18,7 ± 3,5 % à 21 jours (N = 4). En présence du système avec KI, aucune phase attachée ne put être démontrée (N = 4) après une semaine, celle-ci n'apparaissant qu'après 2 semaines (14,5 ± 3,7 % du contrôle pairé) et progressant légèrement encore après à 3 semaines (20,2 ± 3,7 %). Les tests Anova complétés par le test de comparaisons multiples de Dunnett attestaient la signification statistique de ces différences par rapport aux valeurs contrôles pairées (même temps d'incubation en absence de système oxydatif). Après le titane, l'effet des systèmes peroxydasiques sur l'adhérence de *C. albicans* à des matériaux utilisés en dentisterie fut confirmé sur la résine utilisée pour la fabrication des prothèses amovibles.

phase planctonique évaluée par turbidimétrie (absorbance à 600 nm)			
Temps d'incubation (jours)	Contrôle	G/GOD/SCN ⁻ /LPO	G/GOD/I ⁻ /LPO
7	100.0 ± 17,2 (4)	0.0 ± 0.1 (4) ***	0.0 ± 0.3 (4) ***
14	100.0 ± 21,6 (4)	0.0 ± 0.0 (4) ***	0.0 ± 0.0 (4) ***
21	100.0 ± 50,9 (4)	0.0 ± 0.0 (4)	0.0 ± 0.0 (4)
phase adhérente évaluée par méthode au MTT (absorbance à 570 nm)			
Temps d'incubation (jours)	contrôle	G/GOD/SCN ⁻ /LPO	G/GOD/I ⁻ /LPO
7	100.0 ± 35.1 (4)	11.3 ± 12.3 (4) *	0.0 ± 0.0 (4) *
14	100.0 ± 12.4 (4)	24.9 ± 8.3 (4) ***	14.5 ± 3.7 (4) ***
21	100.0 ± 7.0 (4)	18.7 ± 3.5 (4) ***	20.2 ± 3.7 (4) ***

Tableau XXV. Evolution au cours du temps de la biomasse de levure dans la phase planctonique et dans la phase ancrée après 7 à 21 jours, à température ambiante, en présence de système peroxydase avec soit du thiocyanate (SCN⁻) soit de l'iode (I⁻). Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle pairé sans système peroxydase. G: glucose ; GOD (1,3 U/ml): glucose-oxydase ; LPO : lactoperoxydase.

Des résultats antérieurs avaient démontré l'adsorption de la lactoperoxydase aux surfaces de titane. Les expérimentations schématisées ci-dessous (figure 32) avaient

pour objectif de déterminer l'éventuelle efficacité d'un système peroxydasique lorsque la lactoperoxydase adsorbée préalablement sur différents biomatériaux était activée par l'addition des 3 autres composants pour le contrôle d'un biofilm à *Candida*.

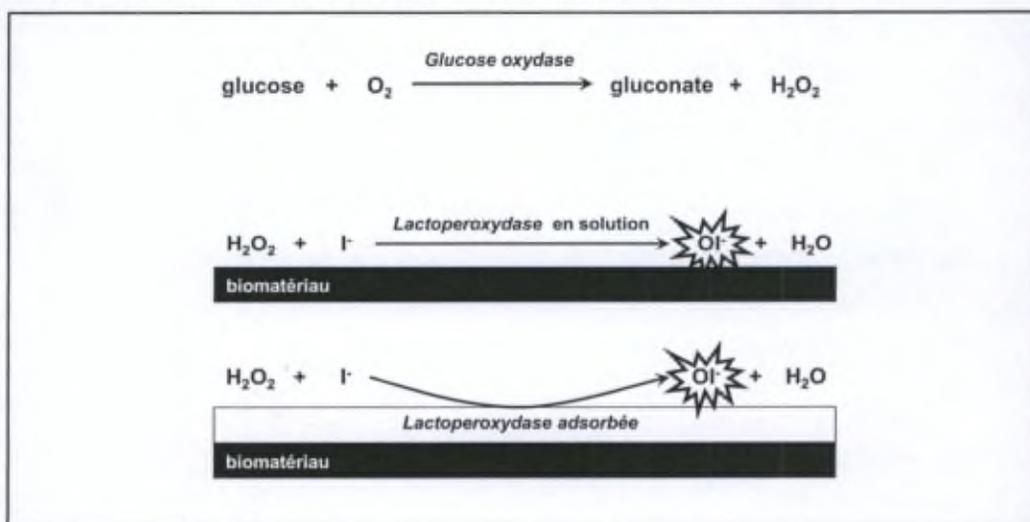


Figure 32. Représentation schématique de 2 modes d'utilisation de la lactoperoxydase.

La biomasse de *Candida albicans* en phase planctonique (toujours évaluée par turbidimétrie à 600 nm) et en phase attachée (toujours évaluée par spectrophotométrie à 570 nm) sur biomatériaux (titane ou résine) a été mesurée après une incubation de 2 jours. Le pouvoir anti-*Candida* d'un système peroxydasique G / GOD / KI / LPO avec lactoperoxydase ($L_{\text{adsorbée}}$) pré-adsorbée sur matériau (titane ou résine) a été comparé à celui du même système avec l'enzyme en solution ($L_{\text{solubilisée}}$). Pré-adsorbée ou non, la lactoperoxydase permettait toujours d'inhiber la croissance de *Candida*, aussi bien en phase planctonique qu'en phase attachée (figure 33). Il n'y avait pas de différence significative entre les biomatériaux préadsorbés et ceux qui ne l'étaient pas. Comme déjà signalé plus haut, plusieurs types de matériau furent utilisés dans ces expériences : feuillets de titane, morceaux de résine dure ou molle avec vernis ou sans. Tous les résultats concernant les morceaux de résine ont été poolés vu l'homogénéité des résultats (confirmée par la statistique). Le système G / GOD / KI / LPO aux conditions expérimentales empêchait au moins pendant 2 jours la croissance de *Candida* dans le liquide dans lequel le matériau était immergé (Figure 33) ainsi que la formation d'un biofilm sur le matériau. Les absorbances à 600 nm étaient de $0,029 \pm 0,001$ ($N = 24$) et $0,038 \pm 0,009$ ($N = 24$) respectivement lorsque la lactoperoxydase

était solubilisée dans le milieu de culture et lorsque la lactoperoxydase était pré-adsorbée sur les morceaux de résine *versus* $1,327 \pm 0,076$ (N = 24) pour le contrôle. Des résultats similaires ont été obtenus avec des feuillets de titane : $0,041 \pm 0,002$ (N = 4) et $0,045 \pm 0,002$ (N = 4) *versus* $1,691 \pm 0,038$ (N = 4). Les absorbances à 570 nm après coloration au MTT étaient de $0,035 \pm 0,006$ (N = 24) et $0,023 \pm 0,004$ (N = 24) respectivement lorsque la lactoperoxydase était solubilisée dans le milieu de culture et lorsque la lactoperoxydase était précoaté sur les morceaux de résine *versus* $0,161 \pm 0,032$ (N = 24) pour le contrôle. Des résultats similaires ont été obtenus avec des feuillets de titane.

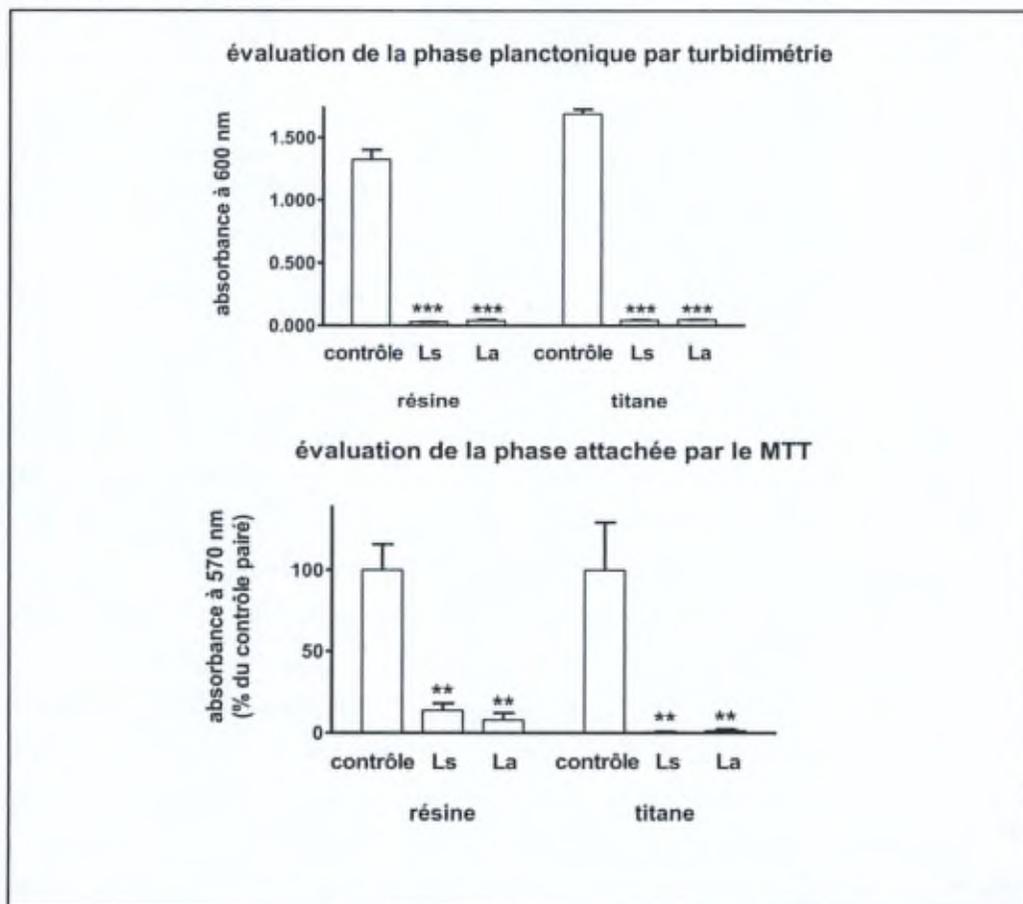


Figure 33. Biomasse de *Candida albicans* en phase planctonique et en phase attachée sur biomatériaux (titane ou résine) après une incubation de 2 jours (GOD: 1,3 U/ml). Les matériaux pré-adsorbés ou non avec de la lactoperoxydase sont nommés respectivement $L_{\text{adsorbée}}$ et $L_{\text{solubilisée}}$. Les astérisques indiquent le niveau de signification statistique obtenu par un test ANOVA complété par un test de comparaisons multiples de Dunnett (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

La photographie 21 montre la masse de *Candida albicans* adhérente au feuillet de titane (dépôts sombres entourés d'un cercle pointillé) après une incubation de 24 heures en présence de sel de tétrazolium. Le feuillet soumis à un système peroxydasique (KI / LPO) ne montre aucun dépôt similaire.



Photographie 21. A droite: Contrôle positif. La masse de *Candida albicans* adhérente au feuillet de titane (dépôts sombres) après une incubation de 24 heures en présence de sel de tétrazolium (MTT). A gauche : absence de levures sur un feuillet soumis à un système peroxydasique KI / LPO.

D'autres expériences avaient pour objectif d'aborder l'effet des systèmes peroxydasiques sur de petits nombres de blastoconidies incorporées dans de petits volumes de liquide déposés sur un matériau. Le Tableau XXVI montre les taux de récupération de blastoconidies dans du NaCl 9‰ déposées sur un feuillet de titane (de 11 à 119 blastoconidies dans 20 μ l de NaCl 9‰ lors de 5 expériences indépendantes). Après une incubation du feuillet de titane pendant 30 minutes à 37° C, on observe une récupération moyenne (après ensemencement du morceau de titane sur milieu solide de Sabouraud par frottement) comprise entre $60,7 \pm 21,9$ % (N = 3) et $102,5 \pm 16,5$ % (N = 6). Quel que soit le nombre de blastoconidies déposées, le taux de récupération reste supérieur à 60,7 %: Un test ANOVA ne montre aucune différence statistique entre les données des différentes expériences indépendantes (ANOVA : $p = 0,6167$). Lorsque les levures sont suspendues dans H₂O et déposées pendant 2 heures sur le titane, la récupération est plus élevée qu'après 30 min : $83,5 \pm 6,5$ % (N = 18 en 3 expériences indépendantes) versus $58,5 \pm 5,0$ % (N = 12 en 2 expériences indépendantes) respectivement (test t non païré de Student, $p = 0,0095$).

Blastoconidies suspendues dans du NaCl 9 ‰ pendant 30 min				
20 µL de suspension (CFU/boite)	(N)	20 µL sur titane (CFU/boite)	(N)	récupération (%)
119 ± 17	(6)	122 ± 9	(6)	102,5 ± 16,5
75 ± 5	(9)	61 ± 11	(4)	81,3 ± 15,6
61 ± 5	(6)	37 ± 13	(3)	60,7 ± 21,9
24 ± 3	(6)	20 ± 5	(3)	83,3 ± 23,3
11 ± 2	(6)	9 ± 1	(3)	81,8 ± 17,4
Blastoconidies suspendues dans H ₂ O pendant 30 min				
180 ± 9	(6)	122 ± 4	(6)	48,4 ± 7,6
137 ± 6	(6)	94 ± 2	(6)	68,6 ± 3,3
Blastoconidies suspendues dans H ₂ O pendant 120 min				
135 ± 5	(6)	132 ± 7	(6)	97,8 ± 6,3
169 ± 17	(6)	106 ± 19	(6)	62,7 ± 12,9
150 ± 7	(6)	135 ± 13	(6)	90,0 ± 9,6

Tableau XXVI. Récupération de blastoconidies déposées sur feuille de titane.

Des expériences similaires ont été réalisées en présence de G/GOD/KI/LPO dans des gouttelettes de H₂O, avec de la lactoperoxydase tantôt solubilisée tantôt pré-adsorbée sur le feuillet de titane. La figure 34 schématise le dispositif expérimental.

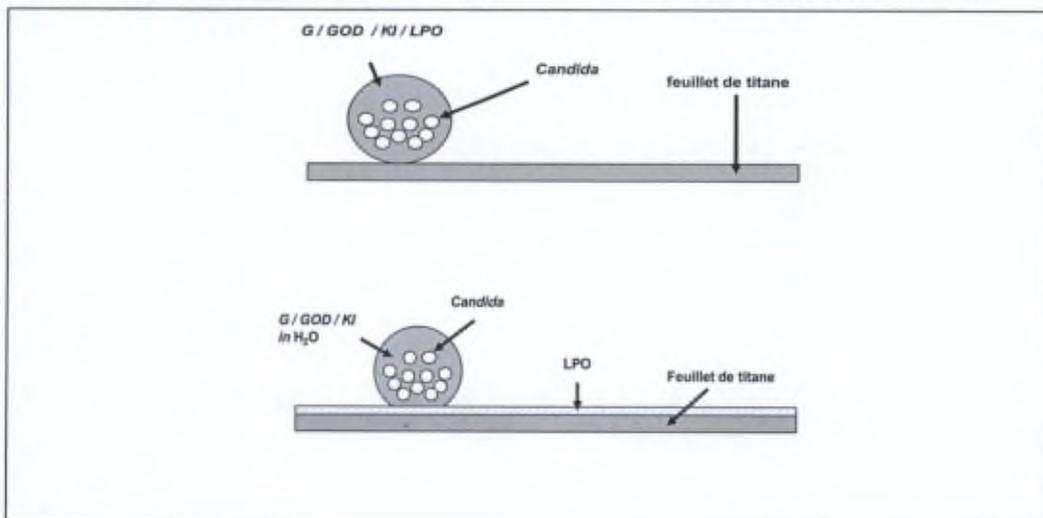


Figure 34. Dispositif expérimental pour tester l'effet des systèmes peroxydasiques dans de petits volumes liquidiens (en haut : LPO solubilisée ; en bas : LPO pré-adsorbée).

La figure 35 résume les différentes conditions expérimentales testées pour analyser l'effet du *precoating* du titane par la LPO sur la récupération des levures après dépôt d'une gouttelette de 20 μ l d'une suspension de 8 blastoconidies par μ l d'eau distillée stérile.

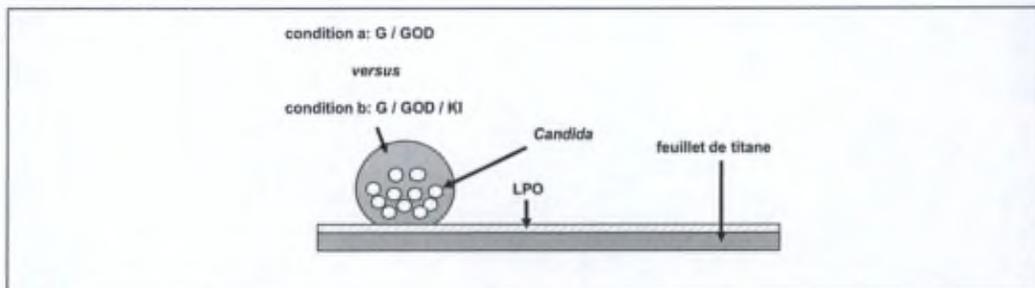


Figure 35. Résumé des conditions expérimentales pour tester l'effet des systèmes peroxydasiques dans de petits volumes liquidiens.

En absence de *precoating*, on observe une récupération de $48,4 \pm 7,6$ % des blastoconidies déposées (122 ± 4 CFU / boîte de Petri). Le *precoating* du titane par la LPO à différentes concentration (Figure 36) ne modifiait pas statistiquement (ANOVA, $p = 0,1897$) la survie de *Candida* : toutes conditions confondues, la récupération est de $57,5 \pm 6,0$ % ($N = 5$). Mais lorsqu'on incorpore G / GOD / KI dans la suspension, aucune levure n'est retrouvée après 30 minutes d'incubation de 20 μ l déposé sur un feuillet de titane *précoaté* avec de la LPO (tableau XXVII). En effet, quand on réassocie tout le système peroxydasique (LPO *coaté* sur le titane et G / GOD / KI dans la suspension), les levures déposées ne survivent pas. Par contre, quand on réassocie G / GOD et LPO (donc sans KI), on récupère 68 ± 6 % de CFU / boîte de Petri.

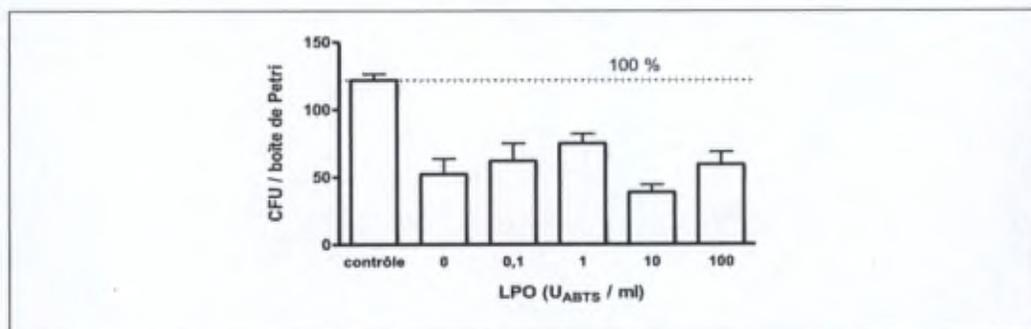


Figure 36. Récupération de *Candida* déposé sur du titane *précoaté* avec des concentrations croissantes de lactoperoxydase (1 mg de LPO correspondait à 96 U_{ABTS}).

suspension	G / GOD / KI / LPO	G / GOD / LPO
186	0	143
206	0	102
152	0	90
195		138
152		123
191		133
180 ± 9 (N = 6)	0 ± 0 (N = 3)	122 ± 9 (N = 6)

Tableau XXVII. Effet d'un système G / GOD (1,3 U/ml) / KI / LPO sur le taux de survie de *Candida*. G / GOD avait été dissout dans la suspension et la LPO coaté sur le titane.

IV. 6. Incorporation d'un système peroxydasique dans un gel oral

L'effet des systèmes peroxydasiques incorporés dans un gel bucco-dentaire fut évalué *in vitro* après étalement du gel sur une surface d'agarose (milieu de Sabouraud) nappée d'une suspension standardisée de *Candida*, pris donc en sandwich.

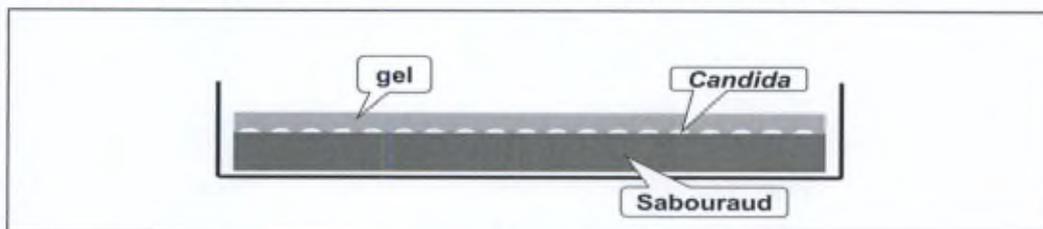


Figure 37. Dispositif expérimental pour l'étude d'un gel peroxydasique sur la croissance de *Candida*.

Croissance de *Candida albicans* en présence d'un gel oral

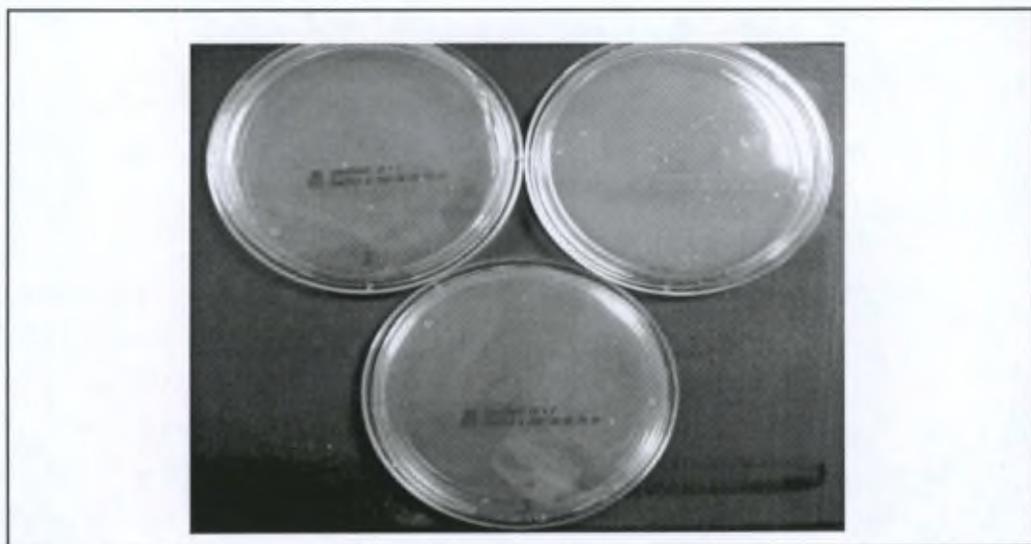
En présence d'un gel sans aucune addition (mis à part l' α -glucose), le comptage de colonies montrait ($115,7 \pm 2,4 \%$; N = 53) du nombre compté en l'absence de gel ($100,0 \pm 1,6 \%$; N = 54). Un test t de Student non pairé a montré que la différence était statistiquement significative ($p < 0.0001$). Après deux jours d'incubation à 37°C , le diamètre moyen des colonies était inférieur lorsque les levures étaient recouvertes du gel contrôle : ($2,6 \pm 0,1 \text{ mm}$; N = 205) ; en l'absence de tout ajout de gel, le diamètre moyen des colonies était de ($4,2 \pm 0,1 \text{ mm}$; N = 189). La différence est statistiquement significative (test t de Student non pairé, $p < 0.0001$).

Effet de G / GOD sur la croissance de *C. albicans*

En présence de gel avec G/GOD (1,3 U/ml)/LPO mais sans substrat de la LPO (donc avec uniquement une production d'H₂O₂), le comptage de colonies (95,5 ± 2,1 % du contrôle; N = 54) n'était pas statistiquement différent (test t de Student non pairé, p = 0,1239) du nombre compté en présence de gel sans addition (100.0 ± 2,0 % ; N = 53). De même, le diamètre moyen des colonies n'était pas statistiquement différent (test t de Student non pairé, p = 0,5488) que les levures soient recouvertes du gel sans addition (2,6 ± 0,1 mm ; N = 205) ou de gel avec G/GOD/LPO (2,5 ± 0,1 mm ; N = 103).

Effet candidacide de l'hypiodite

En présence d'hypiodite produit dans le gel par le système G/GOD(1,3U/ml)/KI/LPO, *Candida albicans* ne croît que peu ou pas: le taux de survie est alors (4,3 ± 1,2 % ; N = 48) du contrôle (test t de Student non pairé, p < 0,0001). L'inhibition de la croissance de la levure est effective au moins pendant 4 semaines (Photographie 22).

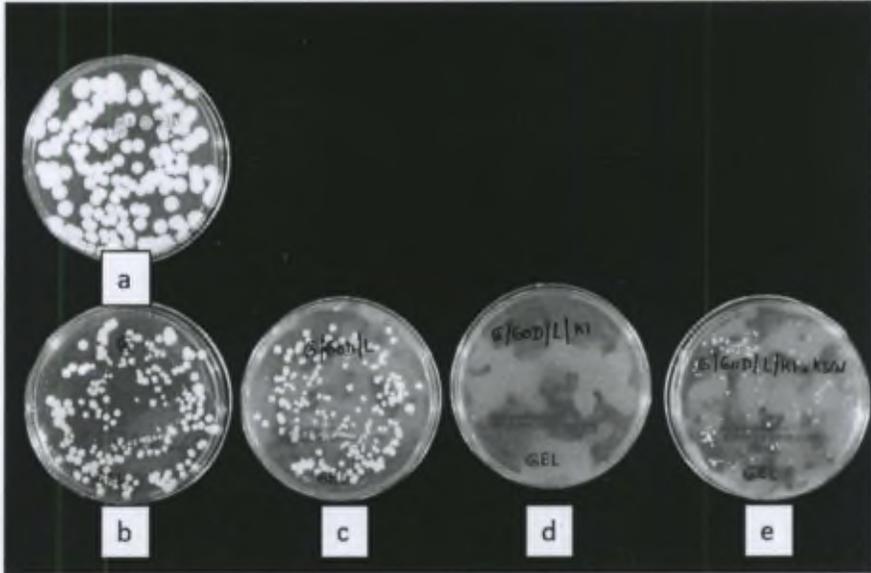


Photographie 22. Trois boîtes de culture de *Candida* en présence de gel contenant un système peroxydase complet (G/GOD_{1,3U/ml}/KI/LPO) produisant de l'hypiodite après 48 h d'incubation à 37° C. Ces boîtes sont restées stériles pendant 4 semaines à température ambiante.

Compétition entre KSCN et KI pour la LPO dans un gel oral

En présence de H_2O_2 , le système lactoperoxydase produit de l'OSCN⁻ et de l'OI⁻ à partir de SCN⁻ et d'I⁻ respectivement. L'OI⁻ présente un effet antifongique sur les levures (*Candida albicans*) à des doses moindres que l'OSCN⁻. Cependant, la concentration salivaire du SCN⁻ est de l'ordre 1000 fois supérieure à celle de l'I⁻ (Tenovuo, 1985). Le substrat naturel des peroxydases dans la salive est donc le thiocyanate : ceci entraîne une production préférentielle d'OSCN⁻ par l'enzyme au détriment de l'OI⁻ qui présente un effet antifongique à une concentration plus faible.

Les composants G / GOD / LPO ont été introduits dans une base de gel oral tantôt avec du thiocyanate ou de l'iodure seuls, tantôt avec un mélange de ces 2 substrats. L'objectif était de documenter l'inhibition par le thiocyanate de l'effet anti-*Candida* de l'hypoiodite dans une préparation galénique, mimant l'utilisation d'un gel appliqué dans la cavité orale. Une expérience se composait de 5 conditions différentes (Photographie 23): a) une condition contrôle sans gel, b) une condition contrôle avec le gel sans addition (à l'exception de glucose), c) un gel enrichi de glucose et d'enzymes (GOD et LPO) mais sans substrat (pseudo)halogénure de la lactoperoxydase (dans ce cas, seul H_2O_2 est produit), d) un gel contenant un système peroxydase complet (G/GOD/KI/LPO) produisant de l'hypoiodite, e) un gel avec le même système peroxydase enrichi de thiocyanate en quantité variable. La 4^{ème} condition avait pour but de montrer l'inhibition de *Candida albicans* par l'hypoiodite tandis que la 5^{ème} condition explorait l'effet du thiocyanate sur cette inhibition. Le coefficient de variation intra-essai des étalements de la suspension de levures sur le milieu de Sabouraud puis recouverts de gel sans addition est de $(9,5 \pm 1,8 \%)$; N = 9 expériences indépendantes avec 6 réplicats).



Photographie 23. Conditions expérimentales pour analyser la compétition de $\text{SCN}^- / \text{I}^-$ vis-à-vis de la peroxydase dans un gel oral. a: contrôle sans gl, b: contrôle avec gel, c: gel de G/GOD/LPO, d: gel de G/GOD / I^- /LPO, e: gel de G/GOD/ I^- / SCN^- /LPO.

Le SCN^- ajouté au système G/GOD/KI/LPO permet la croissance de *Candida albicans*, et ce d'autant plus que sa concentration est élevée. La figure 38 montre la relation entre concentration de SCN^- et taux de survie de *Candida* en présence d'un système G/GOD/KI/LPO pour lequel la concentration du KI était toujours 2 mM. En l'absence de SCN^- , le taux de survie de *Candida albicans* était de $(4,3 \pm 1,2 \%$; $N = 48$; 8 expériences indépendantes). En présence de SCN^- 0,25, 2 et 3 mM, le taux de survie de la levure était de $10,6 \pm 3,0 \%$ ($N = 6$; 1 expérience indépendante), de $35,9 \pm 10,1 \%$ ($N = 6$; 1 expérience indépendante) et de $41,2 \pm 9,1 \%$ ($N = 12$; 2 expériences indépendantes). Une concentration de 4 mM en thiocyanate abolissait totalement l'inhibition du système peroxydase avec l'iodure comme seul substrat : le taux de survie était alors $92,1 \pm 4,7 \%$ ($N = 12$; 2 expériences indépendantes).

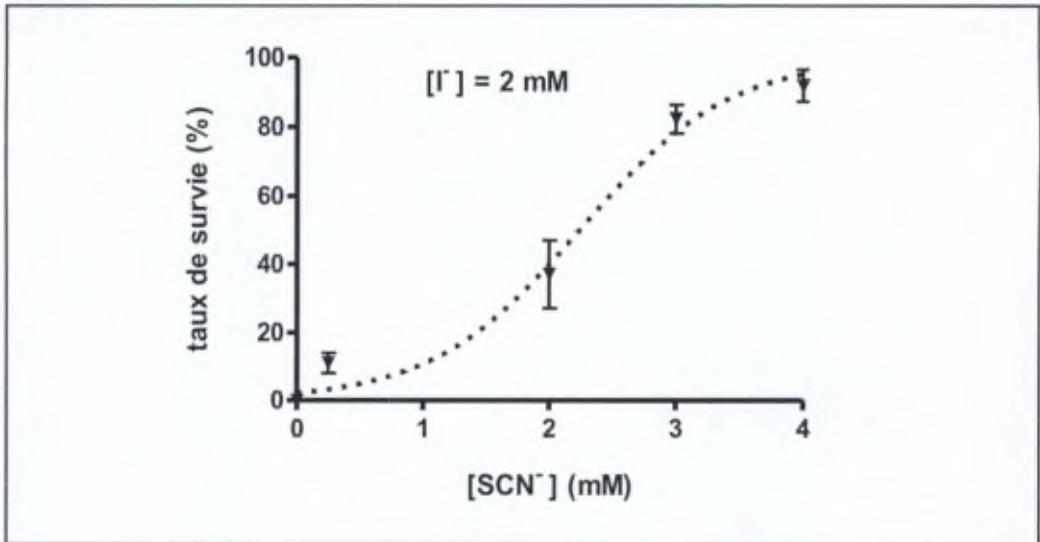


Figure 38. Effet de la compétition entre SCN^- et I^- pour la lactoperoxydase dans le gel oral sur la croissance de *Candida* sur agar Sabouraud.

Les résultats ont été évalués par un test ANOVA complété par un post-test de Bonferroni. Le test ANOVA montre que, au moins, un groupe est statistiquement différent des autres (ANOVA, $P < 0.0001$). Le post-test de Bonferroni permet de déterminer où se situe(nt) la (ou les) différence(s). Ce post-test a montré que presque tous les groupes sont significativement différents l'un par rapport à l'autre et par rapport au comptage en présence de gel sans ingrédient actif (contrôle 100% de survie). Le test n'a pu établir de différence statistique entre le comptage 0 mM KSCN versus 0,25 mM KSCN, entre le comptage 0,25 mM KSCN versus 2 mM KSCN, entre le comptage 2 mM KSCN versus 3 mM KSCN et entre le comptage 4 mM KSCN versus contrôle 100%.

Effet du système peroxydase sur la croissance de *Candida*

Après 36 h d'incubation à 37 ° C, le nombre de colonies comptées en présence de gel avec G/GOD/KSCN/LPO représentait $100,0 \pm 6,6$ % (N = 6) du nombre de CFU compté en présence de gel sans ingrédient actif (CFU = 104 ± 4 ; N=6 ; test t de Student non pairé, $p = 1,0000$). Après 48 h, le comptage de colonies en présence de gel avec G/GOD/KSCN/LPO est de $102,5 \pm 7,3$ % (N = 6), ce qui est toujours non statistiquement différent du contrôle (test t de Student non pairé, $p = 0.8020$). Les comptages à 5 et 7 jours sont similaires aux résultats obtenus à 48h et cela aussi bien

pour le comptage en présence de gel avec G/GOD/KSCN/LPO que pour le comptage en présence de gel sans ingrédient actif. Par contre, après 2 jours d'incubation, le diamètre moyen des colonies était statistiquement inférieur (test t de Student non païré, $p < 0.0001$) quand les levures étaient recouvertes du gel avec G/GOD/KSCN/LPO : ($2,23 \pm 0,04$ mm ; N = 102) *versus* le contrôle sans ingrédient actif ($2,54 \pm 0,04$ mm ; N = 205) traduisant un retard de croissance des colonies. La Figure 39 illustre ces données.

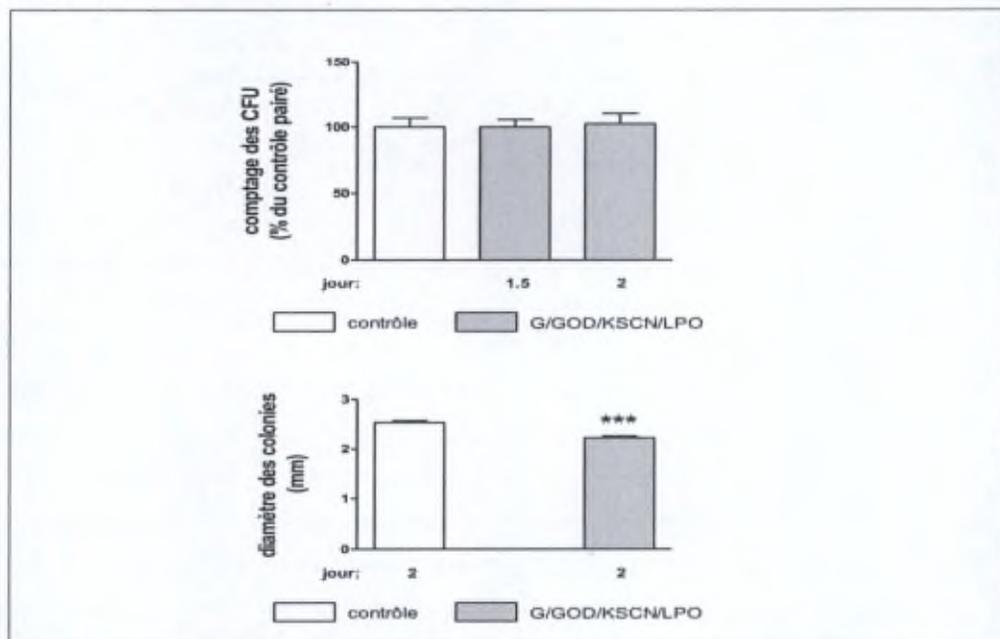


Figure 39. Effet de G/GOD/KSCN/LPO sur la croissance de *Candida* basée sur des comptages de CFU (figure supérieure) et le diamètre des colonies (figure inférieure).

Effet du système peroxydase / lysozyme / lactoferrine / colostrum sur la croissance de *Candida*

Après 36 heures d'incubation à 37° C, le pourcentage de CFU de *Candida albicans* en présence du système peroxydase/ lysozyme/ lactoferrine/ colostrum était de $0,2 \pm 0,2$ % (N = 6) du contrôle avec gel. Après 48 heures, ce nombre augmentait à $81,4 \pm 4,4$ % (N = 6), après 5 jours à $95,2 \pm 4,6$ % (N = 6) et enfin après 1 semaine à $100,0 \pm 4,8$ % (N = 6) du contrôle. D'autre part, le diamètre des colonies, après 2 jours d'incubation, était statistiquement inférieur (test t de Student non païré, $p < 0.0001$) quand les levures étaient recouvertes du gel avec G/GOD/KSCN/LPO/LF/LY/

colostrum : $1,61 \pm 0,04$ mm (N = 64) versus $2,54 \pm 0,04$ mm (N = 205) pour le gel contrôle sans addition. La Figure 40 illustre ces données.

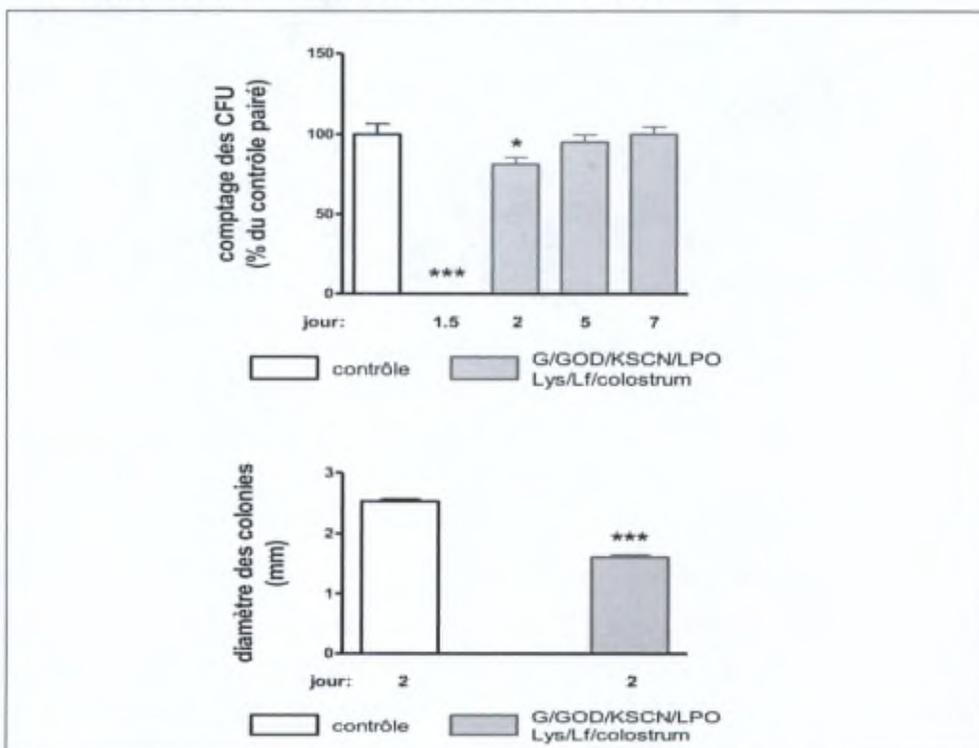
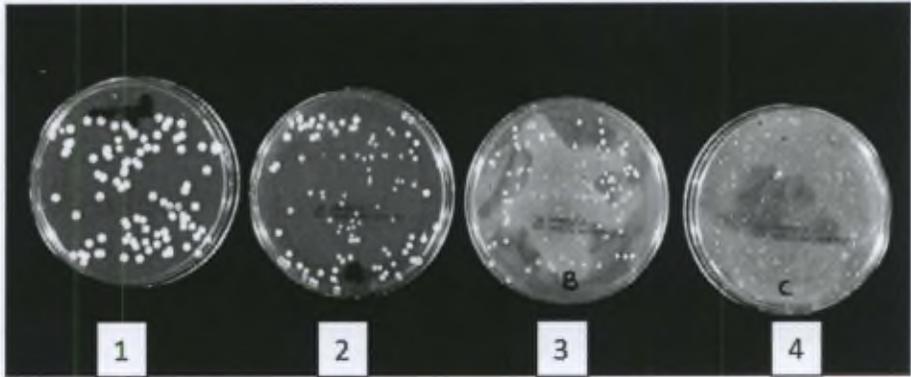


Figure 40. Inhibition de la croissance de *Candida* par G/GOD/SCN/LPO/lys/Lf/colostrum basée sur des comptages de CFU (figure supérieure) et le diamètre des colonies (figure inférieure).

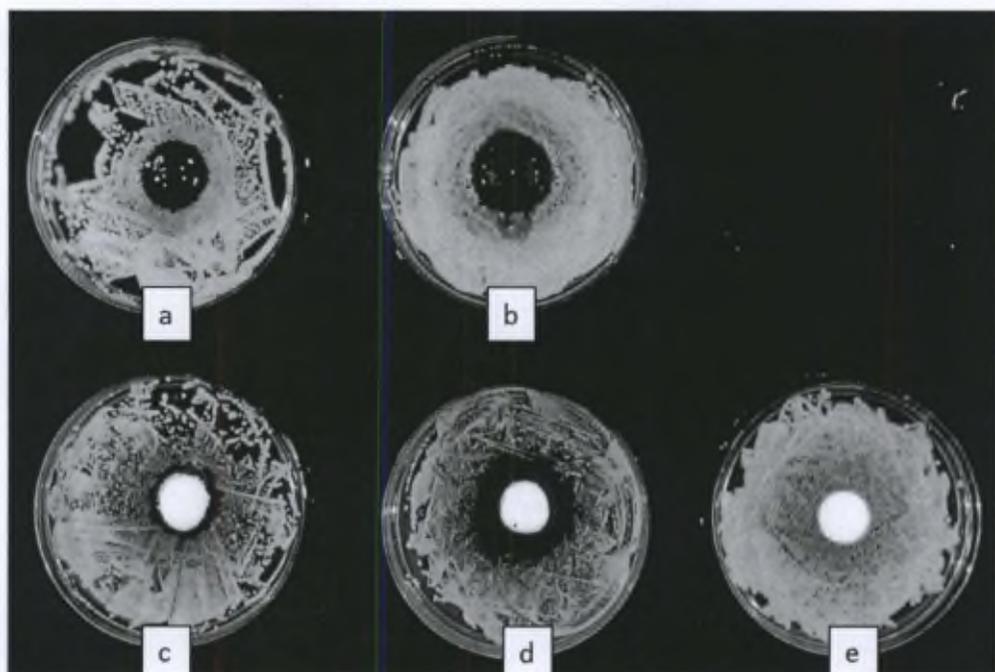
La photographie 24 illustre et confirme les résultats obtenus à 48 heures dans les expériences précédentes. Un gel avec le système peroxydase (G/GOD/SCN/LPO) fut comparé à un autre gel contenant le même système peroxydase enrichi de lysozyme, de lactoferrine et de colostrum bovin. L'expérience unique se composait de 4 conditions différentes (Photographie 24): 1) une condition contrôle sans gel, 2) une condition contrôle avec le gel sans addition (à l'exception de glucose), 3) un gel contenant un système peroxydase complet (G/GOD/KSCN/LPO) produisant de l'hypothiocyanite, 4) un gel avec le même système peroxydase enrichi de lysozyme, de lactoferrine et de colostrum bovin.



Photographie 24. Effet d'un système peroxydase/lysozyme/lactoferrine/colostrum sur la croissance de *Candida* après 48 h d'incubation à 37° C (1 : pas de gel ; 2 : gel sans addition ; 3 : gel avec système peroxydase ; 4 : gel avec système peroxydase/lysozyme/lactoferrine/colostrum).

Etude de gels à la peroxydase proposés dans le commerce

Différents gels proposés par l'industrie cosmétique furent évalués par une méthode de diffusion radiale. La photographie 25 montre l'aspect de 5 boîtes de Petri différentes creusées d'un puits central, nappées de *Candida* et incubées pendant 48 heures à 37° C avec dans le puits central a) gel OralBalance™, b) gel BioXtra™, c) dentifrice Biotène™, d) dentifrice BioXtra™ et e) dentifrice BioXtra™ inactivé par chauffage à 85° C pendant 24 heures. Une zone circulaire sans levure est clairement visible entre le puits central contenant un des produits de soins oraux testés et les colonies blanches confluentes de *Candida*, excepté pour le contrôle obtenu par préchauffage.



Photographie 25. *Candida albicans* ATCC 10231 cultivé sur des boîtes contenant du Sabouraud-Gentamycin-Chloramphenicol à 37° C pendant 48 heures autour d'un puits central rempli de a: gel OralBalance™, b: gel BioXtra™, c: dentifrice Biotène™, d: dentifrice BioXtra™, e: BioXtra™ dentifrice inactivé par chauffage (24 heures à 85° C).

Le rayon moyen de cette zone sans levure est présenté au tableau XXVIII pour chaque produit testé après incubation de 48 heures et d'une semaine à 37° C. Le rayon d'inhibition après une incubation de 48 heures était respectivement de 4.0 ± 0.3 mm (N = 8) et de 2.7 ± 0.1 mm (N = 8) pour le gel OralBalance™ et le dentifrice Biotène™ qui sont présumés contenir les mêmes protéines antimicrobiennes (glucose-oxydase / lactoperoxydase, lysozyme, lactoferrine). Dans le cas du gel et du dentifrice BioXtra™ qui sont supposés contenir les mêmes protéines (glucose-oxydase / lactoperoxydase, lysozyme, lactoferrine plus des facteurs de croissance), le rayon d'inhibition était en moyenne de 7.8 ± 0.2 mm (N = 8) et de 7.4 ± 0.3 mm (N = 8). Le dentifrice Zendium™ (amyloglucosidase, glucose-oxydase / système lactoperoxydase) montre un rayon d'inhibition moyen de 5.4 ± 1.0 mm (N = 6) après 48 heures. Une incubation d'une semaine a montré une recolonisation de la zone débarrassée précédemment de levure (figure 41). A ce moment, une diminution de l'effet d'inhibition a été observée, le rayon d'inhibition était de 1.3 ± 0.3 mm (N = 8) pour le gel Oralbalance™ et de 0.0 ± 0.0 mm

(N = 8) pour le dentifrice Biotène™. Dans le cas du gel et du dentifrice BioXtra, le rayon d'inhibition a aussi décreu mais restait important. Il a été observé respectivement une inhibition de 3.7 ± 0.5 mm (N = 8), de 3.0 ± 0.3 mm (N = 8) pour le gel BioXtra et pour le dentifrice BioXtra. Dans le cas du Zendium, le rayon d'inhibition de 0.1 ± 0.0 mm (N = 6) fut également observé. Une analyse statistique (ANOVA complétée par un post-test Bonferroni de comparaison) des données obtenues après 48 heures a montré une différence significative entre les formulations avec et sans colostrum, mais pas entre les gels et dentifrices préparés avec la même composition antimicrobienne. Il n'y avait pas d'inhibition de la croissance de *Candida* après chauffage des produits à 85° C (pendant 6 heures pour les gels et 24 heures pour les dentifrices) puisque la bordure des levures touchait la limite du puits rempli d'ingrédients inactivés.

	Rayon d'inhibition (mm) autour d'un dépôt central de		
	produit actif		produit inactivé par la chaleur
	48 heures	Une semaine	48 heures
Zendium™ dentifrice	5.4 ± 1.0 (6)	0.1 ± 0.0 (6)	0.0 ± 0.0 (6)
BioXtra™ gel	7.8 ± 0.2 (8)	3.7 ± 0.5 (8)	0.0 ± 0.0 (6)
Oralbalance™ gel	4.0 ± 0.3 (8)	1.3 ± 0.3 (8)	0.0 ± 0.0 (6)
BioXtra™ dentifrice	7.4 ± 0.3 (8)	3.0 ± 0.3 (8)	0.0 ± 0.0 (6)
Biotène™ dentifrice	2.7 ± 0.1 (8)	0.0 ± 0.0 (8)	0.0 ± 0.0 (6)

Tableau XXVIII. Rayon d'inhibition à partir du dépôt (1 g) dans un puits central de produits de soins oraux après une incubation de 48 heures et d'une semaine à 37° C.

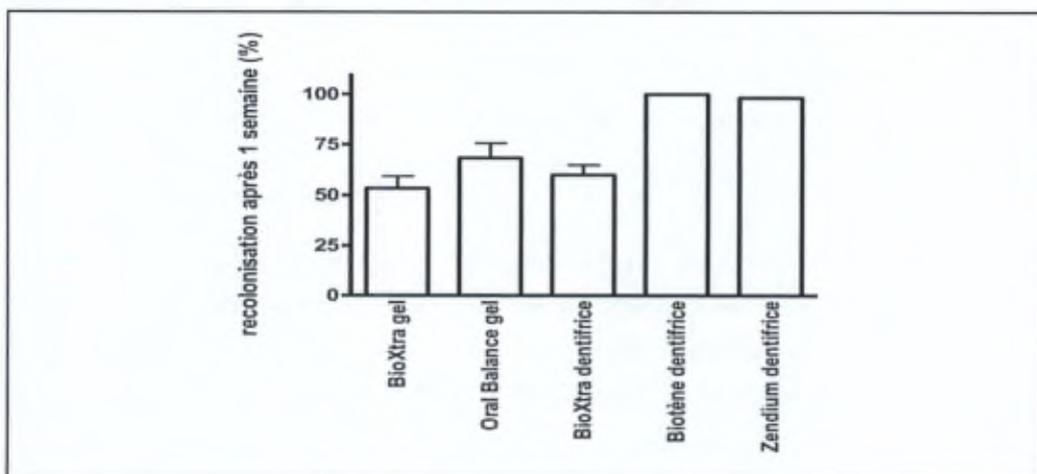


Figure 41. Index (%) de recolonisation par *Candida* une semaine après une inhibition préliminaire par 5 produits de soins oraux différents.

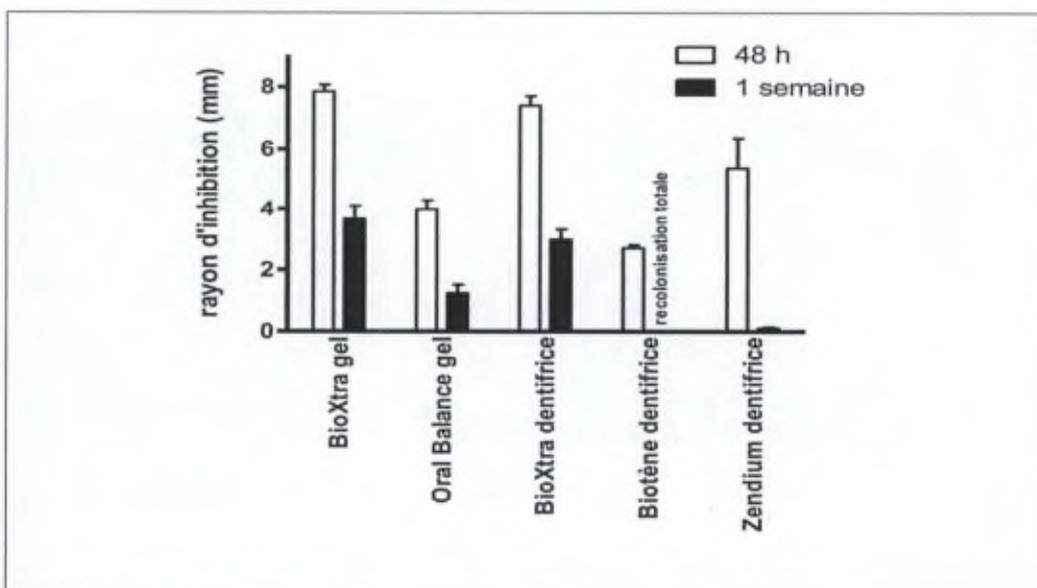
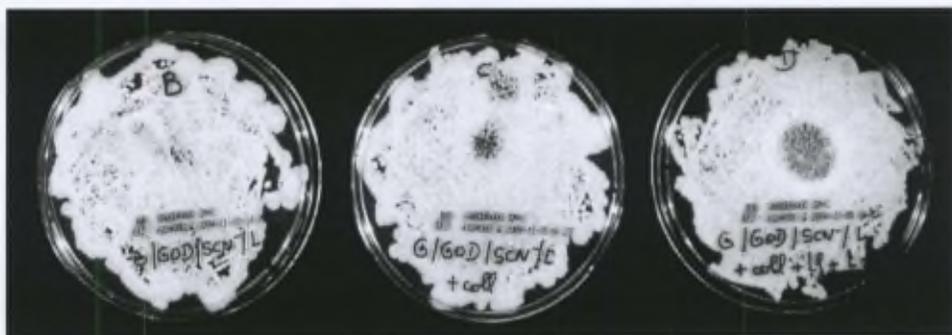


Figure 42. Rayon moyen d'inhibition observé avec 5 produits de soins oraux sur *Candida albicans* dispersé sur des boîtes de Petri après 48 heures et une semaine d'incubation à 37° C.

La Figure 42 compare le pourcentage de la zone inhibée à 48 h qui a été recolonisée par les colonies de *Candida* une semaine plus tard. L'index de recolonisation était respectivement de $68.4 \pm 7.3 \%$ (N = 8) et de $100.0 \pm 0.0 \%$ (N = 8) pour le gel Oralbalance™ et le dentifrice Biotène™. De plus, la recolonisation était déjà

complète après 4 jours pour le dentifrice Biotène™. Dans le cas des produits BioXtra™, l'index de recolonisation était respectivement de $53.4 \pm 5.9 \%$ (N = 8) et de 60.0 ± 4.9 (N = 8) pour le gel BioXtra™ et pour le dentifrice BioXtra™. Pour Zendium™, cet index était de $100.0 \pm 0.0 \%$ (N = 6). Une différence significative (ANOVA complété par un post-test Bonferroni de comparaison, $p < 0.001$) entre BioXtra™ et Biotène™ suggère que le colostrum ralentit la recolonisation de la zone libre de levure préalablement protégée par le système lactoperoxydase (glucose, lactoperoxydase, glucose-oxydase et thiocyanate), lysozyme et lactoferrine. Les préparations de gel correspondantes ont montré la même tendance mais sans atteindre la signification statistique (t-test, $p = 0.06$). L'évolution sur une semaine de l'inhibition par Zendium™ était comparable à Biotène™ (test t non pairé, NS). La Photographie 26 montre 3 boîtes de Petri (milieu de Sabouraud) nappée de *Candida* à la surface desquelles fut déposée une gouttelette de 50 μ L d'une solution en B : H₂O, en C : G / GOD / KSCN / LPO et en D : G / GOD / KSCN / LPO / lysozyme (10 mg / ml) / lactoferrine (10 mg / ml) et colostrum (10 mg / ml).



Photographie 26. Effet d'une goutte de 50 μ l déposée sur une agarose nappée de *Candida*, et contenant : à gauche) système peroxydase, au centre) système peroxydase avec colostrum, à droite) système peroxydase, lactoferrine, lysozyme et colostrum.

IV. 7. Investigations cliniques

Présence de peroxydase adsorbée à des piliers de cicatrisation

exposés à l'environnement oral

Les activités peroxydasiques adsorbées ont été mesurées sur 18 piliers de cicatrisation en titane récupérés après 2 semaines passées dans l'environnement oral sans prothèse (chez des patients par ailleurs totalement édentés): les peroxydases adsorbées étaient comprises entre 0.24 et 6.96 nU_{ABTS} / mm² (Figure 43). Les données disponibles ne permettent qu'une comparaison entre les sextants antérosupérieur (sextant II) et antéroinférieur (sextant V). Il existe une différence significative entre ces 2 sextants antérieurs: $1,44 \pm 0,36$ (N=6) *versus* $4,68 \pm 0,96$ nU_{ABTS} / mm² (N=5) pour la région supérieure et inférieure respectivement (test t, p = 0.007). Un pilier de cicatrisation supplémentaire fut récupéré dans la région centrale supérieure (sextant II) chez un quatrième patient : ce pilier a montré une quantité de peroxydase adsorbée particulièrement faible: 0.12 nU_{ABTS} / mm². Ce patient portait une prothèse amovible séparant le pilier de cicatrisation de l'environnement salivaire, minimisant donc le contact avec les peroxydases orales.

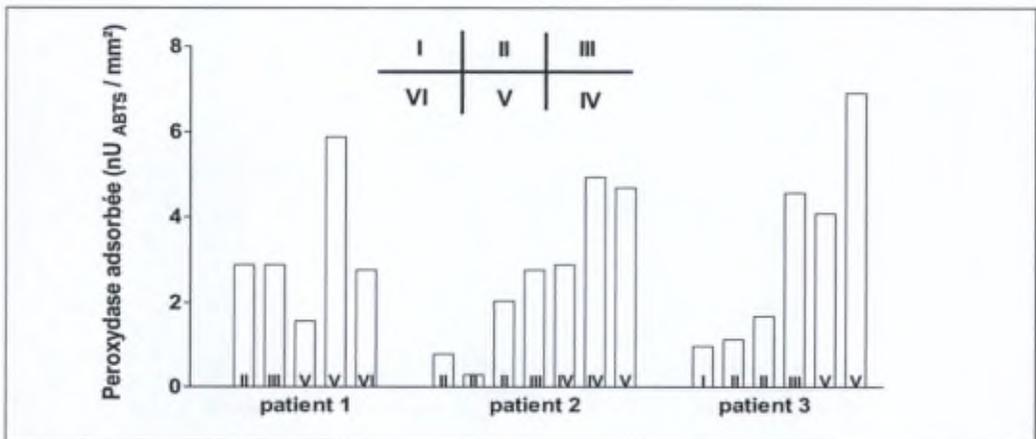


Figure 43. Peroxydase adsorbée sur des piliers de cicatrisation après 2 semaines dans la cavité orale. Chaque barre représente la peroxydase adsorbée sur un pilier de cicatrisation en titane. Le numéro à la base de chaque barre représente la localisation par sextant de l'implant correspondant.

Contamination des prothèses amovibles par *C. albicans*

L'écouvillonnage des prothèses amovibles supérieures de 155 patients a permis de mettre en évidence une contamination par des levures de type *Candida sp.* dans 76,8 % des cas (109 femmes et 46 hommes âgés de 42 à 96 ans). Par comparaison, l'écouvillonnage du palais de 43 étudiants (26 femmes et 17 hommes âgés de 20 à 30 ans) en bonne santé et non porteurs d'aucun type de prothèse a montré la présence des souches de *Candida sp.* dans 25,6 % des cas (test Chi-carré hautement significatif : $p < 0,0001$). Le comptage des étudiants était toujours inférieur à 24 CFU par écouvillonnage.

Parmi les 155 patients, des investigations supplémentaires ont été menées sur différents groupes. Ainsi, la muqueuse palatine en contact avec la prothèse amovible fut également écouvillonnée dans un premier groupe. Dans cette série (N = 135), *Candida sp.* a été retrouvé sur la prothèse chez 101 patients soit 74,8 %. La colonisation du dentier était le plus souvent associée à la contamination de la muqueuse palatine : d'une part, 32 sur 34 personnes sans levures isolées sur le dentier étaient aussi exemptes de *Candida* sur le palais, et d'autre part, 96 sur 101 personnes présentaient à la fois une muqueuse palatine contaminée et une prothèse colonisée par *Candida sp.* (Tableau XXIX). Une colonisation simultanée du dentier et de la muqueuse était donc rencontrée chez 71,1 % des patients investigués : cette association est significative (test exact de Fisher ou Chi-carré : $p < 0,0001$; risque relatif : 16,16 ; odds ratio : 307,2).

		palais		total
		+	-	
prothèse	+	96 (A)	5 (B)	101
	-	2(C)	32 (D)	34
total		98	37	135

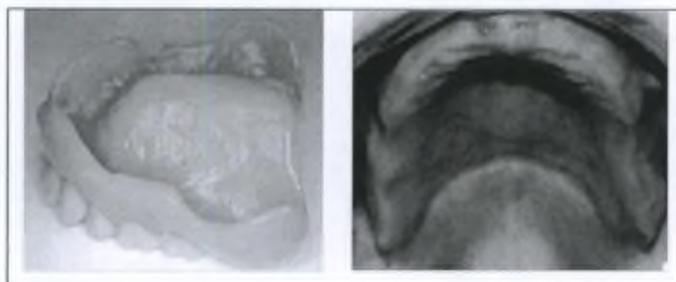
Chi-carré *** ($p < 0,0001$) : test exact de Fisher **** ($p < 0,0001$)

risque relatif : $A/(A+B) / C/(C+D) = 16,16$ (1 en absence d'association)

Odds ratio : $A/B / C/D = 307,2$ (1 en absence d'association)

Tableau XXIX. Fréquence de *Candida* isolées chez des porteurs de prothèses (N = 135).

Un second groupe de 23 porteurs de prothèse complète supérieure (16 femmes et 7 hommes âgés de 48 à 87 et de 42 à 78 ans respectivement) ont été soumis, en plus d'un écouvillonnage séparé de l'intrados de la prothèse et de la muqueuse palatine, à un écouvillonnage de la muqueuse vestibulaire au contact de la prothèse, à une mesure du flux salivaire et à une identification des espèces des souches de *Candida* isolées. Ces patients ne présentaient aucun signe clinique de stomatite prothétique (douleur ou érythème muqueux illustré par la photographie 27).



Photographie 27. Prothèse complète à gauche et érythème de la muqueuse palatine qui dessine le pourtour de la prothèse.

Dans un autre groupe de 35 patients dont le frottis de l'intrados des prothèses ramenait plus de 50 et moins de 1000 CFU, le nombre de CFU compté après écouvillonnage du palais représentait moins de 4,8 % de ceux trouvés après écouvillonnage de l'intrados (Photographie 28).



Photographie 28. Ecouvillonnages de l'intrados d'une prothèse supérieure (2i), des muqueuses palatine (2p) et vestibulaire (2v) correspondantes (milieu Sabouraud).

Après enlèvement de la prothèse, le flux salivaire était évalué avec un rouleau de coton (Salivette™, Starstedt, Germany) laissé en bouche pendant exactement 1 minute sans mouvement masticatoire. Une pesée du coton avant le test et une seconde pesée après la collection de la salive permettait d'évaluer la quantité de salive produite (en assumant que 1 g de salive correspond à 1 ml). Lorsqu'on répartit les patients investigués en 2 groupes selon leur flux salivaire (inférieur ou supérieur à 1 ml / min), le risque que *Candida* soit présent est statistiquement (χ^2 : P = 0,0220 pour l'intrados et la muqueuse palatine et p = 0,0259 pour la muqueuse vestibulaire) plus élevé lorsque le flux salivaire est inférieur à 1 ml / min (Tableau XXX).

<i>intrados</i>	culture positive	culture négative
flux salivaire < 1 ml/min	12 (A)	1 (B)
flux salivaire > 1 ml/min	5 (C)	5 (D)

Chi-carré : * (p = 0.0220, N = 23); test exact de Fisher : * (p = 0.051, N = 23)

risque relatif : A/(A+B) / C/(C+D) = 1,846 (1 en absence d'association)

Odds ratio : A/B / C/D = 12,0 (1 en absence d'association)

<i>muqueuse palatine</i>	culture positive	culture négative
flux salivaire < 1 ml/min	12 (A)	1 (B)
flux salivaire > 1 ml/min	5 (C)	5 (D)

Chi-carré : * (p = 0.0220, N = 23); test exact de Fisher : * (p = 0.0510, N = 23)

risque relatif : A/(A+B) / C/(C+D) = 1,846 (1 en absence d'association)

Odds ratio : A/B / C/D = 12,0 (1 en absence d'association)

<i>muqueuse vestibulaire</i>	culture positive	culture négative
flux salivaire < 1 ml/min	11 (A)	2 (B)
flux salivaire > 1 ml/min	4 (C)	6 (D)

Chi-carré : * (p = 0.0259, N = 23); test exact de Fisher : * (p = 0.0393, N = 23).

risque relatif : A/(A+B) / C/(C+D) = 2,115 (1 en absence d'association)

Odds ratio : A/B / C/D = 8,25 (1 en absence d'association)

Tableau XXX. Relation entre le portage de *Candida sp.* et le flux salivaire au repos.

Les souches sauvages cultivables de *Candida sp.* furent identifiées sur milieu Chromagar (Tableau XXXI) à partir de la morphologie macroscopique des colonies et à partir de tests additionnels (test de germination dans du sérum humain, formation de chlamydoconidies sur milieu RAT, système d'identification sur galeries API™).

	% des patients	% des échantillons
culture positive	80.8	100.0
<i>Candida albicans</i>	71.4	88.3
<i>Candida glabrata</i>	9.5	11.7
<i>Candida tropicalis</i>	4.8	5.9
<i>Candida albicans et glabrata</i>	4.8	5.9
culture négative	19.2	

Tableau XXXI. Fréquence des différentes espèces de *Candida* isolées des prothèses (N = 26).

Effet clinique d'un gel enrichi en système peroxydasique

Une étude clinique préliminaire (phase I) fut réalisée chez un troisième groupe pour évaluer le pouvoir anti-*Candida* d'une préparation galénique contenant des facteurs salivaires anti-microbiens et un système peroxydase. De ces 26 personnes porteuses d'une prothèse amovible complète testées quant à la présence ou non de *Candida sp.*, 20 étaient positives et 16 ont accepté d'être enrôlés dans cette étude. Durant 15 jours, quotidiennement, un gel a été appliqué par l'opérateur, en double aveugle, sur l'intrados de leur prothèse. Il s'agissait soit d'un gel actif contenant tout le système G / GOD / KSCN/ LPO / lysozyme / lactoferine /colostrum soit du même gel inactivé par chauffage. Des 16 personnes enrôlées, 14 ont terminé l'étude. Aucun effet indésirable ne fut observé. Il n'y a pas eu de diminution de la charge de *Candida sp.* sur l'intrados des prothèses dans les 2 groupes concernés (Tableau XXXII). Cependant, le groupe avec gel actif a montré une diminution de la colonisation de la muqueuse d'au moins 1 unité logarithmique chez 4 patients sur 7 (Chi-square test, $p = 0.018$).

	total	gel actif	gel contrôle
nombre de patients testés	26		
nombre de patients <i>Candida sp.</i> +	20		
nombre de patients enrôlés	16	9	7
nombre de patients ayant terminé	14	7	7
abandon	2	2	0
effets indésirables	0	0	0
diminution de <i>Candida sp.</i> sur la prothèse		0	0
diminution de <i>Candida sp.</i> sur la muqueuse		4	0

Tableau XXXII. Suivi de l'étude clinique comparant le système complet (thiocyanate, lysozyme, lactoferrine, colostrum) versus placebo (même composition mais inactivé par chauffage).

Décontamination ex vivo par un système peroxydasique à l'iode

Après avoir été écouvillonnées, 10 prothèses ont été plongées pendant 30 minutes dans des bains (à température ambiante) contenant soit G (800 mg / 100 ml) / GOD (1,3 U / ml) (N = 5) produisant H₂O₂ soit le système entier (N = 5) G (800 mg / 100 ml) / GOD (1,3 U / ml) / KI (20 mg / 100 ml) / LPO (96 U_{ABTS} / 100 ml) puis re-écouvillonnées (Photographie 29 et Tableau XXXIII).

	G/GOD	G/GOD/KI/LPO
réduction	1 (A)	2 (B)
pas de réduction	4 (C)	3 (D)
total	5	5



Chi-carré : (p = 0.4762, N = 10); test exact de Fisher : (p = 1, N = 10).

risque relatif : A/(A+B) / C/(C+D) = 0,5333 (1 en absence d'association)

Odds ratio : A/B / C/D = 0,3750 (1 en absence d'association)

Photographie 29 et Tableau XXXIII. Décontamination ex vivo de prothèses avec G/GOD versus G/GOD/KI/L.

Les comptages ont montré une diminution d'au moins 1 unité logarithmique dans 1 cas sur 5 après immersion dans G / GOD et dans 2 cas sur 5 dans G / GOD / KI / LPO. Un test Chi-carré ($p = 0,4762$) ne montrait aucune différence significative entre ces groupes.

La température insuffisante (température ambiante : 22° C) lors de la décontamination et l'activité catalase des levures *Candida* pouvaient expliquer l'échec de la décontamination *ex vivo* des dentiers. Une dernière investigation *in vitro* a permis de préciser l'effet de différentes conditions expérimentales de température et d'activité en GOD lors de l'exposition au système hypiodite de morceaux de résine (5 mm x 25 mm) recouverts d'un biofilm à *Candida* de 2 jours (figure 44).

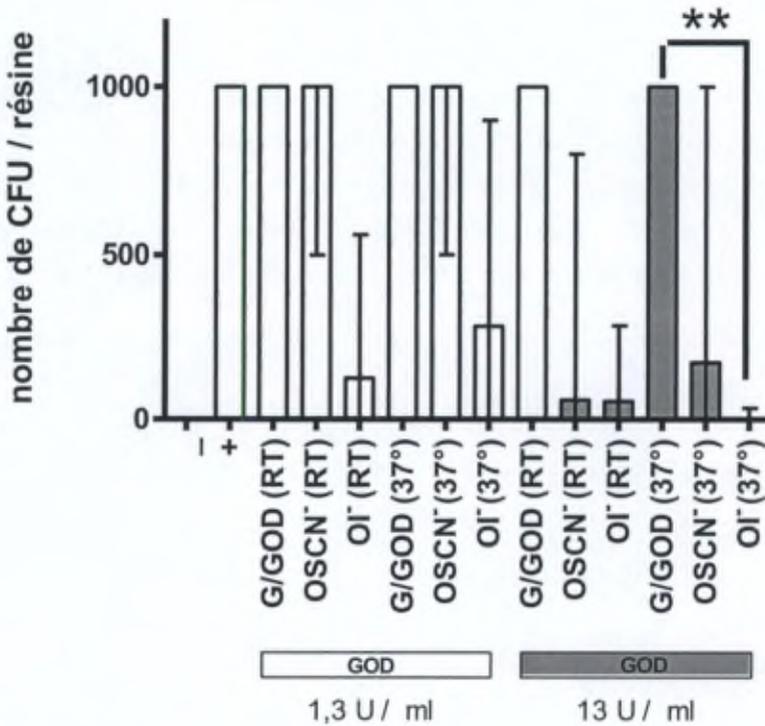


Figure 44. Efficacité de 2 concentrations de GOD sur la colonisation de feuillets de résine à température ambiante et à 37° C. La hauteur des colonnes correspond aux valeurs médianes, les barres aux limites inférieures et supérieures. Les comptages supérieurs à 1000 ont été arrondis à 1000 CFU. Test statistique : test de Kruskal-Wallis complété par un post-test de Dunns (** = $p < 0,01$).

La Figure 44 compare l'effet candidacide du peroxyde d'hydrogène, de l'hypothiocyanite et de l'hypoiodite produits enzymatiquement à 37° C *versus* température ambiante pour 2 quantités différentes de GOD. Seul l'hypoiodite produit par un système peroxydase à 37° C contenant 13 U de GOD par ml réduisait le nombre de *Candida* de 2 unités logarithmiques au moins (Test de Kruskal-Wallis complété par un post-test de Dunns : $p < 0.01$).

Les informations rapportées à la Figure 44 ont été confirmées par un essai clinique *ex vivo* visant à décontaminer des prothèses par incubation à 37° C dans une solution contenant un système iodure / peroxydase et une quantité de GOD plus importante (13 U / ml) . Après avoir été écouvillonnées, 6 prothèses ont été plongées pendant 30 min dans des bains à 37° C contenant d'abord de l'H₂O en guise de contrôle, et ensuite (lors d'une autre consultation) dans une solution contenant G (800 mg / 100 ml) / GOD (13 U / ml) / KI (20 mg / 100 ml)/ LPO (96 U_{ABTS} / 100 ml). Les intrados des prothèses furent re-écouvillonnés après incubation. Les comptages ont montré une diminution d'au moins 1 unité logarithmique dans 6 cas sur 6 après immersion dans la solution peroxydasique tandis que l'incubation dans l'eau n'entraînait aucune modification significative. Un test Chi-carré ($p = 0,0005$) confirmait une différence très significative entre ces 2 procédures (Photographie 30 et Tableau XXXIV).

	H ₂ O	G/GOD/KI/LPO
réduction	0 (A)	6 (B)
pas de réduction	6 (C)	0 (D)
total	6	6



Chi-carré : ($p = 0,0005$, $N = 6$); test exact de Fisher : ($p = 0,0022$, $N = 6$).

Odds ratio : $A/B / C/D = 169$ (1 en absence d'association, calculé en ajoutant 0,5 à chaque valeur)

Photographie 30 et Tableau XXXIV. Décontamination *ex vivo* de prothèses avec G/GOD/KI/LPO *versus* H₂O : dispositif expérimental.

V. Discussion

V. 1. Le système peroxydase dans la cavité orale

Un mécanisme antimicrobien naturel

Les peroxydases animales, en présence de peroxyde d'hydrogène, catalysent l'oxydation d'halogénures – chlorure (Cl^-), iodure (I^-) et, bromure (Br^-) ou du thiocyanate (SCN^-) en oxydants particulièrement toxiques: hypochlorite (OCl^-), hypoiodite (OI^-), hypobromite (OBr^-) et hypothiocyanite (OSCN^-). Dans la cavité orale, deux types de peroxydases sont présentes (Thomas et al, 1994): la sialoperoxydase ou peroxydase salivaire provenant des sécrétions salivaires et la myéloperoxydase libérée par les neutrophiles qui pénètrent dans la cavité orale par les sillons gingivo-dentaires. Le substrat préférentiel de ces peroxydases dans la cavité orale est le thiocyanate sécrété par les glandes salivaires surtout séreuses. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) oral a trois origines : 1°) les sécrétions salivaires (la présence d'hypothiocyanite a été démontrée dans la salive parotidienne pure, ce qui implique une sécrétion de H_2O_2), 2°) les neutrophiles (chez un individu en bonne santé bucco-dentaire, chaque minute, 10^6 neutrophiles pénètrent les sillons gingivo-dentaires) et 3°) une partie de la microflore orale (essentiellement, les streptocoques produisent du H_2O_2 en présence de glucose grâce à des activités NADH-oxydases). Le peroxyde d'hydrogène, seul, est toxique pour les cellules et les micro-organismes surtout lorsqu'ils sont dépourvus de catalase. Dans les cellules mammaliennes, son danger réside dans la possibilité de générer des radicaux libres en présence de superoxydes et de cations divalents.

Ainsi, il existe dans la cavité orale une activation du système peroxydase salivaire suite à l'augmentation du H_2O_2 produit par la microflore orale. Cela étant, la cavité orale est détoxifiée de ce H_2O_2 et un équilibre dynamique est atteint.

Les systèmes peroxydasiques

On appelle « système peroxydasique » ou « système peroxydase » une formulation galénique composée d'une peroxydase et de ses 2 substrats : un (pseudo)-halogénure et du peroxyde d'hydrogène. On appelle pseudohalogène un composé inorganique dont le comportement chimique est similaire à celui d'un halogène : cette appellation est

particulièrement réservée au thiocyanate que certaines peroxydases peuvent oxyder en hypothiocyanite.

L'association d'une peroxydase avec un de ses substrats (pseudo)-halogènes est aisée à formuler. Par contre, la difficulté réside dans l'addition de H_2O_2 dans la mesure où celle-ci déclenche immédiatement l'oxydation du premier substrat. En illustration de ce phénomène, il est utile de rappeler que la salive produit *in vivo* de l'hypothiocyanite alors qu'on ne peut y mettre en évidence l' H_2O_2 . L'activité des peroxydases dépend donc du H_2O_2 disponible, il est nécessaire d'ajouter ce substrat dans les formulations ou mieux d'incorporer une séquence enzymatique qui le produit. La glucose-oxydase est une enzyme facilement et abondamment purifiée à partir d'une moisissure, *Aspergillus niger* par exemple. Cette enzyme produit du peroxyde d'hydrogène à partir du β -glucose et de l'oxygène présents dans le milieu réactionnel (au laboratoire) ou dans l'environnement où l'on veut activer le système peroxydase (dans la cavité orale). Il est possible de contrôler l'un ou l'autre des 2 substrats pour déclencher l'activité enzymatique qui produira l' H_2O_2 déclenchant l'activité peroxydasique. La préparation galénique contenant le système glucose-oxydase / peroxydase peut rester en milieu anaérobie jusqu'à utilisation : on peut alors déclencher le système par oxygénation. Ou bien, on peut utiliser l'anomère α du glucose et préparer les réactifs à 4° C (à cette température, la transformation spontanée en β -glucose est très lente : $t_{1/2}$: de l'ordre de 30 heures) : il suffit de porter la préparation à 37° C pour atteindre en une demi-heure l'équilibre anomérique (à cette température, le temps de demi-anomérisation est de l'ordre de 10 minutes) et pouvoir déclencher ainsi l'activité peroxydase.

L'utilisation du système peroxydasique seul ou en combinaison avec du lysozyme, de la lactoferrine et du colostrum pour créer un effet synergique a été documentée (Tenovuo, 2002): ces produits d'hygiène s'avèrent être une voie de recherche intéressante notamment en tant que substitut salivaire chez les patients souffrant d'hyposalivation. A ce jour, la production d' $OSCN^-$ par le système G / GOD / SCN^- / lactoperoxydase incorporé dans des produits d'hygiène bucco-dentaire a été validée dans la cavité orale (Lenander-Lumikari *et al*, 1993); par contre, les effets antimicrobiens *in vivo* chez des patients souffrant d'hyposialie ne sont pas encore documentés par des études cliniques, Il n'y a pas d'effets toxiques rapportés : ces

produits se rapprochent très fort de la composition de la salive naturelle (Tenovuo, 2002).

Toxicité de l'iodure de potassium

L'iodure de potassium peut être administré directement après (ou avant) une exposition à l'iode radioactif pour protéger la glande thyroïde et diminuer le risque de cancérisation de ce tissu; l'OMS (World Health Organization, 1999) recommande, dans ce cas, une dose journalière de 130 mg pendant la période à risque pour un individu de plus de 12 ans. Les effets secondaires d'une dose unique de 15 à 150 mg d'iodure de potassium sont rares. Dans un groupe de 10,5 millions d'enfants traités suite à la catastrophe de Chernobyl, des éruptions cutanées furent observées chez ~ 1 % d'entre eux et des troubles gastro-intestinaux mineurs (attribués au goût amer du KI) chez ~ 2 % (Food and Drug Administration, 2001). Dans un groupe de ~ 7 millions d'adultes polonais traités lors du même accident, on recensa ~ 1 % d'éruptions cutanées bénignes et une réaction allergique chez 2 patients ayant une sensibilité connue à l'iode. L'iodure de potassium a été proposé pour le traitement de mycoses avant la découverte de la nystatine et des antifongiques de la famille des azoles (Graybill & Sharkey, 1990). Il a été aussi proposé pour le traitement de troubles cutanés telles que les dermatoses erythémateuses (Horio *et al*, 1981).

L'empoisonnement chronique (iodisme) (Pecquet, 2003) peut causer irritation gastrique, diarrhée, goût métallique, sensation de brûlure dans la bouche et la gorge, douleurs dentaires et gingivales, sialorrhée, coryza, éternuements et irritation des yeux avec œdème des paupières, lésions cutanées (Alpay & Kurkcuoglu, 1996). Des effets secondaires sur la thyroïde ont aussi été décrits, surtout chez les adultes de plus de 40 ans. L'iodure de potassium à haute dose aggrave les hyperkaliémies pouvant être à l'origine d'arythmies cardiaques surtout chez les patients souffrant de maladies rénales ou traités par des diurétiques. L'arrêt du médicament entraîne la disparition de ces troubles. Deux articles isolés (Takegawa *et al*, 1998 ; Vorhees *et al*, 1984) rapportent une toxicité à forte dose chez le rat.

Toxicité de l'hypoiodite

Deux études toxicologiques (Duan *et al*, 1999 ; Ihalin *et al*, 2003) considèrent les dangers potentiels d'un système iodure/peroxydase (peroxydase du raifort ou horse radish peroxidase) incorporé dans des solutions désinfectantes. La première étude (Duan *et al*, 1999) envisage l'I₂ formé dans une solution acide et la seconde (Ihalin *et al*, 2003) l'acide hypoiodéux (HOI) formé dans des solutions à pH neutre.

La première référence (Duan *et al*, 1999) concluait à une faible toxicité voire à l'absence de toxicité de l'I₂, la seconde (Ihalin *et al*, 2003) se focalisait sur la toxicité de l'hypoiodite (OI⁻) sur des kératinocytes et des fibroblastes en culture. Dans ce cas, les concentrations non toxiques les plus élevées testées étaient 50 µg/ml de *horse radish peroxidase* avec de l'iodure de potassium 500 µM et du peroxyde d'hydrogène 500 µM tandis que les concentrations toxiques les plus faibles étaient 2,5 mM aussi bien pour l'iodure de potassium que pour le peroxyde d'hydrogène ; aucune concentration intermédiaire n'ayant été testée. Lorsque l'iodure est remplacé par du thiocyanate, il a été montré que des fibroblastes en culture sont protégés de la toxicité du peroxyde d'hydrogène (Tenovuo & Larjava, 1984).

Les concentrations nécessaires en iodure de potassium pour obtenir un effet fongicide oral correspondent à un apport de 150 µg d'iodure par ml de gel (115 µg d'iodure par g de gel). Les besoins journaliers définis par l'OMS (de l'ordre de 200 µg / jour) équivalent à environ 2 g de gel. Il faut noter l'absence de toxicité décrite pour l'iodure de potassium administré per os, à fortiori pour des apports de l'ordre des besoins journaliers en iode. La consommation de produits alimentaires iodés est faible dans nos régions.

Applications en dentisterie

La lactoperoxydase a pu être incorporée notamment dans des dentifrices, gels et liquides de rinçage bucco-dentaires. L'incorporation de protéines antimicrobiennes telles que celle-ci ainsi que du lysozyme et de la lactoferrine dans des produits d'hygiène bucco-dentaire sont des tentatives d'améliorer voire restaurer la capacité antimicrobienne de la salive (Tenovuo, 2002 ; Lenander-Lumikari *et al*, 1993).

Des systèmes contenant de l'amyloglucosidase (pour produire du glucose à partir du maltose libéré par l' α -amylase salivaire) et de la glucose-oxydase ont également réduit l'accumulation de plaque dentaire (Koch *et al*, 1973). Comme écrit précédemment (page 108), les études cliniques font défaut. La principale limitation au

développement de ces études, est la difficulté d'apprécier les modifications d'un microbiote complexe. De nouvelles techniques pourront palier à cette complexité : l'analyse rapide de spectres protéiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*) à partir de bactéries cultivées ou par des puces ADN « *microarray* » (notamment le projet *Human Oral Microbe Identification Microarray* ou HOMIM) à partir d'un simple prélèvement sans culture préalable. Ces techniques pourront non seulement énumérer les espèces composant les microbiotes avant et après application d'un produit d'hygiène, mais aussi d'en apprécier leur abondance relative.

Adhérence de la lactoperoxydase à des biomatériaux

Différentes protéines sont connues pour adhérer aux biomatériaux, comme l'albumine (Steinberg *et al*, 1995 ; Kohavi *et al*, 1997), l'amylase (Kohavi *et al*, 1997), la collagénase (Kane *et al*, 1994), le fibrinogène (Waalivara *et al*, 1994), les glycoaminoglycane (Collis & Embery, 1992).

Après nettoyage professionnel, des protéines salivaires, parmi lesquelles les peroxydases, forment immédiatement une « pellicule exogène acquise » à la surface de l'émail dentaire. La moitié des peroxydases orales est adsorbée à la surface dentaire (Thomas *et al*, 1994). Les peroxydases orales, en présence de thiocyanate, métabolisent le peroxyde d'hydrogène produit essentiellement par les bactéries aérobies. En absence d'une hygiène rigoureuse, les peroxydases adsorbées à la surface dentaire sont recouvertes d'une plaque dentaire épaisse où s'installe une anaérobiose empêchant les bactéries les plus profondément ancrées de produire du peroxyde d'hydrogène.

Dans nos travaux, l'adsorption de la lactoperoxydase sur des feuillets de titane a été mise en évidence par une méthode enzymatique après immersion de ceux-ci pendant 30 minutes dans des solutions de lactoperoxydase. La lactoperoxydase adhérant également aux surfaces en verre des tubes à essai, une série de lavages suivie du transfert de ces feuillets d'un tube à l'autre ont permis de mettre spécifiquement en évidence la lactoperoxydase adhérente au feuillet de titane. La standardisation difficile de ces lavages et le phénomène de désorption expliquent une mauvaise précision d'un jour à l'autre avec un coefficient de variation proche de 37% (N = 30). Les résultats obtenus pour différentes conditions ont donc toujours été comparés à ceux du contrôle du jour. Le prétraitement au calcium des feuillets de titane a permis

d'augmenter l'adsorption à 164% du contrôle. L'utilisation de NaCl à la concentration de 9 g/l a permis d'obtenir l'adsorption maximale de lactoperoxydase. Parmi tous les tampons testés (à pH 7,0: tampons phosphate, HEPES ou TRIS et à pH 5,5 : tampons acétate et citrate), seul l'acétate a inhibé l'adsorption de la lactoperoxydase. Des analyses par spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy* ou XPS) ont permis de confirmer cette adsorption. Les valeurs des signaux de titane, d'oxygène, de carbone et d'azote représentaient respectivement 3,7 - 23 - 60,7 - 12,7 % des composants détectés à la surface des feuillets de titane après une incubation de 30 minutes ; cette répartition était similaire à la proportion de ces mêmes éléments dans une molécule de lactoperoxydase (0 ; 29,9 ; 56,4 ; 13,7 %). La lactoperoxydase adsorbée garde son activité peroxydasique intacte ainsi que l'effet anti-*Candida* par rapport à ces mêmes propriétés observées en solution.

Il n'est pas certain que l'utilisation d'un système peroxydasique sur le long terme soit sans effets secondaires. L'accumulation de lactoperoxydase adsorbée sur les surfaces dentaires pourrait représenter une source de nutriments pour les microorganismes et entraîner une aggravation des saignements gingivaux (Van Steenberghe *et al*, 1994) d'autant plus qu'elle ne produit pas d'hypohalogéneux antimicrobien en raison de l'anaérobie des plaques dentaires épaisses empêchant une production bactérienne de H₂O₂. Dans cette dernière étude clinique, l'utilisation du système lactoperoxydase/thiocyanate a permis certes une diminution des indices de plaque et de saignement dans un premier temps avant de voir les résultats de l'index de saignement se détériorer jusqu'à utilisation d'un dentifrice classique. Dans une autre étude (Fadel & Courtois, 2001), le système lactoperoxydase/thiocyanate a inhibé la croissance de 4 souches bactériennes parodontopathogènes anaérobies à pigmentation noire (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella melaninogenica*), mais l'utilisation de la lactoperoxydase sans ses substrats a entraîné une croissance statistiquement significative de ces bactéries (jusqu'à 400 % du contrôle).

Streptococcus sanguis, une des principales bactéries commensales de la plaque dentaire, est sensible à l'hypoiodite alors qu'une activité NADH-OSCN oxydoréductase, présente dans cette bactérie, limite l'efficacité de l'hypothiocyanite (Courtois *et al*, 1995).

V. 2. Les biofilms à *Candida albicans*

Adhérence de *Candida albicans* à des biomatériaux

Les biomatériaux introduits en bouche se recouvrent d'un biofilm dont *Candida* peut faire partie. Ce biofilm recouvre toute la surface disponible puis croît en épaisseur induisant des gradients de concentration des nutriments et des métabolites. Ces gradients permettent l'établissement de microniches propices au développement de certains microorganismes (Ramage *et al*, 2006) comme par exemple les bactéries anaérobies. Les médecins cliniciens prennent conscience de l'importance de l'étude des biofilms et considèrent aujourd'hui qu'ils sont à l'origine de 65 % de toutes les infections microbiennes humaines (Douglas, 2002). Ainsi 50 à 100% des prothèses vocales, 10 à 30% des cathéters urinaires et 10 à 25 % des tubes endo-trachéaux seront sujets au développement de biofilms à *Candida sp.* (Ramage *et al*, 2006).

Les atteintes nosocomiales sont croissantes au cours d'un séjour long dans un service de gériatrie (Fanello *et al*, 2006 a ; Fanello *et al* , 2006 b) : les prothèses dentaires des patients édentés sont un réservoir à levures et une porte d'entrée pour les candidoses, surtout chez les personnes affaiblies voire dénutries. Les irrégularités de l'intrados de la prothèse et une hygiène orale pauvre favoriseront une colonisation et une croissance de *Candida sp.* (Pereira-Cenci *et al*, 2008).

Candida albicans est souvent détecté sur des polymères de méthacrylate de méthyle des prothèses dentaires. La formation du biofilm sur les prothèses est le résultat d'interactions complexes entre les levures, les bactéries, les nutriments et la salive ou même les protéines sériques (Nikawa *et al*, 1997; Nikawa *et al*, 2000). Le portage de *Candida sp.* sur la résine acrylique a été rapporté dans la littérature comme pouvant monter jusqu'à plus de 80% des prothèses étudiées. De nombreuses études ont indiqué la présence de *Candida sp.* sur les prothèses dentaires (Vandenbussche & Swinne, 1984; Abu-Elteen & Abu-Elteen, 1998; Busscher *et al*, 2010) et d'autres dispositifs oraux tels que les appareils d'orthodontie (Addy *et al*, 1982; Hägg *et al.*, 2004). Certains auteurs (Arendorf & Addy, 1985; Jewtuchowicz *et al*, 2007) ont montré un effet de portage de *Candida sp.* dans le milieu buccal causé par les appareils en place. En effet, les appareils orthodontiques ont favorisé l'augmentation des taux de *Candida sp.* dans la bouche (Arendorf & Addy, 1985) et dans les poches parodontales des porteurs d'appareil dentaire atteints de gingivite (Jewtuchowicz *et al*, 2007). Insérés, ces appareillages agissent comme de nouveaux réservoirs, entraînent

une baisse significative du pH salivaire (Hibino *et al.*, 2009) et déséquilibrent la microflore orale. Dans une bouche saine, la salive protège contre les candidoses muqueuses buccales, en revanche, la bouche sèche est associée avec un nombre accru de levures et un risque de candidose.

Les revues de la littérature (Radford *et al.*, 1999; Pereira-Cenci *et al.*, 2008) ne permettent pas de trancher l'hypothèse d'une plaque spécifique et non spécifique. En effet, la plaque sur prothèse implique un mélange mal défini de bactéries (telles que *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus* et de bactéries Gram négatif anaérobies) capables avec *Candida sp.* de provoquer également une inflammation de la muqueuse.

Par ailleurs, *Candida sp.* a été détecté en faible proportion dans des sites de péri-implantites associé à des bactéries parodontopathogènes telles que *Porphyromonas sp.*, *Prevotella sp.* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Leonhardt *et al.*, 1999; Pye *et al.*, 2009), mais les relations écologiques avec leur environnement et un rôle pathologique éventuel ne sont pas encore comprises.

In vitro, *Candida albicans* peut également adhérer à des membranes biodégradables utilisées pour la régénération tissulaire parodontale (Molgatini *et al.*, 1998) et aux matériaux de rebasage pour prothèses (Kulak & Kazazoglu, 1998). Enfin, la présence de *Candida albicans* a été documentée sur des prothèses obturatrices (quel que soit le matériau : silicone, résine, ou titane) chez les patients avec des malformations maxillaires congénitales, des tumeurs, ou des traumatismes, et sur la muqueuse adjacente à la prothèse (Mattos *et al.*, 2009); ces patients peuvent présenter une stomatite induite par la prothèse.

Les matériaux insérés dans d'autres sites peuvent également être colonisés par des levures, causant l'infection de différents dispositifs (Cauda, 2009): prothèses articulaires, cardiaques (Falcone *et al.*, 2009), vocales (Kania *et al.*, 2010), cathéters (Brouns *et al.*, 2006)... Ces infections nécessitent un traitement antifongique prolongé et souvent la dépose de la prothèse.

Production de biofilms à *Candida albicans* sur biomatériaux

Une meilleure compréhension de la biologie de l'interface et des traitements de surface du matériel nécessite des modèles expérimentaux produisant des biofilms *in vitro* sur des supports faciles à manipuler en laboratoire (Chandra *et al*, 2001) pour en étudier la croissance ou la sensibilité aux traitements.

Différentes études ont déjà décrit des modèles, qui visent essentiellement les procédures capables de limiter l'adhésion de la levure et la formation de biofilm. Certaines de ces techniques ont été initialement proposées comme systèmes artificiels de modèle de biofilm de plaque dentaire (revue par Sissons, 1997), notamment pour les études de biologie de la plaque dans les caries et la recherche en parodontologie.

Candida albicans peut être cultivé, avec ou sans l'ajout de salive, sur différents matériaux utilisés en dentisterie, y compris les résines acryliques, la porcelaine, le composite, l'amalgame, l'hydroxyapatite, la silicone, et le polystyrène. Les modèles *in vitro* permettent des cultures statiques ou des cultures en continu. Les études spécifiques de la phase d'adhésion nécessitent une étape de lavage intermédiaire pour enlever les cellules de levures non-adhérentes. L'évaluation de la phase de croissance du biofilm est généralement basée sur la coloration des cellules microbiennes (cristal violet, entre autres), des activités métaboliques (test au tétrazolium), la détermination de la biomasse (poids sec, incorporation de traceur radioactif, par exemple acides aminés), ou l'examen microscopique. L'hydrogel poloxamer a été proposé (Percival *et al*, 2007) comme support de culture en boîte de Pétri pour induire des agrégats de bactéries et de levures semblables à un biofilm. La gélification thermoréversible rend la préparation et la récupération des échantillons de biofilms simple et reproductible, mais nécessite encore confirmation avant une utilisation en routine.

La procédure de production de biofilms dans cette thèse est originale: la poudre de titane immergée dans le milieu de culture liquide de Sabouraud et contaminée par une suspension de *Candida albicans* se manipule aisément pour étudier l'évolution des biofilms, la désorption entraînée par les lavages et l'effet des différentes procédures de décontamination. Les surnageants (phase planctonique) peuvent être suivis par turbidimétrie et les biofilms peuvent être quantifiés par des méthodes chimiques. Les feuillets de titane et de résine ont été traités de la même manière. La biomasse de

Candida albicans adhérente au biomatériau a été évaluée par la méthode au sel de tétrazolium (réduit par les levures viables en MTT-formazan qui absorbe à 570 nm après extraction dans l'isopropanol). Les phases planctoniques et le support des biofilms sont séparés aisément par sédimentation. Des examens microscopiques peuvent confirmer la présence de levures à la surface de la poudre de titane. Les granules de titane sont, en effet, entourés de couches de blastoconidies après une incubation de 2 jours et des structures filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) sont observées après 3 semaines.

Le titane est largement utilisé pour la fabrication d'implants en raison de sa bonne biocompatibilité et ses propriétés mécaniques, mais l'infection reste une cause principale d'échec, conduisant à leur extraction. La surface de titane n'est pas antimicrobienne en soi, de sorte qu'il peut être utilisé comme support pour des biofilms à *Candida*. Ces biofilms sur poudre de titane offrent un modèle simple et fiable pour investiguer de nouvelles stratégies antimicrobiennes, et peut être étendu à d'autres microorganismes contaminant les matériaux implantés. Réaliser des surfaces d'implants résistant à la colonisation microbienne devrait permettre de réduire les complications infectieuses.

L'approche par le biais des cultures statiques simplifie la complexité *in vivo* à des interactions entre une espèce unique et un seul support, sans tenir compte des nombreux composés salivaires et de l'abondante microflore orale dans l'environnement réel. Les microorganismes des biofilms *in vivo* affichent des propriétés différentes de celles observées en laboratoire. Les biofilms formés d'espèces multiples ont déjà été étudiés sur différents matériaux dentaires tels que l'émail, l'amalgame, les composites et résines acryliques pour évaluer le rôle de la rugosité de surface (surtout dans les premières étapes de la formation de biofilms) (Dezelic *et al.*, 2009). La diffusion des médicaments à travers les biofilms, y compris les biofilms à *Candida sp.*, peut être investiguée par un système de perfusion expérimentale fait d'une superposition d'un biofilm et d'un filtre sur la gélose contenant l'antifongique en cours d'évaluation (Samaranayake *et al.*, 2005). Ces techniques de perfusion ont été utilisées pour vérifier si une diffusion limitée des antimycosiques pouvait expliquer la résistance des biofilms.

Contrairement aux cultures statiques, les modèles de culture en continu (cellules d'écoulement, bouches artificielles, et fermenteurs) permettent de tenir compte des flux oraux et des conditions d'immersion orale, ainsi que des forces de cisaillement du

biofilm et des apports en nutriments (Bernhardt *et al.*, 1999; Ramage *et al.*, 2008). En effet, les biofilms des biomatériaux prothétiques sont exposés à des flux de salivaires charriant les nutriments et l'eau. Le débit liquidien influence la production de la matrice extracellulaire par les biofilms à *Candida albicans in vitro* (Hawser *et al.*, 1998). Si l'on prend la quantité de matériel extracellulaire produit dans les cultures statiques comme valeur de base, une agitation douce l'a significativement multipliée par ~ 1,25, tandis qu'un brassage plus intense a conduit à son inhibition complète. D'autres données (Biswas & Chaffin, 2005) ont signalé l'absence de formation de biofilms à *Candida albicans* en anaérobiose, même si cette levure peut croître dans un environnement anaérobique. La rétention des levures en présence d'un flux continu de liquide a été utilisée comme marqueur de l'adhésion de la levure à la surface de la même manière que la rétention après lavage (Cannon *et al.*, 2010). Les cultures dans des conditions d'écoulement continu ont facilité la pénétration de *Candida albicans* dans les élastomères de silicone par rapport aux conditions statiques, surtout lorsque des cultures pures ont été testées. Cependant, la présence de streptocoques a diminué l'invasion du matériel par la levure, soulignant ainsi l'importance de tester ces matériaux dans un environnement biologique (Rodger *et al.*, 2010).

V. 3. Effet du peroxyde d'hydrogène sur *Candida albicans*

La coexistence de 2 séquences enzymatiques dans un système peroxydasique rend difficile la démonstration de l'efficacité réelle de l'activité peroxydasique en présence d'un donneur de peroxyde d'hydrogène, lui-même anti-*Candida* au-delà d'une certaine concentration.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) généré par un système enzymatique glucose / glucose-oxydase peut inhiber la croissance de *Candida albicans*, même en absence de toute combinaison avec un système peroxydasique qui catalyse la peroxydation de l'iodure en un oxydant très puissant, l'hypoiodite. En conséquence, les propriétés antifongiques des systèmes peroxydasiques doivent être vérifiées en présence d'une quantité de glucose-oxydase non candidacide *per se*. Certaines données de la littérature (Nakagawa *et al.*, 1999 ; González-Parrága *et al.*, 2003), montrent que de faibles doses en H_2O_2 (de l'ordre de 0,5 mM) non candidacides peuvent induire une plus grande synthèse de glutathion réductase et de catalase permettant ainsi à la levure d'acquérir une tolérance accrue au peroxyde d'hydrogène, ce que notre travail confirme. Ces données suggèrent de réexaminer les conséquences de l'utilisation chronique du peroxyde d'hydrogène sur l'écosystème oral, et particulièrement sur celui des levures.

C. albicans est un micro-organisme catalase positif; une étude antérieure (Pitten *et al.*, 2003) avait déjà montré que cette levure n'était sensible qu'à des doses élevées de peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène à concentration dommageable pour les muqueuses (eau oxygénée à 3% soit du Perhydrol 30 % dilué 10 fois : c.-à-d. ~ 1M) diminue de 90 % les spores de *C. albicans* en suspension (Tombes & Galluci, 1993) : il s'agit d'une concentration élevée par rapport à la production de la glucose-oxydase (de l'ordre du mM). Par contre, des doses en peroxyde d'hydrogène non candidacides (10mM à 30° C pendant 6 jours) semblent, elles, induire une différenciation en hyphes de *Candida albicans* (Nasution, 2008).

Effet de G / GOD sur *Candida albicans*

Le travail *in vitro* a démontré la susceptibilité de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 au peroxyde d'hydrogène produit par la séquence glucose (155 mM) / glucose-oxydase lorsque l'activité de l'enzyme était supérieure à 0,63 mU/ml. Ainsi, la production d' H_2O_2 par la GOD atteint un plateau après 3,5 heures d'incubation à 37° C *in H_2O*. Lors de 3 expériences indépendantes, la concentration en H_2O_2 produit était alors $3,26 \text{ mM} \pm 0,25 \text{ mM}$. Après 24 heures d'incubation à température ambiante en présence des mêmes quantités de réactifs (et toujours en l'absence de lactoperoxydase), la concentration de peroxyde d'hydrogène était de $1,5 \pm 0,4 \text{ mM}$ (n = 6).

On pourrait donc se demander si le peroxyde d'hydrogène produit par la glucose-oxydase n'est pas suffisant par lui-même pour obtenir un effet anti-levure, et si l'addition d'une séquence peroxydase est alors réellement indispensable. Le peroxyde d'hydrogène, seul, est d'autant moins efficace contre les micro-organismes que ces derniers expriment une activité catalase. La concentration minimale inhibitrice de GOD observée pour empêcher la croissance de *Candida* est 0,63 mU/ml. Elle correspond à la quantité de glucose-oxydase empêchant toute croissance pendant 16 h; cela ne signifie pas nécessairement que les levures sont toutes tuées. La quantité de glucose-oxydase réduisant la croissance de moitié varie quelque peu selon la méthode de calcul: 0,63 U/ml par intégration des courbes sur un temps de 16 h ou 0,95 $\mu\text{U/ml}$ par étude de l'absorbance après 16 h d'incubation. Les comptages de levures après 16 h d'incubation permettent d'approcher non seulement l'effet d'inhibition sur la croissance mais aussi le taux de survie de ces micro-organismes mis en présence du système glucose/glucose-oxydase. La quantité de GOD (1,3 U/ml) qui inhibe la croissance, réduit de 2 unités logarithmiques le nombre de blastoconidies vivantes (sans pour autant totalement stériliser la suspension) présentes initialement ($1,5 \times 10^6$ CFU/ml).

La glucose-oxydase, à une activité de 1,3 U/ml et en présence de glucose 115 mM, produit suffisamment de peroxyde d'hydrogène pour inhiber totalement la croissance de *Candida*. Mais l'addition de catalase permet de lever totalement l'effet inhibiteur du système G/GOD par clairance du peroxyde d'hydrogène. Cette levée totale de l'inhibition par la catalase exclut l'existence d'un autre mécanisme inhibiteur (changement de pH, toxicité du gluconate ou appauvrissement du milieu réactionnel en

oxygène pour expliquer l'effet anti-*Candida* d'un système peroxydasique avec la glucose-oxydase comme donneur de peroxyde d'hydrogène).

Deux expositions successives à un système glucose / glucose-oxydase furent évaluées par turbidimétrie. Les suspensions préincubées en présence de glucose et de GOD à des concentrations comprises entre 1,5 et 12 mU/ml, présentent une résistance accrue à une 2^{ème} incubation en présence de GOD 12 mU/ml. Ces résultats mettent en évidence la plus grande efficacité du système sur des souches naïves par rapport à des souches ayant déjà subi une première inhibition.

Un travail dans la littérature (Vuddakul *et al.*, 1989) montre que de faibles quantités de H₂O₂ inhibent l'adhérence de *C. albicans* sur des biomatériaux sans affecter la survie de la levure.

V.4.Effet des systèmes peroxydasiques sur *Candida albicans*

Effet des hypohalogénés sur *C. albicans*

Les peroxydases, en présence de peroxyde d'hydrogène, catalysent l'oxydation d'halogénures (Cl^- , I^- , Br^-) ou du thiocyanate (SCN^-) en oxydants particulièrement toxiques (OCl^- , OI^- , OBr^- , OSCN^-). Le suivi de la croissance, par turbidimétrie en présence des composants à différentes concentrations du système peroxydase, confirme des données plus anciennes (Majerus & Courtois, 1992) obtenues par comptage sur milieu solide après incubation en présence des mêmes réactifs. Seul l'hypoiodite peut être candidacide pour les concentrations en substrats et en enzymes mentionnées *supra* dans ce travail.

En présence d'une séquence peroxydase, H_2O_2 est totalement consommé. En effet, il ne peut pas être détecté par chimiluminescence (méthode à la lucigénine).

Le travail *in vitro* a démontré la susceptibilité de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 à l'hypoiodite formé dans le système glucose (155 mM) / glucose-oxydase (0,2 U/ml) / iodure de potassium (1.2 mM) / lactoperoxydase (960 mU_{ABTS}/ml). L'évaluation de la zone d'inhibition autour d'un puits central contenant le gel permet de contrôler l'activité anti-*Candida* tout au long de l'étude clinique et d'instaurer un contrôle de qualité lors de la production de produits d'hygiène bucco-dentaire. L'effet inhibiteur sur la croissance de *C. albicans* est retrouvé après incorporation des réactifs (à des concentrations identiques) dans un gel oral. Cet effet perdure au moins 3 semaines. Il est important de souligner que la quantité de GOD utilisée pour ces expériences correspond à l'activité maximale non inhibitrice dans les conditions expérimentales, permettant ainsi de ne pas mettre en doute l'effet propre de l'hypoiodite.

Un seul travail dans la littérature (Casentini-Borocz & Bringman, 1990) rapporte que la glucose-oxydase conjuguée à un anticorps anti-*Candida* n'est pas cytotoxique pour la levure alors qu'une combinaison de glucose-oxydase et de myéloperoxydase immunoconjuguée l'est; la concentration de glucose-oxydase était alors 0,5 $\mu\text{U/ml}$ et celle du glucose 5 mg/ml (27 mM) soit des concentrations inférieures à celles que nous avons trouvées antifongiques.

Effet des systèmes peroxydasiques sur des biofilms à *C. albicans*

Les systèmes peroxydasiques produisant de l'hypiodite empêchent la croissance de la levure *Candida albicans* sur la poudre de titane tout comme ils inhibaient leur croissance en milieu liquide et sur milieu solide en boîte de Petri. L'hypothiocyanite n'a pas d'effet tout comme dans les autres situations expérimentales en présence d'une activité glucose-oxydase de 0,2 U/ml. Ce protocole utilisant un biomatériau très utilisé en implantologie offre un argument quant au bien-fondé du choix d'un système peroxydasique avec de l'iodure pour substrat

Le système G/GOD/LPO/KI inhibe la croissance de *C. albicans* aussi bien en solution aqueuse qu'à l'interface support/gel. Avec une activité de GOD de 0,2 U/ml, le système iodure/lactoperoxydase inhibe la formation de biofilm à *Candida* sur titane et sur résine immergés dans un milieu de culture contaminé alors que le système thiocyanate/lactoperoxydase retarde seulement son développement.

A une activité de GOD de 1,3 U/ml, les 2 systèmes (avec iodure ou thiocyanate comme substrat) empêchent le développement du biofilm dans les phases attachée et planctonique pendant au moins 4 jours.

Les biofilms à *Candida* expriment une plus grande activité antioxydante et contiennent moins de ROS (*reactive oxygen species*) que les levures planctoniques (Seneviratne, 2008).

Les microorganismes organisés en biofilms expriment des phénotypes distincts de ceux en suspension et sont moins susceptibles aux antifongiques. Les souches invasives sont le plus souvent des souches capables de former des biofilms *in vitro* (Kuhn *et al.*, 2002). Tous les traitements antifongiques actuels sont inefficaces ou peu efficaces contre les biofilms *in vitro* : les mécanismes de cette résistance sont encore mal compris.

V. 5. Applications cliniques

Mise en évidence des peroxydases dans l'environnement oral

La présence de peroxydases orales (sialo- et myéloperoxydase) a été évaluée sur des piliers de cicatrisation en titane ayant passé 2 semaines en bouche après dénudation des implants. Ces piliers ont été immédiatement examinés après dévissage pour éviter le phénomène de désorption. Les peroxydases mesurées sur la surface des piliers de cicatrisation représentent les peroxydases encore présentes après 15 lavages. Un pilier unique retiré chez un patient a montré les quantités adsorbées les plus faibles suggérant que, chez celui-ci, le port d'une prothèse provisoire pour raisons esthétiques a diminué le contact entre les peroxydases orales et le pilier de cicatrisation.

Traitement de surface pour contrôler les biofilms à *Candida*

Une alternative pour éviter la formation de biofilm serait de diminuer l'adhérence des microorganismes au biomatériau par des traitements de surface antiadhésifs ou antimicrobiens, avec ou sans libération de médicament. En effet, l'ancrage des microorganismes sur les surfaces telles que les muqueuses, les dents, ou le biomatériau est une étape cruciale dans la formation des biofilms dans la cavité buccale. L'adhérence peut être quantifiée par la mesure de la rétention des micro-organismes après des périodes d'incubation fixes et des lavages ou par la rétention des micro-organismes en présence d'un flux continu de milieu liquide (Cannon *et al.*, 2010).

De nombreux protocoles ont été proposés pour limiter la formation de biofilm sur les différents matériaux utilisés en dentisterie (revue récente de Busscher *et al.*, 2010.) comme des revêtements d'antibiotiques ou de peptides, d'argent et de polymère, d'ammonium quaternaire... *In vitro*, le revêtement de dioxyde de titane inhibe l'adhésion de *Candida* à la base de la prothèse en résine acrylique (Arai *et al.*, 2009).

Les biomatériaux coatés par un revêtement au chitosane semble empêcher le développement de biofilms de levures et de bactéries (Carlson *et al.*, 2008). Des investigations dans le cadre de cette thèse ont montré que la lactoperoxydase adsorbée sur le titane conservait son activité candidacide lorsque les substrats étaient présents en concentration adéquate.

De nombreux paramètres du traitement de surface des biomatériaux doivent être pris en considération avant les applications cliniques: la quantité de médicament biodisponible sur la surface du matériau, la cinétique et la sécurité des composés

libérés, les interférences avec l'environnement buccal (contrôle du biofilm, intégration tissulaire, régénération tissulaire ou risque d'allergie).

Etudes cliniques *in vivo*

Dans notre travail, sur les 155 prothèses écouvillonnées, plus de 80 % présentent une contamination de la prothèse supérieure par *Candida sp.* Ce pourcentage est très similaire que le patient soit examiné en consultation ambulatoire ou hospitalisé pour soins de longue durée dans des unités de gériatrie ou en maison de repos. Les espèces les plus fréquemment isolées étaient *C. albicans* (88%), *C. glabrata* (11%) et *C. tropicalis* (6%). Il y avait une association significative entre la contamination de la prothèse palatine et la colonisation de la muqueuse, rendant obligatoires la décontamination *ex vivo* de la prothèse et la désinfection de la muqueuse *in vivo*.

Dans une étude clinique préliminaire (phase I) une préparation galénique contenant des facteurs salivaires anti-microbiens et un système peroxydase a été testée. Durant 2 semaines, quotidiennement, un gel a été appliqué par l'opérateur en double aveugle sur l'intrados de la prothèse. Il s'agissait soit d'un gel actif contenant tout le système G / GOD / KSCN/ LPO / lysozyme / lactoferine /colostrum soit du même gel inactivé par chauffage. Il n'y a eu aucun effet indésirable observé ni de diminution de la charge de *Candida* sur l'intrados des prothèses dans aucun des groupes concernés Le groupe avec gel actif a montré une diminution de la colonisation de la muqueuse d'au moins 1 unité logarithmique chez 4 patients sur 7 (Chi-square test, $p = 0.018$).

Etudes cliniques *ex vivo*

Les essais cliniques *ex vivo* dans le cadre cette thèse ont précisé les conditions de décontamination des prothèses par une solution contenant le système iodure / peroxydase. L'activité de la glucose-oxydase doit être suffisante pour surpasser l'activité de la catalase de *Candida*. Il faut noter que la simple élévation de température des bains de décontamination ne rend pas le système efficace, peut-être parce que toutes les activités (glucose-oxydase et catalase) augmentent parallèlement.

Nouvelles stratégies basées sur une meilleure connaissance des biofilms

La diminution de la sensibilité des levures dans les biofilms aux antifongiques classiques a encouragé les chercheurs à explorer d'autres moyens pour inhiber *Candida* et limiter les effets délétères de son biofilm.

La connaissance des interactions entre *Candida* et les tissus buccaux et entre *Candida* et les bactéries orales devrait présenter de nouvelles perspectives pour la thérapie. Les micro-organismes dans les biofilms (levures incluses) sont moins sensibles aux agents antimicrobiens que les microorganismes libres en suspension. Ainsi, des auteurs (Thurnheer et al., 2003) ont montré une diminution du taux de diffusion de drogue proportionnelle à la racine cubique du poids moléculaire du marqueur de la drogue au travers des biofilms de polyespèces, contenant notamment *Candida*. Ceci suggère que l'encombrement stérique dans la profondeur du biofilm est une cause du retard dans la pénétration de la molécule. Néanmoins, la résistance aux médicaments pourrait également être attribuée aux propriétés métaboliques et à l'expression de gènes induite par les micro-organismes vivant en communauté ainsi qu' à la production d'une matrice extracellulaire.

D'autres études *in vitro* (revues par Nobile & Mitchell, 2006) envisagent plusieurs facteurs moléculaires qui expliquent le développement du biofilm et sa résistance aux médicaments, tels que les phénotypes spécifiques du biofilm (Finkel & Mitchell, 2011), les adhésines, la communication entre cellules, et *le quorum sensing* (Deveau et Hogan, 2011). Le lien entre la production d'hyphes et le développement de biofilms à *Candida in vitro* et entre la production des hyphes et les conditions pathologiques *in vivo* a conduit à investiguer la régulation génétique de la morphogenèse des hyphes. L'initiation rapide du biofilm en présence de nouvelles surfaces disponibles pour son ancrage a orienté l'analyse génétique vers une expression génétique distincte de celle trouvée dans l'état planctonique.

Les mécanismes du *quorum sensing* qui permettent aux colonies de microorganismes (y compris les levures) de « sentir » leur densité cellulaire, implique de petites molécules telles que farnesol et tyrosol. La première est connue pour favoriser la résistance contre le stress oxydatif et inhiber la morphogenèse des hyphes et la formation de biofilms, tandis que la seconde semble faciliter le développement du biofilm. La (sur-)expression et la production de matrice polysaccharidique d'adhésines est également liée à la formation de biofilm. Toutes ces caractéristiques biologiques contribuent à faire des biofilms à *Candida* "un environnement protégé bien conçu"

(Mukherjee *et al.*, 2005). Une meilleure connaissance des événements moléculaires liés à la formation de biofilms à *Candida* pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies pour prévenir la candidose orale contractée à partir de biomatériaux insérés dans la cavité buccale. Le *quorum sensing* est aussi décrit pour une autre espèce bactérienne cariogène : *Streptococcus mutans* (Perry *et al.*, 2009) ; dans ce cas, les molécules du *quorum sensing* réduisent la densité de la population de streptocoques. A ce jour, rien n'est connu sur l'implication des changements de densité d'une population microbienne sur une autre, à fortiori sur l'ensemble des micro-organismes composant un biofilm sur prothèse dentaire. Des études complémentaires devraient envisager davantage les changements dynamiques du microbiote complexe des biofilms sur prothèse à considérer comme une des niches écologiques parmi toutes celles de la sphère orale.

Nouvelles stratégies basées sur la recherche en biologie exocrine

Les molécules antimicrobiennes et les systèmes issus des sécrétions exocrines sont des sujets de recherche prometteurs. Des études *in vitro* ont déjà montré les avantages du lysozyme, de la lactoferrine, de l'histatine (Pusateri *et al.*, 2009), et des systèmes peroxydasiques avec thiocyanate, chlorure, et surtout iode. Toutefois, la transposition de ces données *in vitro* à la situation *in vivo* n'a pas encore fourni les résultats escomptés en raison de l'immense complexité de l'environnement buccal. La publication de grandes études cliniques est vivement attendue. La recherche en biologie des peroxydases est un exemple illustrant les multiples facettes du transfert de connaissances des sciences fondamentales aux applications cliniques. En présence de peroxyde d'hydrogène, par exemple, les peroxydases dans les sécrétions exocrines sont capables de catalyser la production de composés hypohalogéneux antimicrobiens : hypoiodite *in vitro* et hypothiocyanite dans la salive. Des études antérieures ont montré qu'une exposition de 30 minutes à hypoiodite était suffisante pour inhiber la croissance planctonique *in vitro* (Majerus & Courtois, 1992).

Notre travail démontre que le développement d'un biofilm à *Candida* peut être réduit ou même supprimé par l'hypoiodite et l'hypothiocyanite générés par la lactoperoxydase. Ce fut le cas non seulement lorsque le système peroxydase et substrats étaient dissous dans la phase liquide dans laquelle le matériau avait été immergé, mais aussi lorsque la peroxydase précoatée au matériel a été activée par simple addition des substrats dans la phase liquide. Ces données ont également

démontré l'efficacité des systèmes peroxydasiques contre une souche de *Candida* pendant une période d'incubation de trois semaines et de façon concomitante suggéré un intérêt possible dans le revêtement du biomatériau avec la peroxydase. D'autres investigations ont démontré qu' *in vitro* l'activité lactoperoxydase n'a pas été modifiée par le coating du titane, que l'épuisement du substrat (à savoir le peroxyde hydrogène et l'iodure) a été le facteur limitant et que la lactoperoxydase incorporée dans le gel a maintenu son activité pendant au moins un an.

Des recherches antérieures ont indiqué un effet antibactérien sur les bactéries Gram positif et Gram négatif, ce qui suggère un effet non spécifique d'inhibition du métabolisme microbien (Courtois *et al.*, 1995). La possibilité de transposer ces connaissances à la clinique reste à démontrer. En effet, l'immunogénicité de la surface du biomatériau revêtu de lactoperoxydase devrait limiter les applications de ce système aux conditions *ex vivo* de décontamination des prothèses. Outre la toxicité des produits oxydants sur les cellules de l'hôte, la compétition entre l'iodure et le thiocyanate est un autre facteur limitant pour l'utilisation *in vivo*. Le thiocyanate est non seulement présent dans plusieurs sécrétions exocrines (par exemple, la salive humaine), mais est également le substrat préférentiel de la lactoperoxydase. Nos travaux ont montré que l'incorporation simultanée d'iodure et de thiocyanate dans le même gel a diminué progressivement l'effet bénéfique de l'iodure (2 mM), en présence de concentrations croissantes de thiocyanate allant de 0,25 à 4 mM (correspondant à la fourchette normale de concentration de cet ion dans la salive).

Précautions pour tester de nouveaux dispositifs *in vivo*

Les chercheurs doivent être conscients des biais fréquemment rencontrés dans les études cliniques évaluant la contamination microbienne et la colonisation des dispositifs oraux et des prothèses. Les recommandations et lignes directrices pour évaluer les avantages des procédures prophylactiques anti-*Candida* sont similaires à celles préconisées pour tous les produits de soins buccaux. Deux biais importants sont l'influence des enquêteurs sur les habitudes hygiéniques des patients (Grimoud *et al.*, 2005) et la formulation galénique des produits. L'évaluation de l'efficacité du dentifrice pour l'hygiène des prothèses dentaires nécessite des contrôles: l'un testant le produit sans molécule active et l'autre testant le brossage mécanique seul. L'effet abrasif du produit doit être évalué, et l'abrasivité de la salive doit être prise en considération.

La quantification de la biomasse de *Candida* adhérente à la prothèse est difficile en pratique. Les échantillons de levures du milieu buccal peuvent être collectés par rinçage, empreinte, ou écouvillonnage. Les écouvillons et les empreintes sont plus adaptés à la collecte des levures attachées à des surfaces, et les écouvillonnages sont plus simples à mettre en œuvre dans des études cliniques à plus grande échelle. Les procédures pour quantifier la biomasse de levures *in vitro* ne sont pas applicables aux études épidémiologiques *in vivo*, en particulier parce que les porteurs de prothèse ne sont pas toujours compliants. Les prothèses dentaires peuvent être rincées dans une solution saline et brossées pour récolter les cellules microbiennes. La suspension est ensuite diluée en série pour le comptage (Panzeri *et al.*, 2009). Une autre étude (Vanden Abbeele *et al.*, 2008) a documenté la fiabilité de l'écouvillonnage oral pour étudier le portage de levures sur les prothèses. L'écouvillonnage des prothèses pour *Candida sp.* est plus qu'un simple outil de diagnostic: Il pourrait présenter une occasion de vérifier la compliance du patient et le respect des conseils d'hygiène ainsi que l'efficacité de nouveaux antifongiques topiques. Les comptages de levure après écouvillonnage reflètent la biomasse présente sur les surfaces orales, mais ce n'est pas le nombre de cellules de levures réellement incluses dans les biofilms buccaux. Les CFU comptées sur la gélose ne représentent qu'une petite partie des cellules récoltées par le coton tige, comme démontré lors de trois ensemencements successifs du même coton tige qui ont fourni des données similaires (dans un intervalle de 0,1 unité logarithmique). Par ailleurs, deux écouvillonnages successifs de la même surface orale ont permis de récolter des quantités similaires de levures (dans l'intervalle de 0,5 unité logarithmique). Enfin, les enquêteurs eux-mêmes peuvent influencer les habitudes d'hygiène des patients. Cependant, dans l'étude précédemment citée (Vanden Abbeele *et al.*, 2008), en l'absence de tout conseil d'hygiène, un second écouvillonnage des prothèses chez 46 patients après une semaine n'a montré que des variations mineures, minimisant ainsi l'effet de stimulation à l'hygiène. L'écouvillonnage répété (à une semaine d'intervalle) de 46 autres porteurs de prothèse n'a pas montré de variation dans le comptage des levures chez plus de 85% des patients. Une diminution du nombre de levures supérieure à 1 unité logarithmique n'a été retrouvée que chez moins de 15% des patients. En revanche, un programme d'hygiène incluant un gel placebo (testé pour être inactif *in vitro*) a entraîné une diminution du portage de levures après deux semaines.

VI. Conclusion et perspectives

Les levures appartenant au genre *Candida* colonisent normalement la cavité buccale humaine. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré l'incorporation de *Candida sp.* dans les biofilms recouvrant différents biomatériaux et dispositifs tels que les prothèses dentaires. S'il est absurde d'éradiquer un commensal de l'environnement oral, il est important de considérer la prothèse et le patient simultanément, car la prothèse est un nid pour la croissance de *Candida sp.* et une source possible d'infection pour la muqueuse buccale surtout lorsque le système immunitaire de l'hôte est compromis.

L'hygiène quotidienne des prothèses à l'aide d'une brosse, adaptée à cet effet, est la principale recommandation à tous les porteurs de prothèses (et de tout autre dispositif) afin de prévenir le développement de biofilm à *Candida sp.* Les membres de la famille et les professionnels de la santé doivent assumer cette tâche quand il y a une carence dans la dextérité et / ou une perte d'autonomie, surtout chez les personnes âgées et handicapées.

En cas de stomatite prothétique, la décontamination des prothèses dentaires est obligatoire. Les antimycosiques doivent être réservés au traitement des patients infectés; ils sont moins actifs contre les biofilms à *Candida sp.* que sur les levures en suspension et pourraient provoquer l'apparition de souches résistantes s'ils sont appliqués tous les jours sur les prothèses dentaires pour prévenir la colonisation par les levures. Néanmoins, peu d'études, sinon aucune, intègrent tous les aspects du problème: bien-être des porteurs de prothèse, prévention des candidoses et des altérations du biomatériau après décontamination, ainsi qu'étude du développement du biofilm à *Candida sp.*

Une meilleure compréhension de la biologie de *Candida* dans le milieu buccal fournira de nouveaux outils pour le contrôle des biofilms à *Candida*, le développement ou l'amélioration des surfaces de biomatériaux plus appropriés à la dentisterie et une meilleure gestion de leur utilisation dans la cavité buccale. D'autres investigations dans ce domaine nécessiteront une coopération entre les dentistes, les biologistes et les ingénieurs. Depuis 2 à 3 décennies, l'industrie cosmétique bucco-dentaire tente de mimer les systèmes peroxydasiques pour contrôler la microflore orale organisée en biofilms sur les surfaces muqueuses et dentaires.

Transposer des données *in vitro* vers l'*in vivo* n'est pas chose aisée. Ainsi le système iodure / peroxydase très actif *in vitro* ne fonctionne pas *in vivo* lorsqu'on l'incorpore dans un gel oral. L'efficacité du système G/GOD/KI/LPO semble être limitée par la catalase. Si remplacer les substrats naturels des peroxydases n'apporte pas les résultats escomptés *in vivo*, copier la salive pourrait s'avérer plus prometteur. Ainsi enrichir un gel en système thiocyanate / peroxydase avec d'autres facteurs de défense tend à réduire la colonisation des muqueuses. Améliorer les performances des formulations de ces produits d'hygiène bucco-dentaire nécessite de maîtriser les nombreuses interactions entre mécanismes de défense et micro-organismes des biofilms et d'adopter une vision écologique de la microflore orale. Cela ne pourra se faire qu'en développant des procédures et des modèles expérimentaux susceptibles d'interroger plusieurs mécanismes de défense sur un ensemble de germes plutôt qu'un seul mécanisme sur une seule espèce microbienne.

Points acquis par cette thèse

- Le système G/GOD/KI/LPO inhibe la croissance de *Candida albicans* en suspension.
- La peroxydase est active aussi bien après sa dissolution que son adsorption sur des biomatériaux (titane et résine).
- Un modèle expérimental original de production de biofilm à *Candida sp.* sur titane a été validé.
- Le système G/GOD/KI/LPO empêche la formation de biofilm à *Candida in vitro*.
- L'étalement de gel contenant des antimicrobiens sur des prothèses supérieures amovibles permet de valider l'efficacité *in vivo* de ces molécules. Le système SCN-/peroxydase/ lysozyme/lactoferrine réduit la contamination des muqueuses par *Candida sp.* chez un nombre restreint de patients.
- Les résultats obtenus *in vitro* par le système G/GOD/KI/LPO sont transposables à la décontamination *ex vivo* des prothèses dentaires.

VII. Références bibliographiques

- Abu-Elteen K.H., Abu-Elteen R.M. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol.*, 21: 41-8, 1998.
- Addy M., Shaw W.C., Hansford P., Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br. J. Orthod.*, 9:158-63, 1982.
- Alpay K., Kurkcuoglu N. Iododerma: an unusual side effect of iodide ingestion. *Pediatr. Dermatol.* 13: 51-53, 1996.
- Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A., *Clinical mycology*, Churchill Livingstone (Philadelphia, US), 2003.
- Archer S., Nelson D., Weir E. Detection of activated O₂ species in vitro and in rat lungs by chemiluminescence. *J. Appl. Physiol.*, 67: 1912-1921, 1989.
- Atkinson J.C., O'Connell A., Aframian D. Oral manifestations of primary immunological diseases. *J. Am. Dent. Assoc.*, 131: 345-56, 2000.
- Arai T., Ueda T., Sugiyama T., Sakurai K. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *J.Oral Rehab.*, 36: 902-8, 2009.
- Arendorf T., Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *J.Clin Periodontol.*, 12: 360-8, 1985.
- Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Gross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 17:1359-1365, 2011.
- Ben-Aryeh H., Blumfield E., Szargel R., Laufer D., Berdicevsky I. Oral *Candida* carriage and blood group antigen secretor status. *Mycoses*, 38: 355-8, 1995.
- Bernhardt H., Zimmermann K., Knoke M. The continuous flow culture as an *in vitro* model in experimental mycology. *Mycoses*, 42: 29-32, 1999.
- Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods, p. 67. E. Grune & Stratton (New York), 1971.
- Biswas S., Chaffin W. Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Current Microbio.*, 51: 100-4, 2005.

- Borg M., Rüchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp.* during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.*, 56:626-31, 1988.
- Bosch E.H., Van Doorne H., De Vries S. The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *J. App. Microbio.*, 89: 215-224, 2000.
- Brawner D.L., Cutler J.E. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 27:1335-41, 1989.
- Briggs D., Seah M.P. Practical surface analysis by auger and X-ray photoelectron spectroscopy. John Wiley & sons (Salisbury), 1983.
- Bridson E.Y. The oxid manual. Oxoid limited (Basingstoke), 1990.
- Brouns F., Schuermans A., Verhaegen J., De Wever I., Stas M. Infection assessment of totally implanted long-term venous access devices. *J. Vasc. Access*, 7: 24-28, 2006.
- Buchan A.D., Gow N.A. Rates of germ tube formation from growing and non-growing yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 65: 15-8, 1991.
- Busscher H., Rinastiti M., Siswomihardjo W., van der Mei H. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J. Dent. Res.*, 89: 657-665, 2010.
- Cannon R.D., Chaffin W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10:359-83, 1999.
- Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A.B., Monk B.C. *Oral Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J. Dent. Res.*, 74:1152-61, 1995.
- Cannon R., Lyons K., Chong K., Holmes A. Adhesion of yeast and bacteria to oral surfaces. *Meth.Mol.Biol.*, 666 : 103-24, 2010.
- Carlson R., Taffs R., Davison W., Stewart P. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *J.Biomat. Sci.*, 19: 1035-46, 2008.
- Carrilo-Muñoz A.J., Tur C., Torres J. *In-vitro* antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole, and miconazole against yeasts of the *Candida* genus. *J Antimicrob Chemother*, 37: 815-9, 1996.
- Casal M., Linares M.J. The comparison of six media for chlamydospore production by *Candida albicans*. *Mycopathologia.*, 76: 125-8, 1981.

- Casentini-Borocz D., Bringman T. Enzyme immunoconjugates utilizing glucose-oxidase and myeloperoxidase are cytotoxic to *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 875-880, 1990.
- Cauda R. Candidaemia in patients with an inserted medical device. *Drugs*, 69: 33-8, 2009.
- Challacombe S.J., Naglik J.R. The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv. Dent. Res.*, 19: 29-35, 2006.
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.*, 183: 5385-94, 2001.
- Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.*, 80: 903-908, 2001.
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101: 5048-5052, 2004.
- Clancy C.J., Nguyen M.L., Cheng S., Huang H., Fan G., Jaber R.A., Wingard J.R., Cline C., Nguyen M.H. Immunoglobulin G responses to a panel of *Candida albicans* antigens as accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 1647-54, 2008.
- Collis J.J., Embery G. Adsorption of glycoaminoglycans to commercially pure titanium. *Biomaterials*, 13: 548-52, 1992.
- Courtois P., Vanden Abbeele A., Amrani N., Pourtois M. Streptococcus sanguis survival rates in the presence of lactoperoxidase-produced OSCN- and OI-. *Med. Sci. Res.*, 23: 195-197, 1995.
- Deveau A., Hogan D. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Meth Mol. Biol.*, 692: 219-33, 2011.
- Dezelic T., Guggenheim B., Schmidlin P. Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral health Prev. Dent.*, 7: 47-53, 2009.
- Dougherty S. Pathobiology of infection in prosthetic devices. *Infect. Dis.*, 10:1102 – 1117, 1988.
- Douglas L.J., Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev. Iberoam. Micol.*, 19:139-43, 2002.

- Duan Y., Dinehart K., Hickey J., Panicucci R., Kesser J., Gottardi W. Properties of an enzyme-based low-level iodine disinfectant. *J. Hosp. Infect.* 43: 219-229, 1999.
- Ellepola A.N.B., Samaranayake L.P. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 11: 172 – 198, 2000.
- Fadel M., Courtois P. Inhibitory effect of lactoperoxidase-generated hypothiocyanite upon black pigmented anaerobe growth. *Int. J. Mol. Med.*, 8:59-62, 2001.
- Falcone M., Barzaghi N., Carosi G., Grossi P., Minoli L.; Ravasio V., Rizzi M., Suter F., Utili R., Viscoli C., Venditti M., Italian Study on Endocarditis. *Candida* infective endocarditis: report of 15 cases from a prospective multicenter study. *Med.*, 88 : 160-68, 2009.
- Fanello S., Bouchara J-P., Sauteron M., Parot E., Moalic E., Le Flohic A.-M., Hitoto H., Delbos V., Branger B. Facteurs favorisant la colonisation et l'infection buccale à levures chez 256 patients d'un service de gériatrie. *La Revue de Gériatrie*, 31: 149–159, 2006 a.
- Fanello S., Bouchara J-P., Sauteron M., Delbos V., Parot E., Marot-Leblond A., Moalic E., Le Flohic A.-M., Branger B. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J. Med. Microbiol.*, 55: 223-228, 2006 b.
- Feng Z., Jiang B., Chandra J., Ghannoum M., Nelson S., Weinberg A. Human β -defensins: differential activity against *Candida* species and regulation by *Candida albicans*. *J. Dent. Res.*, 84: 445-50, 2005.
- Figueiral M., Azul A., Pinto E., Fonseca P., Branco F., Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors- a large cohort. *J. Oral Rehabil.*, 34: 448–55, 2007.
- Filloux A., Vallet I. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine/sciences*, 19: 77-83, 2003.
- Finkel J., Mitchell A. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Rev.-Microbio.*, 9: 109-18, 2011.
- Food and Drug Administration. Potassium iodide as a thyroid blocking agent in radiation emergencies. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4825fnl>, 2001.
- Germaine G.R., Tellefson L.M., Johnson G.L. Proteolytic activity of *Candida albicans*: action on human salivary proteins. *Infect Immun.*, 22: 861-6, 1978.

- Giammanco G.M., Pizzo G., Pecorella S., Distefano S., Pecoraro V., Milici M.E. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol. Immunol.*, 17: 89-94, 2002.
- Gonzales-Parraga P., Hernandez J., Arguelles J. Role of antioxidant enzymatic defenses against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast*, 20: 1161-1169, 2003.
- Goon A.T., Isaksson M., Zimerson E., Goh C.L., Bruze M. Contact allergy to (meth)acrylates in the dental series in southern Sweden: simultaneous positive patch test reaction patterns and possible screening allergens. *Contact Dermatitis*, 55: 219-26, 2006.
- Gow N.A., Gooday G.W. Cytological aspects of dimorphism in *Candida albicans* *Crit. Rev. Microbiol.*, 15 : 73-8, 1987.
- Graybill J.R., Sharkey P.K. Fungal infections and their management. *Br.J.Clin.Pract.Suppl.* 71: 23-31, 1990.
- Grimoud A., Lodter J., Marty N., Andrieu S., Bocquet H., Linas M., Rumeau M., Cazard J. Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. *Oral Dis.*, 11: 163-69, 2005.
- Hägg U., Kaveewatcharanont P., Samaranayake Y., Samaranayake L. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. *Eur. J.Ortho.*, 26, 623-29, 2004.
- Hagihara Y., Kaminishi H., Cho T., Tanaka M., Kaita H. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. *Arch. Oral Biol.*, 33: 617-9, 1988.
- Hannula J., Saarela M., Jousimies-Somer H., Takala A., Syrjänen R., Könönen E., Asikainen S. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. *Oral Microbiol. Immunol.*, 14:176-82, 1999.
- Hawser S., Baillie G., Douglas L. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J.Med. Microbiol.*, 47: 253-6, 1998.
- Hibino K., Wong R., Hägg, U, Samaranayake L. The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. *International J. of paediatric dentistry*, 19(5): 301-308, 2009.

- Hilmioglu S., Ilkit M., Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis.*, *Mycoses*, 50: 282-5, 2007.
- Horgan M.M., Powderly W.G. Oral fungal infections. in Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A., *Clinical mycology*, Churchill Livingstone (Philadelphia, US), 2003.
- Horio T., Danno K., Okamoto H., Miyachi Y., Furukawa F., Imamura S. Treatment of erythematous dermatoses with potassium iodide. *J. Dermatol.* 8: 499-505, 1981.
- Ihalin R., Tenovu J., Pöllänen M.. Determination of safety levels of horseradish peroxidase-iodide system to human gingival keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Cell. Biol. Toxicol.* 19 : 339-353, 2003.
- Jewtuchowicz V.M., Brusca M.I., Mujica M.T., Gliosca L.A., Finquelievich J.L., Lovannitti C.A., Rosa A.C. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontol. Latinoam.*, 20 : 17-22, 2007.
- Jonard L., Banh L., Pressac M., Just J., Bahua M. Les défensines en physiopathologie humaine. *Immunoanalyse & biologie spécialisée*, 21 : 342-347, 2006.
- Kavanagh K., Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J.Pharm.Pharmacol.*, 56: 285-289, 2004.
- Kane K.R., Deheer D.H., Owens S.R., Beed J.D., Swanson A.B. Adsorption of collagenase to particulate titanium: A possible mechanism for collagenase localization in periprosthetic tissue. *J. Appl. Biomater.*, 5: 353-60, 1994.
- Kania R., Lamers G., van de Laar N., Dijkhuizen M., Lagendijk E., Huy P., Herman P., Hiemsta P., Grote J., Frijns J., Bloemberg G. Biofilms on tracheoesophageal voice prostheses: a confocal laser scanning microscopy demonstration of mixed bacterial and yeast biofilm. *Biofouling*, 26: 519-26, 2010.
- Kirkpatrick W., Revankar S., Mcatee R., Lopez-Ribot J., Fothergill A., McCarthy D., Sanche S., Cantu R., Rinaldi M., Patterson T. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 3007-3012, 1998.
- Koch G., Edlund K., Hoogendoorn H. Lactoperoxidase in the prevention of plaque accumulation, gingivitis and dental caries (II). *Odont. Rev.*, 24: 367-372, 1973.

- Kohavi D., Klinger A., Steinberg D., Mann E., Sela M.N. α -Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: An in vivo study. *Biomaterials*, 18: 903-6, 1997.
- Kuhn D., Chandra J., Mukherjee P., Ghannoum M. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.*, 70: 878-888, 2002.
- Lamey P.J., Darwazeh A.M., Muirhead J., Rennie J.S., Samaranayake L.P., MacFarlane T.W. Chronic hyperplastic candidosis and secretor status. *J. Oral Pathol. Med.*, 20: 64-7, 1991.
- Lenander-Lumikari M., Tenovou J., Mikola H. Effects of a lactoperoxidase system – containing toothpaste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva. *Caries Res.*, 27: 285-91, 1993.
- Leonhardt A., Renvert S., Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin. Oral. Impl. Res.*, 10: 339 – 345, 1999.
- Levitz S.M., Diamond R.D. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J. Infect. Dis.*, 152: 938-45, 1985.
- Lyon J.P., da Costa S.C., Totti V.M., Munhoz M.F., de Resende M.A. Predisposing conditions for *Candida spp.* carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can. J. Microbiol.*, 52: 462-7, 2006.
- Majerus P., Courtois P. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J. Biol. Buccale*, 20: 241–245, 1992.
- Manuila A., Hureau J., Polonovski J. Dictionnaire français de médecine et de biologie. Masson, Paris, 1970.
- Marot-Leblond A., Beucher B., David S., Nail-Billaud S., Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. *J. Clin. Microbiol.*, 44: 138-42, 2006.
- Marsh P.D., Martin M. Oral microbiology. Churchill Livingstone, London, 2009.
- Marsh P.D., Percival R.S., Challacombe S.J.; The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J. Dent. Res.*, 71:1374-81., 1992.
- Mattos B., Soussa A., Magalhães M., André M. Brito E., Dias R. *Candida albicans* in patients with oronasal communication and obturator prostheses. *Braz. Dent. J.*, 20 (4): 336-340, 2009.

- Merritt K., Hitchins V., Neale A. Tissue colonization from implantable biomaterials with low numbers of bacteria. *J. Biomed. Mater. Res.*, 44: 261-265, 1999.
- Molgatini S., González M., Rosa A., Negroni M. Oral microbiota and implant type membranes. *J.Oral.Implantol.*, 24: 38-43, 1998.
- Mukherjee P.K., Zhou G., Munyon R., Ghannoum M.A. *Candida biofilm*: a well-designed protected environment. *Med. Mycol.*, 43: 191-208, 2005.
- Nakagawa Y., Koide K., Watanabe K., Morita Y., Mizuguchi I., Akashi T. The expression of the pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene in response to hydrogen peroxide. *Microbiol.Immunol.*, 43: 645-651, 1999.
- Nasution O., Srinivasa K., Kim M., Kim Y.J., Kim W., Jeong W., Choi W. Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.*, 7: 2008-11, 2008.
- Nikawa H., Nishimura H., Hamada T., Kumagai H., Samaranayake L. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopath.*, 139, 87-91, 1997.
- Nikawa H., Nishimura H., Makihira S., Hamada T., Sadamori S., Samaranayake L. Effects of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*, 43: 139-43, 2000.
- Nobile C., Mitchell A. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell. Microbio.*, 8 : 1382-91, 2006.
- Odds F.C. Problems in the laboratory assessment of antifungal activity. *Postgrad. Med. J.*, 55: 677-80, 1979.
- Odds F.C. *Candida* and Candidosis, University Park Press, Baltimore, 1979.
- Odds F.C., Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1923-29, 1994.
- Panzeri H., Lara E., Paranhos H., Lovato da Silva C., de Souza R.F., de Souza Gugelmin M.C., Tirapelli C., Cruz P., de Andrade I. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. *Gerodont.*, 26: 26-33, 2009.
- Pecquet C. Allergie à l'iode. *Ann.Dermatol.Venereol.* 130 : 795-798, 2003.
- Percival S., Bowler P., Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *Int. Wound J.*, 4: 186-91, 2007.

- Pereira-Cenci T., Del Bel Cury A.A., Crielaard W., Ten Cate J.M. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J. Appl. Oral Sci.*, 16: 86-94, 2008.
- Perry J.A., Cvitkovitch D.G., Lévesque C.M. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 299:261-6, 2009.
- Perry J.D., Freydière A.M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl. Microbiol.*, 103: 2046-55, 2007.
- Pinto A., Halliday C., Zahra M., van Hal S., Olma T., Maszewska K., Iredell J.R., Meyer W., Chen S.C. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One*. 6:e25712, 2011.
- Pitten F.-A., Werner H.-P., Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J..Hosp.Inf.*, 55: 108-115, 2003.
- Prasad R., Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242: 215-248, 2005.
- Prescott, Harley, Klein. *Microbiology*. Brown Publishers (USA), 1993. Traduction française: De Boeck Université (Bruxelles, Belgique), 1995.
- Pusateri C., Monaco E., Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch. Oral Biol.*, 54: 588-94, 2009.
- Pye A., Lockhart D., Dawson M., Murray C. & Smith A. A review of dental implants and infection. *J. Hosp. Inf.*, 72 (2): 104-110, 2009.
- Radford D., Challacombe S., Walter J. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit. Rev. Oral Biol.Med.*,10: 99-116, 1999.
- Ramage G., Martinez J.P., López-Ribot J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.*, 6: 979-986, 2006.
- Ramage G., Wickes B.L., López-Ribot J.L. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. *Rev. Iberoam. Micol.* , 25: 37-40, 2008.

- Revankar S.G., Graybill J.R. Antifungal therapy in Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A., Clinical mycology, Churchill Livingstone (Philadelphia, US), 2003.
- Rodger G., Taylor R., Pearson G., Verran J. In vitro colonization of an experimental silicone by *Candida albicans*. J. Biomed. Mat. Res., 92: 226-35, 2010.
- Rozkiewicz D., Daniluk T., Zaremba M.L., Cylwik-Rokicka D., Stokowska W., Pawińska M., Dabrowska E., Marczuk-Kolada G., Waszkiel D. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. Adv. Med. Sci., 51:187-90, 2006.
- Samaranayake L. Essential microbiology for dentistry. Churchill Livingstone (Edinburgh, U.K.), 2002.
- Samaranayake L., Hughes A., MacFarlane T.W. The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose. J. Med. Microbiol., 17:13-22, 1984.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Pow E.H., Beena V.T., Yeung K.W. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. J. Clin. Microbiol., 39: 3296-3302, 2001.
- Samaranayake Y., Ye J., Yau J., Cheung B., Samaranayake L. *In vitro* method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. J. Clin. Microbiol., 2: 818-25, 2005.
- Scully C., El-Kabir M., Samaranayake L.P. *Candida* and oral candidosis: a review. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 5: 125-57, 1994.
- Seneviratne C.J., Wang Y., Jin L., Abiko Y., Samaranayake L.P. *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. Proteomics, 14: 2936-47, 2008.
- Shibli J.A., Martins M.C., Lotufo R.F., Marcantonio E. Jr. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 18: 383-90, 2003.
- Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature 417(6888): 552-5, 2002.
- Siqueira J.F. Jr., Sen B.H. Fungi in endodontic infections. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 97: 632-41, 2004.
- Sissons C. Artificial dental plaque biofilm model systems. Adv. Dent. Res., 11: 110-26, 1997.

- Soll D.R., Langtimm C.J., McDowell J., Hicks J., Galask R. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 1611-22, 1987.
- Soysa N.S., Samaranyake L.P., Ellepola A.N. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis - a brief overview. *Oral Dis.*, 14: 138-43, 2008.
- Steinberg D., Klinger A., Kohavi D., Sela M.N. Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials*, 16: 1339-1343, 1995.
- Takegawa K., Mitsumori K., Onodera H., Yasuhara K., Kitaura K., Shimo T., Takahashi M. Induction of squamous cell carcinomas in the salivary glands of rats by potassium iodide. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 105-109, 1998.
- Tanner A., Stillman N., Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin. Infect. Dis.*, 16: 304-9, 1993.
- Taschdjian C.L., Burchall J.J., Kozinn P.J., Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA J. Dis. Child.*, 99: 212-5, 1960.
- Tenovuo J. The peroxidase system in human secretions. *in* Pruitt K.M., Tenovuo S. Eds, The lactoperoxidase system – chemistry and biological significance. Marcel Dekkers (New York, NY, USA), 1985.
- Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral diseases*, 8: 23-9, 2002.
- Tenovuo J. Antimicrobial agents in saliva - protection for the whole body. *J. Dent. Res.* 81, 807-809, 2002.
- Tenovuo J., Larjava H. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of [3H]-thymidine by human gingival fibroblasts cultured in vitro. *Arch. Oral Biol.*, 29: 445-451, 1984.
- Thom S., Blackwell C., MacCallum C., Weir D., Brettle R., Kinane D., Wray D. Non-secretion of blood group antigens and susceptibility to infection by *Candida* species. *FEMS Microbiol Immunol.*, 1: 401-5, 1989.

- Thomas E.L., Bozeman P.M., Learn D.B. Lactoperoxidase: structure and catalytic properties. *in* Everse J., Everse K.E., Grisham M.B., Eds. Peroxidases in chemistry and biology. CRC Press (Boca Raton, FL, USA), 123-142, 1991.
- Thomas E.L., Jefferson M.M., Joyner R.E., Cook G.S., King C.C. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantification in human mixed saliva. *J. Dent. Res.*, 73: 544-555, 1994.
- Thurnheer T., Gmür R.; Shapiro S., Guggenheim B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *App. Envir. Microbio.*, 69: 1702-09, 2003.
- Tombes M.B., Gallucci B. The effects of hydrogen peroxide rinses on the normal oral mucosa. *Nurs. Res.*, 42: 332-7, 1993.
- Tournay C., Majerus P., Pourtois M., Mogueilevsky N., Bollen A. Candidicidal activity of the human recombinant myeloperoxidase system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 142-143, 1993.
- Utili R., Durante-Mangoni E., Tripodi M. Infection of intravascular prostheses: how to treat other than surgery. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 30: 42-50, 2007.
- Vanden Abbeele A. Mesure, fonctions et utilisation des peroxydases dans la cavité buccale. Thèse, ULB, 1995.
- Vanden Abbeele A., De Meel H., Ahariz M., Perraudin J.-P., Beyer I., Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*, 25: 222-228, 2008.
- Vandenbussche M., Swinne D. Yeasts oral carriage in denture wearers. *Mykosen*, 27:431-435, 1984.
- Van Steenberghe D., Van den Eynde E., Jacobs R., Quirynen M. Effects of a lactoperoxidase containing toothpaste in radiation-induced xerostomia. *Int. Dental J.*, 44: 133-138, 1994.
- Verweij P.E., Breuker I.M., Rijs A.J., Meis J.F. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J. Clin. Pathol.*, 52: 271-3, 1999.
- Vorhees C.V., Butcher R.E., Brunner R.L. Developmental toxicity and psychotoxicity of potassium iodide in rats: a case for the inclusion of behaviour in toxicological assessment. *Food Chem. Toxicol.* 22: 963-970, 1984.
- Vuddakul V., McCormack J., Seow W., Thong Y. Inhibitory effects of human neutrophil granules and oxygen radicals on adherence of *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.*, 29: 181-187, 1989.

- Wadlin J.K., Hanko G., Stewart R., Pape J., Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1967-70, 1999.
- Waalivara B., Aronsson B.O., Rodahi M., Lausmaa J., Tengvall P. Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials*, 15: 827-34, 1994.
- Webb B.C., Willcox M.D., Thomas C.J., Harty D.W., Knox K.W. The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida species*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 10: 334-41, 1995.
- Weindl G., Wagener J., Schaller M. Epithelial cells and innate antifungal defense. *J. Dent. Res.*, 89: 666-675, 2010.
- Williams D.W., Wilson M.J., Lewis M.A.O., Potts A.J.C. Identification of *Candida species* by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2476-2479, 1995.
- Williamson M.I., Samaranayake L.P., Mac Farlane T.W. A new simple method for biotyping *Candida albicans*. *Microbios.*, 51: 159-67, 1987.
- World Health Organization. Guidelines for iodine prophylaxis following nuclear accidents. Geneva, Switzerland; <http://www.who.int>, 1999.
- Xu T., Levitz S.M., Diamond R.D., Oppenheim F.G. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect. Immun.*, 59: 2549-54, 1991.
- Yamaguchi S., Kishikawa N., Ohyama K., Ohba Y., Kohno M., Masuda T., Takadate A., Nakashima K., Kuroda N. Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species. *Anal. Chim. Acta*, 665: 74-78, 2010.

VIII. Annexes

VIII. 1. Documents conçus pour les études cliniques

Accord comité d'éthique

COMITE LOCAL
D'ETHIQUE HOSPITALIER
N° d'agrégation : O.M. 007

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
C.H.U. SAINT-PIERRE
Rue Haute 322 - 1000 Bruxelles

Président :
Prof. Ph. HERMANS

Secrétaire :
Prof. E. STEVENO

Membres médecins :
Prof. Fr. DELAFOND
Dr. S. STENOIS
Dr. M. D. MYEN
Dr. G. VANDEWALLE
Prof. S. ROZENDEN
Dr. M. HADJAKI

Dr. P. GERADLE (généraliste)

Membres non médecins :
Mme Th. LOUTRE (Duméril)
Prof. J. FONTAINE (Pharmacien)

Membres infirmiers :
Mme M. CHARLIER
Mme J. M. COSTARD
Mme F. TACA

Secrétaire :
Mme L. Van Driessche
Direction Générale
Tel 02/708 42 78
Fax 02/708 41 81



Lx6/05 04-12/2862AD

Au Docteur M. Ahariz
Dentiste Stomatologie

C.H.U. Saint-Pierre

Au Professeur J. Van Reck
Chef de Service Stomatologie

C.H.U. Saint-Pierre

Bruxelles, le 14 avril 2005

Cher Confrère,

Le Comité d'Éthique du C.H.U. Saint-Pierre, en sa séance du 4 avril 2005 a examiné votre étude portant sur *une nouvelle application d'un gel buccodentaire existant déjà dans le commerce.*

Après la visite du Dr. Ahariz, Dr. Courtais et Prof. J. Van Reck et au vu de la version corrigée du document « Demande d'avis » et « formulaire de consentement éclairé » : Le Comité d'Éthique rend un avis favorable.

L'avis favorable du Comité ne signifie en rien qu'il prend la responsabilité de l'expérimentation et vous rappelle également que cette étude se réalisera sous votre responsabilité.

Le Comité d'Éthique souhaite que les études se réalisent selon la loi du 7 mai 2004 ainsi que selon les règles de « bonne pratique clinique » ou « good clinical practice » (*) appliquées depuis juillet 1991 dans la Communauté Européenne et selon les règles de l'« International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use » (I.C.H. Steering Committee du 1^{er} mai 1996) (*).

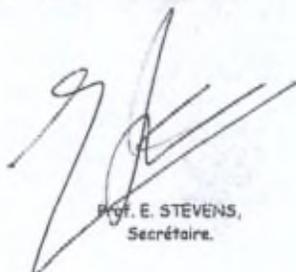
Il est bien évident que les investigateurs faisant partie du Comité d'Éthique ne participent pas au vote.

Le Comité d'Éthique souhaite également que les investigateurs veillent au respect des textes de la loi du 08.12.1992 qui traite du respect de la vie privée.

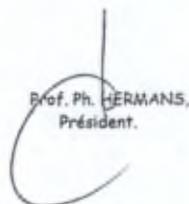
Si dans le cadre de la recherche pour laquelle vous demandez l'avis du Comité, un certain nombre d'investigations doivent être pratiquées (biologie, endoscopie,...), nous attirons votre attention sur le fait que seules les prestations de soins qui auraient été effectuées dans le cadre de la pratique courante peuvent être imputées à l'INAMI.

Une fois son protocole approuvé, l'investigateur est dorénavant tenu de compléter les documents NCR ci-joints et d'envoyer sans délai les 2 premiers exemplaires au Conseil National de l'Ordre des Médecins, Place Jamblinne de Meux, 34 à 1030 Bruxelles et de conserver le feuillet vert. Votre numéro d'inscription de demande d'avis au registre du Comité est le 05-04-12/2862

Nous vous prions d'agréer, Cher Confrère, l'expression de nos sentiments les meilleurs.



Prof. E. STEVENS,
Secrétaire.



Prof. Ph. HERMANS,
Président.

(*) Ces documents peuvent être consultés au Secrétariat du Comité d'Éthique.

Formulaire de consentement

Nouvelle application d'un gel buccodentaire

existant déjà dans le commerce

M. Ahariz, LSD TEL: 02 535 44 11
Assistant au Centre Hospitalier Universitaire Saint-Pierre
Responsable de la consultation de prothèse sur implants
Service de Stomatologie (Dr I. Loeb)
CHU Saint-Pierre
Boulevard de Waterloo 129, B-1000 Bruxelles

Dr Philippe Courtois TEL : 02 555 63 10
Chargé de cours à l'Université Libre de Bruxelles
Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale CP 626
Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles
Route de Lennik 808 B-1070 Bruxelles

Dr I. Loeb TEL: 02 535 44 11
Chef du Service de Stomatologie et Chirurgie maxillofaciale,
CHU Saint-Pierre
Boulevard de Waterloo 129, B-1000 Bruxelles

Les prothèses dentaires mal nettoyées peuvent favoriser certaines infections orales. Le Service de Stomatologie de l'Hôpital Saint-Pierre entreprend une étude clinique qui a pour but de montrer le bénéfice d'un gel, déjà commercialisé, pour décontaminer les prothèses amovibles supérieures colonisées par des levures. Ce gel contient un extrait de lait bovin. Certains patients recevront un gel sans principe actif. Le hasard déterminera le traitement (avec ou sans principe actif). A chaque consultation (4 à 5 consultations à environ une semaine d'intervalle), un frottis de la muqueuse du palais et de la surface de la prothèse seront réalisés. Ces frottis non douloureux n'entraîneront aucun désagrément et vous sensibiliseront à l'importance de l'hygiène des prothèses. Les patients qui prennent des médicaments contre les champignons et les levures, sont exclus de cette étude.

Cette étude ne présente aucun risque mais comme pour tout traitement, vous devez informer votre dentiste de tous les symptômes accompagnateurs ou des troubles que vous pourriez observer. Les données de cette étude resteront confidentielles. Aucun frais ne vous sera imputé pour cette étude, ni à un service de santé quel qu'il soit.

L'étude a reçu l'accord du comité local d'éthique de l'Hôpital Saint-Pierre. Vous êtes libre de participer ou non. Bien que votre participation soit souhaitée tout au long de cette étude, vous pouvez vous retirer à tout moment de cette étude sans que cela n'affecte votre traitement.

J'ai pris connaissance de toutes informations stipulées dans la lettre d'information. Les objectifs, risques et bénéfices de cette étude m'ont été expliqués par le responsable de l'étude ou l'un de ses collaborateurs. J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que j'estimais nécessaires de poser. Si j'ai des problèmes ou d'autres questions, je contacterai le dentiste M. M. Ahariz ou un membre de son équipe.

J'accepte de participer librement à cette étude sur base des informations qui m'ont été données oralement et de façon écrite.

J'ai le droit de ne pas accepter de rentrer dans cette étude ou de me retirer à tout moment et ce, quelles que soient mes raisons. En aucun cas, il ne me sera porté préjudice et la qualité des soins qui me sont apportés actuellement ou dans l'avenir n'en sera pas affectée. J'ai compris qu'on m'assure le maintien de mes droits conformément à la Directive Européenne sur la Protection des Données Personnelles (95/46/EC) et aux autres lois nationales et internationales sur la protection des données personnelles. J'ai été informé sur mon droit d'accéder et de faire corriger, si nécessaire, mes données personnelles et médicales. Je sais qu'en aucun cas, je ne pourrai prétendre à un avantage de quelque nature que ce soit.

Je reconnais avoir reçu une copie de cet original signé. J'ai signé ce document avant ma première visite d'inclusion dans l'étude.

Je soussigné(e): _____ (nom et prénom)

donne librement mon consentement et accepte de participer à cet essai clinique.

Signature du volontaire: _____

Date: _____ (jour, mois, année)

Adresse du volontaire:

Rue _____ N° _____

Commune _____ Code postal _____

Tél. privé : _____ Tél. (autre): _____

e-mail: _____

Directives

Nouvelle application d'un gel buccodentaire existant déjà dans le commerce

Le Comité d'Ethique Hospitalier du CHU Saint-Pierre a donné son accord pour la réalisation de cette étude en sa séance du 4/4/2005.

Première consultation : accueil et sélection des patients

- sélectionner les patients qui souhaitent remplacer leur prothèse supérieure ou qui acceptent de revenir 4 semaines d'affilée,
 - o sans problème aigu
 - o sans allergie à l'iode
 - o sans prise d'antibiotiques
 - o sans prise d'antimycosiques
- remettre au patient 2 exemplaires du formulaire de consentement éclairé
- compléter une fiche clinique par patient volontaire
 - o nom, prénom, date de naissance, n° dossier
 - o prise de médicaments anti-*Candida* ?
 - o état général ?
- examen de la bouche
- écouvillonnage de la prothèse et du palais
- information du patient et prise du rendez-vous suivant

Deuxième consultation:

- sélection des patients présentant du *Candida* sur leur prothèse
- reprise du formulaire de consentement signé
- écouvillonnage de la prothèse et du palais
- distribution des tubes de gel et d'une petite poubelle pour les récupérer après usage
- instructions aux patients:
 - o continuation des habitudes d'hygiène et de nettoyage de la prothèse
 - o pour l'emploi du gel à mettre sur l'intrados une fois par jour comme indiqué sur les deux photographies ci-dessous
- rappel du rendez-vous suivant

Troisième consultation:

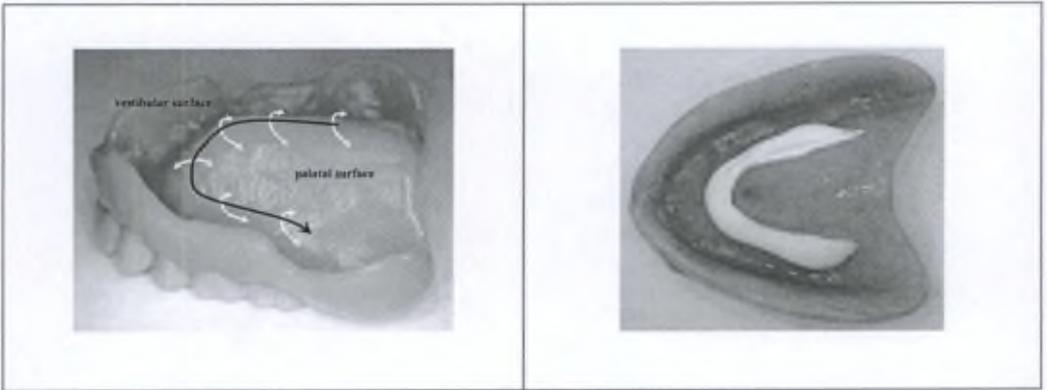
- reprise des tubes de gel pour être repesés
- écouvillonnage de la prothèse et du palais
- distribution des tubes de gel et d'une petite poubelle pour les récupérer après usage
- instructions aux patients:
 - o continuation des habitudes d'hygiène et de nettoyage de la prothèse
 - o pour l'emploi du gel à mettre sur l'intrados une fois par jour
- rappel du rendez-vous suivant

Quatrième et dernière consultation:

- reprise des tubes de gel pour être repesés
- écouvillonnage de la face supérieure de l'intrados de la prothèse en place et de la surface de la muqueuse palatine recouverte par la prothèse

Application du gel :

Application locale sur l'intrados de la prothèse amovible supérieure le long de l'arcade dentaire une fois par jour (le matin si possible) après avoir nettoyé la prothèse. Le patient garde ses habitudes pour l'hygiène buccale et le nettoyage de la prothèse. Après application du gel, il faut conserver l'emballage (tube) dans la petite poubelle qui sera distribuée.



Conditions de conservation du gel

A température ambiante (ne pas déposer sur un radiateur ni exposer au soleil).

Fiche clinique individuelle

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

A*	B*	C*	rien*	Consultation 1	Consultation 2	Consultation 3	Consultation 4
Date							
Anamnèse du patient							
prise de médicaments anti- <i>Candida</i> ?							
antécédents				absence d'allergie à l'iode			
état général ?				rien à signaler			
hygiène buccodentaire ?							
Nettoyage de la prothèse supérieure ?							
plainte(s) éventuelle(s)							
Examen du patient				pas de problèmes aigus, pas de prise d'antibiotiques depuis minimum 1 mois			
nombre de dents supérieures							
nombre de dents inférieures							
description de la prothèse supérieure*				partielle en résine : 1,1 partielle squelettée : 1,2 complète en résine : 2			
usure de la prothèse supérieure*				pas d'usure (<5 ans) : 1 peu d'usure (5-10 ans) : 2 usée (> 10 ans) : 3			
stabilité de la prothèse supérieure*				stable : 1 peu stable (bouge) : 2 instable (tombe) : 3			
prothèse inférieure : ?				absence : 0 partielle en résine : 1,1 partielle squelettée : 1,2 complète en résine : 2			
état de la muqueuse palatine : en bon état - érythémateuse - ...							

* Entourer le code

Contrôle du suivi

Nom :

Prénom :

A*	B*	C*	rien*	Consultation 1	Consultation 2	Consultation 3	Consultation 4
Date							
Consentement éclairé					signature ¹		
Critères inclusion/exclusion				critères cliniques ²	critère biologique ³		
Anamnèse							
Examen							
Médication							
Vérifier la prise du gel							
Effets indésirables							
Ecouvillonnage prothèse							
Ecouvillonnage palais							
Remise du gel							

¹ information et remise de deux formulaires de consentement éclairé à la première séance ; signature et reprise d'un exemplaire du formulaire à la deuxième séance

² inclusion / exclusion selon les critères cliniques

³ exclusion si absence de levures dans les échantillons de la 1^{ère} consultation

⁴ l'étude démarre effectivement à la deuxième consultation

Données mycologiques

Nom :

Prénom :

N° identification :

	Consultation 1	Consultation 2	Consultation 3	Consultation 4
Pesée du gel				
Ecouvillonnage prothèse				
Ecouvillonnage palais				
Identification de <i>Candida</i> sur Chromagar™				
Identification de <i>Candida</i> sur RAT™				
Test de filamentation				
Identification de <i>Candida</i> sur API™				

VIII. 2. Articles publiés

Cette annexe présente les différents articles et communications réalisées dans le cadre de ce travail.

articles publiés dans des revues internationales avec comité de lecture

1. *Candida albicans* biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating. Ahariz M., Courtois Ph. Medical Devices: Evidence and Research, 3: 1-8, 2010.
2. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite. Ahariz M., Courtois Ph. Clinical, cosmetic and investigational dentistry, 2: 1-10, 2010.
3. *Candida* et prothèses dentaires. Ahariz M., Loeb I., Courtois Ph. Revue de Stomatologie et de Chirurgie maxillo-faciale, 111: 74-78, 2010.
4. Denture contamination by yeasts in the elderly. Vanden Abbeele A., de Meel H., Ahariz M., Perraudin J.-P., Beyer I., Courtois Ph.. Gerodontology, 25:222-8, 2008.
5. Adsorption of peroxidase on titanium surfaces. A pilot study. Ahariz M., Mouhyi J., Louette P., Van Reck J., Malevez Ch., Courtois Ph. The Journal of Biomedical Materials Research, 52: 567-571, 2000.

communications avec abstract

1. *Candida albicans* inhibition by thiocyanate / H₂O₂ / peroxidase system in oral gel. Ahariz M., Dewèvre H., Perraudin J.-P., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Leuven, 2007. Abstract in Fundamental & Clinical Pharmacology, 22, 227, 2008.
2. Lactoperoxidase-precoated oral biomaterials prevent *Candida* biofilm formation. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Brussels, 2006. Abstract in Fundamental & Clinical Pharmacology, 22, 223, 2008.
3. *Candida albicans* adhesion to titanium powder: modulation by lactoperoxidase systems. Ahariz M., Courtois P. 2nd Trends in medical mycology, Berlin, 2005. Abstract in mycoses, 48: 2, 70, 2005.
4. Adherence of *Candida albicans* ATCC 10231 to titanium. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology Brussels, 2005. Abstract in Plügers Arch. Eur. J. Physiol., 450: R6, 16, 2005.
5. Effect of saliva-mimicking oral care compounds upon *Candida albicans* ATCC 10231. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Leuven, 2004. Abstract in Plügers Arch. Eur. J. Physiol., 449: R11, 33, 2005.
6. Oral mucosa colonization by *Candida sp.* and complete denture. Ahariz M., Courtois P. Belgian Society of Fundamental and Clinical Physiology and Pharmacology, Gent, 2004. Abstract in Plügers Arch. Eur. J. Physiol., 448: R7, 17, 2004.

Candida albicans biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating

Mohamed Ahariz¹
Philippe Courtois^{1,2}

¹Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, ²UER de Biologie Médicale, Haute Ecole Francisco Ferrer, Brussels, Belgium

Abstract: The present study aimed to document *Candida albicans* biofilm development on titanium and its modulation by a peroxidase-precoated material which can generate antimicrobials, such as hypiodite or hypothiocyanite, from hydrogen peroxide, iodide, or thiocyanate. For this purpose, titanium (powder or foil) was suspended in Sabouraud liquid medium inoculated with *C. albicans* ATCC10231. After continuous stirring for 2–21 days at room temperature, the supernatant was monitored by turbidimetry at 600 nm and titanium washed three times in sterile Sabouraud broth. Using the tetrazolium salt MTT-formazan assay, the titanium-adherent fungal biomass was measured as $7.50 \pm 0.60 \times 10^6$ blastoconidia per gram of titanium powder ($n = 30$) and $0.50 \pm 0.04 \times 10^6$ blastoconidia per cm^2 of titanium foil ($n = 12$). The presence of yeast on the surface of titanium was confirmed by microscopy both on fresh preparations and after calcofluor white staining. However, in the presence of peroxidase systems (lactoperoxidase with substrates such as hydrogen peroxide donor, iodide, or thiocyanate), *Candida* growth in both planktonic and attached phases appeared to be inhibited. Moreover, this study demonstrates the possible partition of peroxidase systems between titanium material (peroxidase-precoated) and liquid environment (containing peroxidase substrates) to limit *C. albicans* biofilm formation.

Keywords: adhesion, material, oral, yeast

Introduction

Yeasts can colonize titanium surfaces even after implantation. Because yeasts form biofilms on titanium surfaces, they can become the source of device-related infections with subsequent morbidity and occasionally death of the patient, all bearing high costs. Yeast colonization is frequently found in catheters and indwelling devices in cancer patients, for whom parenteral nutrition and immunosuppression are aggravating factors.^{1–4} Fungal biofilms are difficult to treat on account of their increased resistance to antimicrobial agents. This is the reason why fungemia associated with catheterization or prosthetic devices should prompt the removal of these implanted materials, because antifungal drug treatment remains an uncertain alternative.^{5,6}

Prophylactic antibiotic therapy to prevent bacterial device-associated infections occasionally leads to increased mycotic complications.⁴ In dentistry, *Candida* species and periodontal pathogens have been isolated around titanium implants.^{7,8} Titanium-coated silicone was thought to prevent *Candida* biofilm formation on voice prostheses by increasing the smoothness of the material surface.⁹ Titanium material does not possess antifungal properties by itself, but TiO_2 can act as a photocatalyst for the decomposition of organic compounds under ultraviolet light, thereby reducing the viability of *Candida albicans*.^{10,11} Bioactive coating, used as an osseointegration

Correspondence: Philippe Courtois
Laboratory of Experimental Hormonology (CP 626), Université Libre de Bruxelles (ULB), Route de Lennik 808, B-1070 Brussels, Belgium
Tel +32 2 555 6310
Fax +32 2 555 4219
Email philippe.courtois@ulb.ac.be

facilitator, is another option for controlling biofilm formation. In order to reduce bacterial and fungal infections, some groups have proposed the pre-coating of orthopedic devices with antimicrobial agents (chlorhexidine/chloroxylenol).¹² However, bioactive protein coating is not ideal for *in vivo* use because it can induce adverse immunologic reactions, yet remains an interesting area for studying biofilms *in vitro*. Adsorption of lactoperoxidase (LP) onto titanium surfaces, which has antimicrobial properties similar to those of oral peroxidase, has already been described.¹³ LP produces hypothiocyanite (OSCN⁻) and hypothiocyanous acid (HOSCN) compounds from thiocyanate (SCN⁻) in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂). *In vitro*, iodide (I⁻) has also been used as substrate, because it is oxidized into hypoiodite (OI⁻) or hypoiodous acid (OIH) by peroxidase activity.¹⁴

Nevertheless, attempts to understand interface biology better and to improve material surface treatment need a model of biofilm on titanium pieces that are easy to manipulate in the laboratory. Few studies have developed a titanium model in order to investigate procedures for limiting yeast adherence and biofilm formation.^{15,16} The present study aimed at demonstrating and quantifying both *C. albicans* adherence to titanium (powder and foil) and its modulation in the presence of peroxidase systems.

Materials and methods

Materials

Candida adherence to titanium (powder or foil) was evaluated in comparison with its adherence to other materials, such as acrylic resins (hard or soft) and polystyrene, which are commonly used oral biomaterials and laboratory assay tube manufacture materials, respectively. Aliquots (0.5 g) of titanium powder (Alfa Aesar®, Karlsruhe, Germany; 99.5% purity, -325 mesh) were transferred into sterile polystyrene cell culture tubes (BD Falcon®, Franklin Lakes, NJ; size 125 × 16 mm, round bottom). Titanium pieces were cut from native foil (Advent®, Oxford; 99.6% purity; thickness 25 µm, size 25 mm × 5 mm). As previously described,¹³ each piece was weighed and the total surface was calculated using the following algorithm: $S = 2 \{ (m/\rho) + h(L + I) \}$ where S = total surface (mm²), m = foil mass (mg), ρ = volumic mass (4.544 mg/mm³), h = foil thickness (0.025 mm), L = foil length (mm), I = foil width (mm). Total surface averaged 246 ± 4 mm² ($n = 16$) with a variation coefficient of 6.5%.

Two different resins for dentures (Vertex soft® and Vertex Rapid Simplified®; Vertex Dental, Zeist, Netherlands) were investigated with and without varnishing (Palaseal®; Heraeus

Kulzer, Wehrheim, Germany). Acrylic resin pieces (thickness -2 mm, size 25 mm × 5 mm) were processed according to manufacturer's instructions. The mass of each resin piece averaged 222 ± 19 mg (\pm SD, $n = 96$) with a coefficient of variation of 8.6%.

Cultures of *Candida albicans*

C. albicans ATCC10231 (Culti-Loops®, Oxoid®, Basingstoke, UK) was grown at 37°C on Sabouraud-gentamicin-chloramphenicol agar (Becton-Dickinson®, Belgium). Yeasts were harvested from the third subculture and used to inoculate Sabouraud broth adjusted to an absorbance of 0.800 at 600 nm. The *Candida* count was conducted in the adjusted suspension after culture (37°C for two days) on Sabouraud agar of 20 µL aliquots from serial dilutions (until 10⁴-fold) in Sabouraud broth. The number of colony-forming units (CFU) in the initial suspension yielded $16 \pm 3 \times 10^6$ CFU/mL ($n = 6$).

Candida albicans adherence

Titanium powder (0.5 g) was suspended in 3.6 mL Sabouraud broth and yeast cells (0.4 mL at included concentration) were added. Negative controls consisted of titanium powder incubated in 4 mL sterile Sabouraud broth. After continuous stirring (three revolutions per minute, Stuart® SB3 rotator, Barloworld Scientific, Stone, UK) for two days at room temperature, the titanium powder was separated from the liquid medium by sedimentation (10 minutes) and washed three times with 4 mL sterile Sabouraud broth, changing the assay tube for each washing cycle. From some negative controls, after two days of incubation and removal of sterile Sabouraud, titanium powder was contaminated by 4 mL of the first supernatant from the contaminated assays in order to evaluate washing process efficiency. The *Candida* titanium contact time was then reduced to sedimentation time (10 minutes). All the supernatants were monitored by turbidimetry at 600 nm to evaluate the planktonic yeast phase. Titanium and resin foils were similarly treated. Material-adherent yeast biomass (anchored yeast phase) was evaluated by the tetrazolium salt MTT (1.7 mg/mL in 2:1 Sabouraud phosphate-buffered solution at pH 7.40) which is enzymatically reduced by viable fungi, with resultant formation of MTT-formazan absorbing at 570 nm.¹⁷ After MTT-formazan extraction with isopropanol, absorbance was immediately measured in a spectrophotometer at 570 nm. The main characteristics of the method were: molar absorption coefficient¹⁸ ϵ_{570} of $17,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, sensitivity of 0.5×10^6 blastoconidia/mL, coefficient of variation $\leq 12.0\%$, analytic

range $0.5\text{--}10 \times 10^6$ blastoconidia/mL. Figure 1 illustrates the rate of tetrazolium salt MTT reduction into formazan in the presence of a fixed number of blastoconidia as a function of the tetrazolium salt concentration.

Microscopic inspection

C. albicans adherent to titanium powder were observed using a light microscope (fresh preparation) equipped with epifluorescence (after calcofluor white staining). Yeast-contaminated titanium was examined microscopically in the presence of 1 mg/mL calcofluor white M2R stain (fluorescent brightener 28; Sigma®, St Louis, MO) known as a marker of cell wall chitin.

Lactoperoxidase adsorption on titanium

LP (Biopole®, Belgium) was dissolved in demineralized water. Pieces of titanium foil were immersed for 30 minutes at 37°C in 5 mL of a 0.8 mg/mL LP solution or in demineralized water alone (control). After incubation, the liquid phase was removed and titanium foils were washed three times

with 5 mL of demineralized water and then transferred into another tube with the last washing. This procedure was repeated five times prior to a last removal of the liquid phase.

Lactoperoxidase systems

Two different peroxidase systems were tested in this model of yeast biofilm. Firstly, a hydrogen peroxide (H_2O_2)/LP (1 U/mL)/iodide (I^- , 1.2 mM) system generating hypiodite (OI^-) and secondly a H_2O_2 /LP (1 U/mL)/thiocyanate (SCN^- , 1.2 mM) system producing hypothiocyanite (OSCN^-). H_2O_2 was enzymatically produced by glucose-oxidase (GOD, 1.3 U/ml or 0.2 U/mL) and glucose (G) present in the culture medium (115 mM).

Statistics

Data were analyzed using the GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software®, San Diego, CA). ANOVA completed by a Dunnett's or Bonferroni's post-test were performed for statistical comparisons using the same software. Mean values were expressed with their related standard error of the mean unless otherwise indicated.

Results

Candida albicans growth in planktonic phase and adhesion to tested materials

The growing yeast phase in supernatant was evaluated by measuring the 600 nm spectrophotometer absorbance ($A_{600\text{nm}}$) after different periods of incubation (2–21 days). After removal of the supernatant, the immersed materials were washed with sterile broth and the turbidity of the subsequent supernatant after sedimentation was monitored using the same method. Figure 2 illustrates the evolution of $A_{600\text{nm}}$ during the washing process of different materials (titanium powder and foil, resin foil) after a two-day incubation in a contaminated environment. When titanium powder was contaminated by a yeast liquid culture ($A_{600\text{nm}}$: 0.653 ± 0.074 , $n = 21$) just before the washing process, the sampling of the supernatant after a 10-minute sedimentation enabled the recovery of only $86.7\% \pm 2.9\%$ of the initial absorbance at 600 nm ($n = 16$). This discrepancy (-13.3%) from the theoretic value of 100% is statistically significant (one-sample t-test, $P = 0.0004$). The three subsequent washing-mixing-sedimentation cycles decreased supernatant turbidity to $7.0\% \pm 1.0\%$ of the initial value ($n = 18$) according to a one-phase exponential decay model ($y = 100 e^{-1.26x}$, $r = 0.9940$).

By contrast, when titanium powder was incubated for two days with yeast cells, the liquid-phase turbidity of the third washing in the assays still yielded $110.1\% \pm 15.0\%$ of

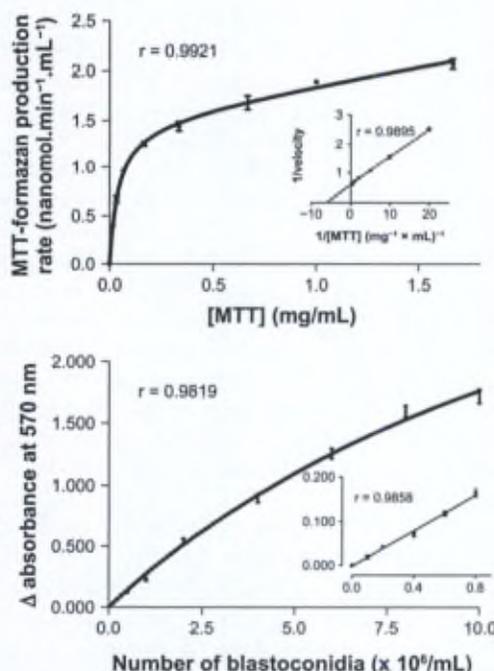


Figure 1 MTT procedure. Top: Rate of tetrazolium salt MTT reduction as a function of substrate concentration in the presence of a fixed blastoconidia number (Cartesian presentation of data with double reciprocal plot displayed in the insert). Bottom: Reduction of tetrazolium salt MTT as a function of *Candida albicans* blastoconidia numbers (data for the lowest values are presented in the insert with more appropriate coordinates).

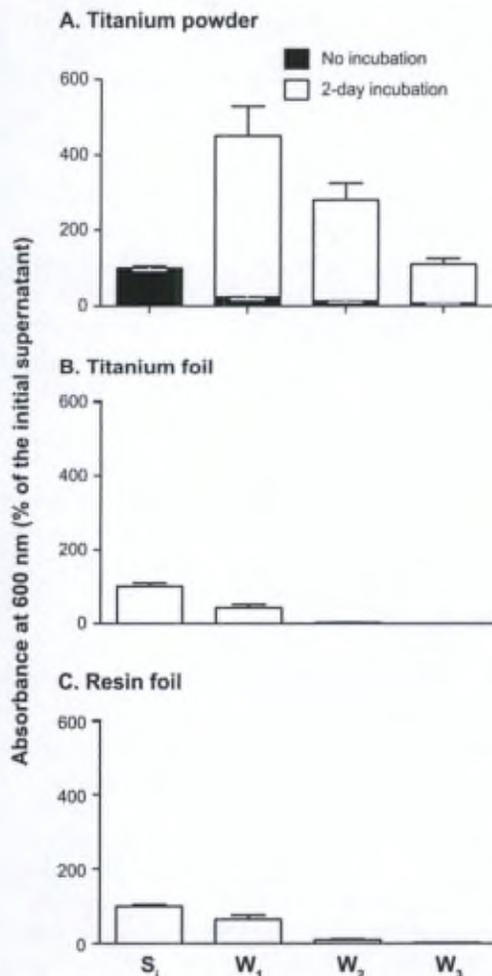


Figure 2 Washing process evaluation for different materials (titanium powder and foil, resin foil) after a two-day incubation in a contaminated environment. S₁: first supernatant after a two-day incubation; W₁₋₃: supernatant after each of the three washing steps.

Note: After incubation (two days), the immersed materials (titanium powder, titanium, and resin foil) were washed three times (W₁₋₃) with sterile broth. The turbidity of the subsequent supernatant after sedimentation was monitored at 600 nm. Full columns represent assays where titanium powder has been washed immediately after contamination by a yeast liquid culture. Data are expressed as the percentage of the absorbance (A 600 nm) measured in the supernatant after a two-day incubation.

the initial value (n = 26). Surprisingly, in the first and second washing of titanium powder, the turbidity of the broth increased to 451.2% ± 77.7% (n = 25) and 280.7% ± 44.1% (n = 30), suggesting desorption from an anchored phase; the decay of turbidity from the highest value was found to be linear (r = 0.9999). Similar experiments conducted with titanium and resin foils also showed a linear decrease of turbidity in

the liquid broth used for the washing solution (y = -49x + 97, r = 0.9948 and y = -45x + 1030, r = 0.9919, respectively) rather than a one-phase exponential decay. In the case of titanium foils, absorbance at 600 nm yielded 42.3% ± 8.6% (n = 12) and 2.0% ± 0.5% (n = 12) of the initial value in the first and second washing medium, respectively. In the case of the resin foils, it yielded 64.8% ± 11.1% (n = 24) and 9.5% ± 2.0% (n = 24) of the initial value in the first and second washing medium, respectively. When contaminated titanium powder was washed immediately, the anchored blastoconidia amount was evaluated as 1.1 ± 0.1 × 10⁶ blastoconidia per g of titanium powder.

As shown in Table 1, the MTT-formazan assay conducted in the titanium powder phase after a two-day incubation and three washings showed the presence of a residual adherent biomass equivalent to 7.5 ± 0.6 × 10⁶ blastoconidia (n = 30) per g of titanium powder instead of 494.9 ± 40.2 × 10³ blastoconidia per cm² (n = 12) on titanium foil (13.9 ± 0.2 mg, n = 12). Moreover, the presence of anchored *Candida* biofilm was also demonstrated on two different resins (hard and soft, used for denture manufacturing) and Falcon tube polystyrene wall. This amount represented 20.5 ± 3.9 × 10³/cm² (n = 12), 13.7 ± 3.2 × 10³/cm² (n = 12) and 36.7 ± 3.7 × 10³/cm² (n = 4) for soft resin, hard resin, and polystyrene assay tube wall, respectively. Microscopic examination confirmed the presence of yeast on the surface of titanium powder.

Figure 3 demonstrates different morphologic aspects of *Candida* biofilm onto titanium. Figure 3a shows one titanium grain surrounded by a layer of blastoconidia (magnification × 400) after one week incubation and three washes. After a longer incubation (three weeks), filamentous structures (hyphae and pseudohyphae) can be observed (Figure 3b). The lower panel shows titanium particles after three weeks' incubation and four washings. In this condition, some blastoconidia were still present with a trabecular structure (Figure 3c) which can be stained by the fluorescent Brightener 28, a polysaccharide structure marker for fluorescent light.

Time course of *Candida* biofilm production on titanium powder

Development of yeast biomass was monitored weekly for three weeks in the planktonic phase and in the anchored phase by the procedures mentioned above. Figure 4 (upper panel) reports the time course of the supernatant absorbance at 600 nm, reflecting the planktonic yeast mass. Turbidity reached 0.653 ± 0.074 (n = 21) after a two-day incubation at room temperature; then it slightly increased (to 0.781 ± 0.095, n = 4, on day 7; and to 0.929 ± 0.142, n = 4, on day 14). After the second week, it

Table 1 Number of blastoconidia anchored onto different materials (titanium, resin, and polystyrene)*

Material	Incubation	Adherent blastoconidia number
Powder		Number/g
Titanium	Immediate treatment	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6/g$ (n = 3)
	Two-day	$7.5 \pm 0.6 \times 10^6/g$ (n = 30)
Foil		Number/cm ²
Titanium	Two-day	$494.9 \pm 40.2 \times 10^3/cm^2$ (n = 12) (equivalent to $35.6 \pm 2.9 \times 10^6/g$)
Soft resin	Two-day	$20.5 \pm 3.9 \times 10^3/cm^2$ (n = 12)
Hard resin	Two-day	$13.7 \pm 3.2 \times 10^3/cm^2$ (n = 12)
Polystyrene	Two-day	$36.7 \pm 3.7 \times 10^3/cm^2$ (n = 4)

*Incubation was at room temperature. Material-adherent blastoconidia were evaluated by the MTT procedure. Data are expressed per mass unit for powder or per surface unit for foils.

decreased and reached 0.161 ± 0.058 (n = 4) on day 21, which is less than the values previously obtained (corresponding to $24.7\% \pm 9.3\%$ of those found on day 2 and $17.3\% \pm 6.8\%$ of those on day 14). An ANOVA test completed by a Bonferroni's multiple comparison post-test did not show any difference between days 2, 7, and 14 ($P > 0.5$); but the turbidity on day 21 was significantly decreased in comparison with values obtained earlier (ANOVA, $P = 0.0078$). The time course of the anchored yeast mass was rather different (Figure 4, lower panel), reaching steady state on day 2 (0.924 ± 0.060 , n = 30) and persisting until day 21 (0.887 ± 0.044 , n = 4). Intermediate values were 0.829 ± 0.206 (n = 4) on day 7 and 1.280 ± 0.112 (n = 4) on day 14. An ANOVA test completed by a Bonferroni's multiple comparison post-test did not show any difference between the anchored yeast mass obtained for different periods of incubation (ANOVA, $P = 0.1717$).

Modulation of *Candida* biofilm production on titanium powder by peroxidase systems

In the presence of 1.3 U/mL GOD and 115 mM G, both G/GOD/ I⁻/LP and G/GOD/SCN⁻/LP systems prevented *Candida* growth in the planktonic as well as the attached phase for at least 21 days. Table 2 indicated the absorbance values at 600 nm (for the planktonic evaluation) and at 570 nm (for the attached phase evaluation) expressed as the percentage of the time-paired control in the absence of oxidant. Both peroxidase systems maintained the titanium powder free of yeast cells for three weeks, with absorbance at 600 nm equal to zero. Repeated measurements (n = 4) at one, two, and three weeks showed persisting growth inhibition in the broth. By contrast, a limited but existing anchored phase was demonstrated on titanium powder by the MTT procedure.

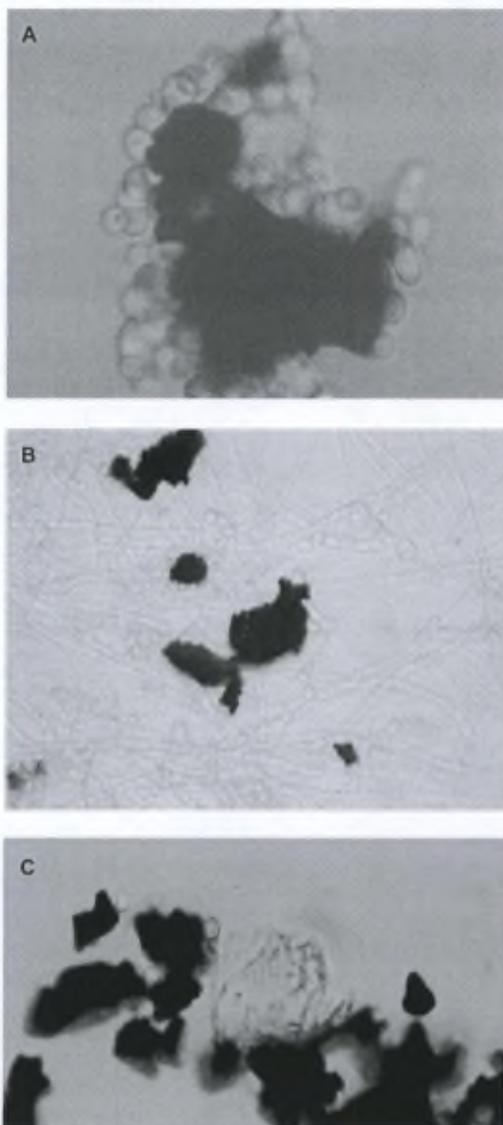
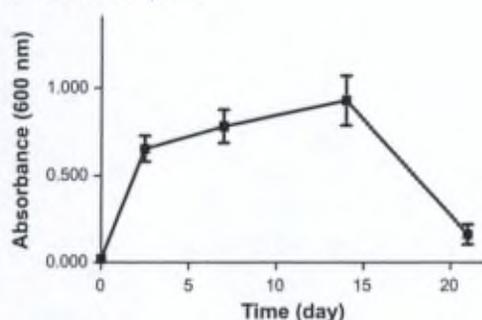


Figure 3A) *Candida albicans* blastoconidia adhered to titanium granule (magnification $\times 400$ in the absence of any stain procedure) after a one-week incubation and three washings. **B)** Titanium grains surrounded by filamentous structures (hyphae and pseudohyphae) after a three-week incubation. **C)** Titanium particles (after three weeks of incubation and four washings) with some remaining blastoconidia and trabecular structure.

In the presence of the SCN⁻ substrate (n = 4), a small anchored phase was observed to evolve from $11.3\% \pm 12.3\%$, to $24.9\% \pm 8.3\%$, then finally to $18.7\% \pm 3.5\%$ of the control on days 7, 14, and 21, respectively. In the presence of I⁻ substrate (n = 4), no anchored biomass could be shown (zero

A. Planktonic phase



B. Anchored phase

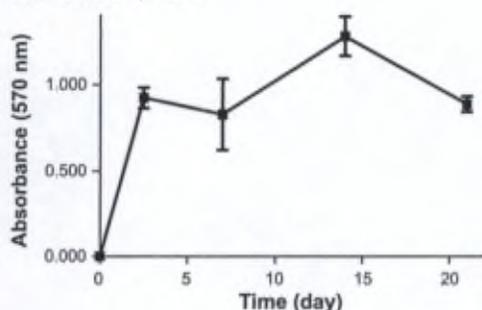


Figure 4 Time course of yeast biomass in the planktonic phase (top) and in the anchored phase (bottom).

Note: Development of yeast biomass was weekly monitored for three weeks in the planktonic phase (absorbance at 600 nm) and in the anchored phase (absorbance at 570 nm after MTT procedure).

absorbance at 570 nm) after one week of incubation at room temperature, and only appeared after 14 days' incubation ($14.5\% \pm 3.7\%$ of the paired control) and slightly progressed to $20.2\% \pm 3.7\%$ of the control on day 21. At any incubation time, data from both peroxidase system conditions were statistically lower than their paired controls (ANOVA completed by a Dunnett's multiple comparison test).

Yeast recovery from deposits onto titanium foil

Droplets (20 μ L of sterile water) containing small amounts of yeast (10–200 blastoconidia in five independent experiments) were deposited onto titanium foil and incubated at 37°C for 30 minutes. Foils were then rubbed on Sabouraud solid medium for cultures at 37°C for two days. Yeast recovery ($81.9\% \pm 7.0\%$, $n = 5$) was statistically independent (ANOVA, $P = 0.6167$) of the numbers of blastoconidia deposited onto the foil. Figure 4 reports *Candida* recovery after rubbing the foil prepared in the following conditions: a) blastoconidia droplets were directly deposited onto foil, b) blastoconidia droplets

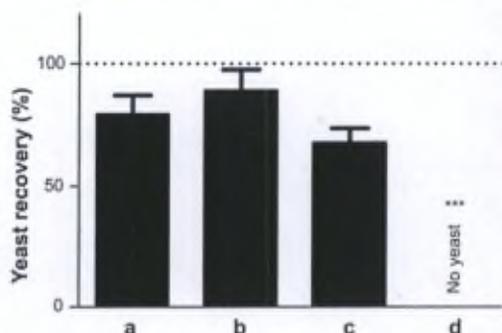


Figure 5 Yeast recovery from deposits onto titanium foil.

Note: Droplets (20 μ L of sterile water containing from 10 to 200 blastoconidia) were deposited onto titanium foil and incubated at 37°C for 30 minutes. *Candida albicans* recovery was evaluated after rubbing the foil prepared in the following conditions: a) blastoconidia droplets were directly deposited onto foil; b) blastoconidia droplets were deposited onto lactoperoxidase-coated titanium; and c) blastoconidia droplets with added G/GOD were deposited onto lactoperoxidase-coated titanium, d) blastoconidia droplets with added G/GOD/KI were deposited onto lactoperoxidase-coated titanium ($n = 5$ for each condition). Data were analyzed by an ANOVA test ($P = 0.0009$) completed by a Dunnett's multiple comparison test ($P < 0.001$).

Abbreviations: G, glucose; GOD, glucose oxidase; LP, lactoperoxidase; I, iodide; SCN⁻, thiocyanate.

were deposited onto LP-coated titanium, c) blastoconidia droplets with added G/GOD were deposited onto LP-coated titanium, d) blastoconidia droplets with added G/GOD/KI were deposited onto LP-coated titanium. Yeast recovery was respectively $79.5\% \pm 7.7\%$ ($n = 6$), $89.0\% \pm 8.6\%$ ($n = 4$), $67.8\% \pm 6.0\%$ ($n = 6$), and $0.0\% \pm 0.0\%$ ($n = 6$). LP coating only operated when the droplets contained the three other components (G/GOD/KI) of the system, producing OI. An ANOVA test ($P = 0.0009$) completed by a Dunnett's multiple comparison test ($P < 0.001$) was then highly significant.

Discussion

Frequent occurrence of *C. albicans* at peri-implantitis sites,⁷ inside port reservoirs of totally implantable vascular access devices,¹ and other titanium implants justifies laboratory attempts to devise a reproducible model in order to investigate *in vitro* yeast biofilm formation and its modulation. This paper shows the reliability of a model using titanium powder and foil as support for *C. albicans* adhesion and biofilm formation with the aim to study yeast growth inhibitors on biomaterial surfaces, in particular titanium implants. Numerous *in vitro* biofilm models have already been described on various material surfaces in order to investigate new antimicrobial strategies. However, only a few studies have evaluated titanium support in the yeast biofilm area. One paper¹⁵ reported the efficiency of a laser decontamination procedure in dentistry applied to a titanium model derived from previous studies¹⁸ of yeast biofilms on denture polymethylmethacrylate surfaces.

Table 2 Time course of yeast biomass in the planktonic phase and in the anchored phase

Planktonic phase evaluated by turbidimetry				
Incubation time (days)	Control A (600 nm)	Control (%)	G/GOD/SCN ⁻ /LP (%)	G/GOD/I ⁻ /LP (%)
7	0.781 ± 0.095 (4)	100.0 ± 17.2 (4)	0.0 ± 0.1 (4)***	0.0 ± 0.3 (4)***
14	0.929 ± 0.142 (4)	100.0 ± 21.6 (4)	0.0 ± 0.0 (4)***	0.0 ± 0.0 (4)***
21	0.161 ± 0.058 (4)	100.0 ± 50.9 (4)	0.0 ± 0.0 (4)	0.0 ± 0.0 (4)
Anchored phase evaluated by MTT assay				
Incubation time (days)	Control A (570 nm)	Control (%)	G/GOD/SCN ⁻ /LP (%)	G/GOD/I ⁻ /LP (%)
7	0.829 ± 0.206 (4)	100.0 ± 35.1 (4)	11.3 ± 12.3 (4)*	0.0 ± 0.0 (4)*
14	1.280 ± 0.112 (4)	100.0 ± 12.4 (4)	24.9 ± 8.3 (4)***	14.5 ± 3.7 (4)***
21	0.887 ± 0.044 (4)	100.0 ± 7.0 (4)	18.7 ± 3.5 (4)***	20.2 ± 3.7 (4)***

Notes: Incubation at room temperature for 7–21 days in the presence of peroxidase systems with either thiocyanate SCN⁻ or I⁻ substrate. Data are expressed as the percentage of the time-paired control without the peroxidase system. Data from both peroxidase system conditions were compared to the corresponding control condition by ANOVA completed by a Dunnett's multiple comparison test (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

Abbreviations: G, glucose; GOD, glucose oxidase; LP, lactoperoxidase; I⁻, iodide; SCN⁻, thiocyanate.

The present study uses similar inoculum sizes and procedures for the quantification of yeast biomass anchored to a titanium support, as in the two last quoted papers. Nevertheless, the present model differs in several aspects, ie, the use of material powder increases support surfaces in the same manner as cell cultures on beads. Moreover, adhesion of *C. albicans* to the support precedes the formation of a biofilm. These two steps are not set apart in the model described here, which enables the simultaneous study of yeast growth both in the supernatant (planktonic phase) and in the biofilm (anchored phase). Within a very short time, anchored blastoconidia progressively covered the available surface on the biomaterial. The small but significant decrease of culture liquid turbidity immediately after addition of titanium powder should reflect attachment of *Candida* to titanium, starting as early as the material has been immersed. The anchored blastoconidia amount was then evaluated by using the MTT method as $1.1 \pm 0.1 \times 10^6$ blastoconidia per g of titanium powder, demonstrating a rapid attachment. After covering the entire available surface, biofilm grew following a multilayer pattern (as seen in Figure 3a), susceptible to liberation of numerous blastoconidia during the washing process. This desorption resulted in modifying the decay model of turbidity during the washings. After the longest incubation (three weeks), titanium powder was observed embedded in a network of hyphae. To investigate the time course of events, planktonic and biofilm growths were evaluated between two days and three weeks. As shown in the results section, absorbance at 600 nm of the liquid medium rapidly increased to reach a steady state at two days, then decreased after two weeks, in agreement with theoretic microbiologic growth curves, the decline being attributed to modifications of the culture liquid (eg, nutrient exhaust, toxic catabolites, and pH change). MTT reduction assay data revealed that the *C. albicans* biofilm developed

rapidly (at least in two days), while the growth decline stage was delayed (albeit this was not part of this investigation). Photonic and fluorescent microscopy was performed at all stages in order to visualize the biofilm structure, composed of a dense blastoconidia layer and hyphal forms. At 21 days, added extracellular polymeric material could be observed, with an amorphous reticular appearance. Initially, *C. albicans* cells were observed as blastoconidia, and (pseudo)hyphae appeared later. Production of extracellular polysaccharide material by *Candida* cells and filamentation of yeast cells contribute to modify biofilm architecture into a heterogeneous structure. Further studies should describe more precisely the kinetics of *Candida* biofilm formation on titanium.

Titanium is widely employed for implant manufacturing due to its good biocompatibility and mechanical properties, but infection remains a cause of failure leading to removal. The titanium surface is not antimicrobial by itself, so it could be used as support for a *Candida* biofilm in this investigation. Making implant surfaces resistant to microbial colonization should reduce infectious complications. Such developments need an *in vitro* model which allows investigation of the effect of surface modification and coatings on biofilm production. Yeast biofilms are characterized by a significantly decreased susceptibility to usual antifungal drugs, encouraging the search for other inhibition methods, such as peroxidase systems. Previous studies have shown that a 30-minute exposure to OI⁻ was sufficient to inhibit planktonic growth *in vitro*.¹⁴ The present investigation demonstrated that *Candida* biofilm development on material surfaces could be reduced or even suppressed by LP-generated OI⁻ and OSCN⁻, not only when peroxidase and substrates system were dissolved in the liquid phase into material and immersed, but also when material-precoated peroxidase was activated by simple addition of the substrates to the liquid surrounding the precoated material. Those data demonstrate

the efficiency of peroxidase systems against a *Candida* strain, and concomitantly show an application of the titanium powder model described *supra*. This investigation did not demonstrate that enzymes remain active after a three-week incubation, but clearly showed that their inhibition effect persisted during this time. Previous investigations demonstrated, firstly, that coating onto titanium did not modify LP activity, and secondly, that LP incorporated into oral gel maintained its activity for at least one year and thirdly, that the substrate exhaust (namely H_2O_2 , I⁻) is the actual limiting factor.^{13,20,21} Transfer of this finding from bench to clinic is questionable. Indeed, immunogenicity of coated LP should limit the applications of this system to *ex vivo* conditions. A previous investigation indicated an antibacterial effect with Gram-positive and Gram-negative bacteria, suggesting a nonspecific inhibitory effect of hypiodide on microbial metabolism and growth.²²

Conclusion

In conclusion, *C. albicans* biofilms on titanium powder could offer a simple and reliable model for further investigating new antimicrobial strategies. Moreover, the model could be used in other studies of contaminating microorganisms on implanted materials.

Acknowledgments

The authors thank F Chagri and J Le Gentil de Rosmorduc from the Haute Ecole Francisco Ferrer (Medical Biology section) for their enthusiastic participation in this project. The authors also thank Pr C de Burbure for her review of the manuscript, and Pr M Stas and Pr L Sennerby for their helpful advice.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Brouns F, Schuermans A, Verhaegen J, De Wever I, Stas M. Infection assessment of totally implanted long-term venous access devices. *J Vasc Access*. 2006;7:24–28.
- Chang L, Tsai JS, Huang SJ, Shih CC. Evaluation of infectious complications of the implantable venous access system in a general oncologic population. *Am J Infect Control*. 2003;31:34–39.
- Opilla M. Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. *Am J Infect Control*. 2008;36:S173.e5–e8.
- Holzheimer RG, Dralle H. Management of mycoses in surgical patients – review of the literature. *Eur J Med Res*. 2002;7:200–206.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1–45.
- Penk A, Pittrow L. Role of fluconazole in the long-term suppressive therapy of fungal infections in patients with artificial implants. *Mycoses*. 1999;42(S2):91–96.
- Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10:339–345.
- Shibli JA, Martins MC, Lotufo RF, Marcantonio E Jr. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:383–390.
- Arweiler-Harbeck D, Sanders A, Held M, Jerman M, Eltrich H, Jahnke K. Does metal coating improve the durability of silicone voice prostheses? *Acta Otolaryngol*. 2001;121:643–646.
- Joshi RI, Eley A. The *in-vitro* effect of a titanium implant on oral microflora: Comparison with other metallic compounds. *J Med Microbiol*. 1988;27:105–107.
- Akiba N, Hayakawa I, Keh ES, Watanabe A. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst. *J Med Dent Sci*. 2005;52:223–227.
- Darouiche RO, Green G, Mansouri MD. Antimicrobial activity of antiseptic-coated orthopaedic devices. *Int J Antimicrob Agents*. 1998;10:83–86.
- Ahariz M, Mouhyi J, Louette P, Van Reck J, Malevez C, Courtois P. Adsorption of peroxidase on titanium surfaces: A pilot study. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:567–571.
- Majerus P, Courtois P. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J Biol Buccale*. 1992;20:241–245.
- Sennhenn-Kirchner S, Schwarz P, Schliephake H, Konietschke F, Brunner E, Borg-von Zepelin M. Decontamination efficacy of erbium:yttrium-aluminum-garnet and diode laser light on oral *Candida albicans* isolates of a 5-day *in vitro* biofilm model. *Lasers Med Sci*. 2009;24:313–320.
- Liu LF, Barford J, Yeung KL, Si G. Non-UV based germicidal activity of metal-doped TiO₂ coating on solid surfaces. *J Environ Sci*. 2007;19:745–750.
- Levitz SM, Diamond RD. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*. 1985;152:938–945.
- Basivireddy J, Jacob M, Balasubramanian KA. Oral glutamine attenuates indomethacin-induced small intestinal damage. *Clin Sci*. 2004;107:281–289.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res*. 2001;80:903–908.
- Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin J-P, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008;25:222–228.
- Ahariz M, Courtois P. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypiodite. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. 2010;2: In Press.
- Courtois P, Vanden Abbeele A, Amrani N, Pourtois M. *Streptococcus sanguis* survival rates in the presence of lactoperoxidase-produced OSCN⁻ and OF⁻. *Med Sci Res*. 1995;23:195–197.

Medical Devices: Evidence and Research

Publish your work in this journal

Medical Devices: Evidence and Research is an international, peer-reviewed, open access journal that focuses on the evidence, technology, research, and expert opinion supporting the use and application of medical devices in the diagnosis, treatment and management of clinical conditions and physiological processes. The identification of novel

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/medical-devices-evidence-and-research-journal>

Dovepress

devices and optimal use of existing devices which will lead to improved clinical outcomes and more effective patient management and safety is a key feature. The manuscript management system is completely online and includes a quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from authors.

Candida albicans susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite

Mohamed Ahariz¹
Philippe Courtois²

¹Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

²Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium and UER de Biologie Médicale, Haute Ecole Francisco Ferrer, Brussels, Belgium

Abstract: *In vivo*, lactoperoxidase produces hypothiocyanite (OSCN⁻) from thiocyanate (SCN⁻) in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂); *in vitro*, iodide (I⁻) can be oxidized into hypoiodite (OI⁻) by this enzyme. The aim of this study was to compare *in vitro* the anti-*Candida* effect of iodide versus thiocyanate used as lactoperoxidase substrate to prevent *Candida* biofilms development. *Candida albicans* ATCC 10231 susceptibility upon both peroxidase systems was tested in three different experimental designs: (i) in a liquid culture medium, (ii) in an interface model between solid culture medium and gel containing the enzymic systems, (iii) in a biofilm model onto titanium and acrylic resin. Yeast growth in liquid medium was monitored by turbidimetry at 600 nm. Material-adherent yeast biomass was evaluated by the tetrazolium salt MTT method. The iodide-peroxidase system has been shown to inhibit *Candida* biofilm formation at lower substrate concentrations (~200 fold less H₂O₂ donor) and for longer incubation periods than the thiocyanate-peroxidase system. In conclusion, efficiency of lactoperoxidase-generated OI⁻ to prevent *C. albicans* biofilm development allows refining iodine antifungal use in *ex vivo* conditions.

Keywords: denture, iodide, oral, peroxidase, saliva, titanium

Introduction

Yeasts (especially from *Candida* genus) are usually isolated from oral mucosa in healthy humans. However, saliva protects oral mucosa against candidosis; in turn, dry mouth is associated with high yeast counts and candidosis risk.¹ *Candida* incorporation into biofilms covering denture materials forms another risk factor for invasive candidosis.^{1,2} Beside oral colonization in xerostomic patients and denture wearers, yeasts have now gained more importance in oral medicine due to the increased incidence of medically/immunologically compromised patients.¹ Antifungals (azoles, polyenes) have to be reserved for curative treatments of infected patients: they are less active against *Candida* biofilms on dentures and could lead to emergent resistance if applied daily to dentures to prevent yeast colonization.^{2,3} Daily denture brushing is the main advice to give all wearers. In case of candidosis in denture wearers, decontamination of dentures is mandatory.³ Some antiphlogistic compounds, among which iodide derivatives, have been reported antifungal as well. Nevertheless, scientific literature about these does not integrate all aspects of denture care with knowledge of *Candida* biofilm development. Several iodine compounds such as povidone-iodine and hypoiodite/hypoiodous acid are already known for their anti-*Candida* properties. Povidone-iodine which has been proposed for a long time as a topical agent for skin and mucosa disinfection is still chosen as

Correspondence: Philippe Courtois
Laboratory of Experimental Hormonology (CP 626), Université Libre de Bruxelles (ULB), route de Lennik 808, B-1070 Brussels, Belgium
Tel +32 2 555 63 10
Fax +32 2 555 42 19
Email philippe.courtois@ulb.ac.be

a control in comparative studies concerning new antifungal topical formulations.⁴⁻⁸ Iodine-povidone exhibited not only antifungal properties but also anti-adherence capacity.⁹ However, *in vitro*, its anti-*Candida* effect is reported to be rather low.⁷ Moreover, daily povidone-iodine cleaning of the mouth has been shown poorly effective in comparison with professional oral care performed weekly.⁸ Iodine-povidone is also used prophylactically in medically compromised subjects such as bone marrow transplant patients or elderly persons at risk of aspiration pneumonia.^{10,11} Iodine-releasing mucoadhesive tablets have been also proposed for treating oral infections.¹² Some antifungal effect of potassium iodide has been reported in the treatment of sporotrichosis, providing a first attempt to treat systemic mycosis; however, its activity spectrum could not be demonstrated for other systemic mycoses neither for candidosis.¹³ In the presence of hydrogen peroxide, some peroxidases can catalyze the oxidation of potassium iodide into hypoiodite (OI^-)/hypoiodous acid (HOI) which has been shown effective against several yeasts such as *Candida*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* and against some species of *Aspergillus* such as *A. fumigatus* or *A. niger*.¹⁴ The use of a lactoperoxidase system has been suggested as preservative in foods and pharmaceuticals.¹⁵ *In vitro*, peroxidase-generated hypoiodite could exert a strong inhibiting effect on *Candida albicans* at physiological concentrations but its activity in saliva was found to be under the control of thiocyanate concentration.¹⁶ The aim of this *in vitro* study was to compare the anti-*Candida* effect of iodide versus thiocyanate used as lactoperoxidase substrate with a view to preventing *Candida* biofilms development on materials, in the field of oral medicine in particular.

Material and methods

Materials

Candida adherence was evaluated onto titanium (powder or foil) and acrylic resins (hard or soft) which are biomaterials commonly used in the oral environment. Aliquots (0.5 g) of titanium powder (Alfa Aesar™; Karlsruhe, Germany; 99.5% purity, ~325 mesh) were transferred into sterile polystyrene cell culture tubes (BD Falcon™, USA; size: 125 × 16 mm, round bottom). Titanium pieces were cut from native foil (Advent™; UK; 99.6% purity; thickness 25 μm, size 25 mm × 5 mm); each piece was weighed and the total surface was calculated using the following algorithm: $S = 2 \{ (m/ph) + h(L+I) \}$ where S: total surface (mm²), m: foil mass (mg), p: volumic mass (4.544 mg/mm³), h: foil thickness (0.025 mm), L: foil length (mm), I: foil width (mm). Total

surface averaged $246 \pm 4 \text{ mm}^2$ (mean ± SEM, N = 16) with a coefficient of variation of 6.5%. Two different resins for denture (Vertex soft; and Vertex rapid simplified; Vertex Dental, Zeist, Netherlands) were investigated with and without varnishing (Palaseal; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Acrylic resin pieces (thickness ~2 mm, size 25 mm × 5 mm) were processed according to the manufacturer's instructions. The mass of each resin piece averaged $222 \pm 2 \text{ mg}$ (mean ± SEM, N = 96) with a coefficient of variation of 8.6%.

Culture of *Candida*

Candida albicans ATCC 10231 (Culti-Loops; Oxoid, Basingstoke, UK) was grown at 37°C on Sabouraud-gentamycin-chloramphenicol agar (Becton-Dickinson, Belgium). Yeast was harvested from the third subculture to a flask containing a Sabouraud broth (CM147; oxoid). The suspension was then adjusted to an absorbance of 0.800 at 600 nm (corresponding to $1.55 \pm 0.32 \cdot 10^7$ CFU/mL, N = 6) and always 10-fold diluted in the appropriate reactant medium. Wild strains of *C. albicans* (N = 5) and *C. glabrata* (N = 4) were isolated from dentures and identified on the basis of their colony aspect on CHROMagar medium (BD Diagnostics, Erembodegem, Belgium) and their carbohydrate assimilation pattern using the ID32C API system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Colony diameter was measured on Petri dish photography by using the Image-Pro software version 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

Production of *Candida* biofilms

Titanium powder (0.5 g) was suspended in 3.6 mL Sabouraud broth and *C. albicans* suspension (0.4 mL) adjusted in Sabouraud broth to an absorbance of 0.800 at 600 nm, as indicated above. After continuous stirring (Stuart SB3 rotator; Barloworld Scientific, Stone, UK) during 2 days at room temperature, titanium powder was separated by sedimentation (10 min) from liquid medium and washed three times with 4 mL sterile Sabouraud broth. Titanium powder from some sterile controls was contaminated by 4 mL of the first supernatant from the contaminated assays in order to evaluate the efficiency of the washing process. All the first supernatants were monitored by turbidimetry at 600 nm to evaluate the planktonic yeast phase. Titanium and resin foils were similarly treated. Material-adherent yeast biomass (anchored yeast phase) was evaluated by the tetrazolium salt MTT (final concentration: 1.7 mg/mL in 2:1 Sabouraud – pH 7.40 PBS) which is reduced by viable

fungi with resultant formation of MTT-formazan absorbing on a spectrophotometer at 570 nm after extraction in isopropanol.^{17,18} Main characteristics of the method: molar absorption coefficient ϵ_{570} of $17,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, sensitivity of 0.5×10^6 blastoconidia/mL, coefficient of variation $\leq 12.0\%$, analytical range from 0.5 to 10×10^6 blastoconidia/mL corresponding to an absorbance at 570 nm comprised between 0.206 ± 0.010 ($N = 6$, CV: 12.0%) and 1.792 ± 0.058 ($N = 6$, CV: 7.9%) respectively. Microscopic examination confirmed the presence of yeast on the surface of titanium powder as assessed by the chemical data: titanium grains were surrounded by several blastoconidia layers after a 2-day incubation, and filamentous structures (hyphae and pseudohyphae) have been observed after 3 weeks.

Lactoperoxidase adsorption on titanium

Lactoperoxidase (Biopole, Belgium) was obtained from bovine milk. Its specific activity was 12 ABTS units/protein mg at 37°C at pH 5.0 (one ABTS unit corresponded to the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 mM of the ABTS substrate in one minute under the assay conditions described by Mansson-Rahemtulla et al¹⁹). Lactoperoxidase was dissolved in demineralized water or in another solution when indicated. As previously described, titanium foils were immersed during 30 minutes at 37°C in 5 mL of a 10 ABTS units/mL lactoperoxidase solution or in demineralized water alone (control).²⁰ After incubation, the liquid phase was removed and titanium foils were washed 3 times with 5 mL of demineralized water and then transferred into another tube with the last washing medium. This procedure was repeated 5 times and the liquid phase was removed; titanium pieces were then dried at room temperature.

Lactoperoxidase systems

Two different peroxidase systems were tested on biofilm formation: hydrogen peroxide (H_2O_2)/lactoperoxidase (LPO, 1 U/mL)/iodide (I^- from KI, various concentrations up to 1.2 mM) system generating hypoiodite (OI^-) and H_2O_2 /LPO (1 U/mL)/thiocyanate (SCN^- from KSCN, 1.2 mM) producing hypothiocyanite (OSCN^-). H_2O_2 was enzymatically produced by glucose-oxidase (GOD, 1.3 U/mL or 0.2 U/mL) and glucose (G) present in the culture medium (115 mM). In some experiments, peroxidase was pre-adsorbed onto titanium foils as schematized in Figure 1. The effect of the peroxidase systems on *C. albicans* growth was also evaluated in Sabouraud liquid medium by turbidimetry (absorbance at 600 nm) after a 16-hour incubation at 37°C or by yeast count on Sabouraud solid

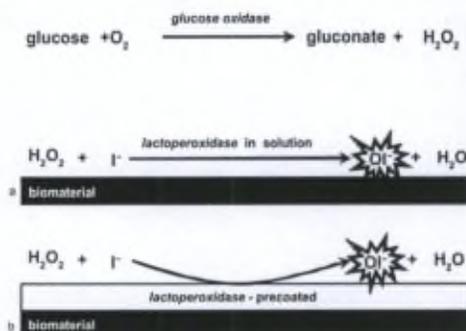


Figure 1 Peroxidase systems producing hypoiodite (OI^-) from iodide (I^-) in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2). The present figure schematizes both lactoperoxidase uses: a) dissolving in the liquid culture medium or b) pre-coating onto materials (titanium or resin foils).

medium (implying thus a subsequent 48-hour cultivation on solid medium from the liquid medium). Finally, peroxidase systems were tested after incorporation in a gel consisting of a polyglycerol methacrylate polymer, starch hydrogenated hydrolysate, hydroxyethylcellulose and water. Antifungal activity of gels were evaluated by a diffusion test. For this purpose, *Candida* suspension (25 μl , adjusted to an absorbance of 0.800 at 600 nm in Sabouraud broth) was swabbed onto the surface of a Sabouraud plate centrally gel-punched (O : 15 mm). Then 1 g of tested gel was deposited in the central well. Microcolonies were evident after 24 h at 37°C but the lawn of growth was confluent or nearly confluent after 48 h. After a two-day incubation at 37°C, the radius of the inhibition zone at the agar surface was measured around the central well in four orthogonal directions. Negative control has been performed using inactivated gel by heating at 85°C during 6 hours.

Finally, H_2O_2 was detected by chemiluminescence (lucigenin method). Briefly, lucigenin (20 μM) was oxidized by H_2O_2 in alkaline solution (Na_2CO_3 buffer) with photon emission, which was measured on a bioluminometer LKB 1250 (LKB-Wallac, Turku, Finland).

Statistics

Data were analyzed using the GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA USA). ANOVA analysis completed by a Dunnett's Multiple Comparison test was performed for *Candida* count and spectrophotometric data. An unpaired *t*-test of Student compared colony diameter on Sabouraud solid medium in the presence of G/GOD/ SCN^- /LPO gel versus control. Mean values were expressed with their related standard error of the mean.

Results

Effect of I-/LPO system in *Candida* cultures

Figure 2 illustrates the *Candida* counts after a 16-hour exposure to different lactoperoxidase system formulations incorporated in Sabouraud liquid medium. In these experiments, *Candida* counts were provided by cultures on Sabouraud solid medium after appropriate serial dilutions (from 10 to 10⁴ fold) of the incubation liquid medium; the data were expressed as log(10) CFU/mL. In the presence of 115 mM D-glucose and GOD 0.2 U/mL, the *Candida* count expressed as log(10) (5.975 ± 0.114, N = 6) was not statistically different from various control formulations: LPO/KSCN/G (5.468 ± 0.137, N = 6), LPO/KI/G (5.640 ± 0.227, N = 6), LPO/NaCl/G (5.381 ± 0.055, N = 6) and LPO/NaCl/G/GOD (5.741 ± 0.181, N = 6). In the presence of the same GOD and LPO activities (0.2 U/mL and 1 U/mL respectively), the iodide substrate (1.2 mM) inhibited yeast growth (N = 6; *P* < 0.001) while the thiocyanate substrate (1.2 mM) lightly decreased the log(10) CFU/mL count to 4.625 ± 0.527 (N = 6; *P* < 0.01); in turn, chloride (1.2 mM) – which is not a substrate for lactoperoxidase – did not affect yeast survival (5.741 ± 0.181, N = 6, *P* > 0.05).

Table 1 shows data obtained in liquid cultures (6 independent cultures for each condition in one pilot experiment) by measuring the absorbance at 600 nm after a 16-hour

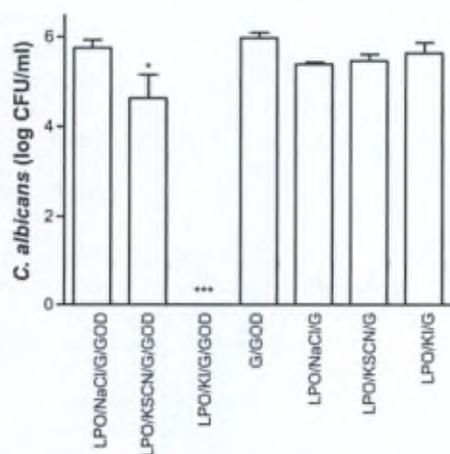


Figure 2 Anti-*Candida* effect of a 16-hour exposure to various combinations of lactoperoxidase systems. *Candida albicans* (ATCC 10231) growth in Sabouraud broth was evaluated by counting colony forming units (CFU expressed as log(10)). **Abbreviations:** G, glucose; GOD, glucose oxidase; LPO, lactoperoxidase.

Table 1 *Candida albicans* (ATCC 10231) growth in Sabouraud broth evaluated by turbidimetry (absorbance at 600 nm) after a 16-hour incubation in the presence of the iodide/lactoperoxidase system at different iodide concentrations

Culture conditions	Δ Absorbance at 600 nm mean ± SEM (N)	%
Positive control	0.894 ± 0.022 (6)	100.0 ± 3.5 (6)
G/GOD	0.917 ± 0.020 (6)	102.6 ± 3.4 (6)
G/GOD/LPO	0.935 ± 0.021 (6)	104.6 ± 3.5 (6)
G/GOD/1.20 mM KI	0.929 ± 0.011 (6)	103.4 ± 2.8 (6)
G/GOD/LPO/1.20 mM KI	0.026 ± 0.011 (6)***	2.9 ± 1.2 (6)***
G/GOD/LPO/0.60 mM KI	0.029 ± 0.013 (6)***	3.2 ± 1.5 (6)***
G/GOD/LPO/0.30 mM KI	0.659 ± 0.033 (6)***	73.7 ± 4.1 (6)***
G/GOD/LPO/0.15 mM KI	0.891 ± 0.010 (6)	99.7 ± 2.7 (6)
G/GOD/LPO/0.07 mM KI	0.884 ± 0.026 (6)	98.9 ± 3.8 (6)
Negative control	0.000	0.0

Notes: Data were analysed by ANOVA completed by a Dunnett's Multiple Comparison test (positive control condition considered as control group). **Abbreviations:** G, glucose; GOD, glucose oxidase; LPO, lactoperoxidase; SEM, standard error of the mean; N, number of determinations.

exposure to the lactoperoxidase system in the presence of different iodide substrate concentrations comprised between 0.07 and 1.20 mM. As already demonstrated by culture on solid medium, GOD at 0.2 U/mL in the absence of lactoperoxidase (thus producing H₂O₂) did not affect the *Candida* growth as observed by spectrophotometry: the absorbance at 600 nm yielded then 102.6 ± 3.4% (N = 6) of that found after culture in control broth (100.0 ± 3.5%, N = 6). Both 0.6 and 1.20 mM KI concentrations in the presence of G/GOD/LPO provided absorbance values (0.029 ± 0.013 and 0.026 ± 0.011, respectively) that were not statistically different from the paired negative controls. The other KI concentrations (0.07, 0.15 and 0.30 mM) tested with lactoperoxidase were insufficient to abolish *Candida* growth: absorbance at 600 nm respectively yielded 98.9 ± 3.8, 99.7 ± 2.7 and 73.7 ± 4.1% of the paired positive control. In 6 independent experiments, the lowest active iodide concentration estimated to 0.6 mM in the pilot experiment has been successfully corroborated by subcultures of the infected liquid media on solid Sabouraud agar: in the presence of 0.6 and 1.2 mM KI, no colony-forming unit (CFU) could be observed.

In another set of 6 independent experiments, iodide versus thiocyanate substrates (1.2 mM both) were incorporated in gel containing glucose, lactoperoxidase and GOD. The anti-*Candida* effect of these gels was simultaneously evaluated by counting after gel-covering yeast-napped agar and by measuring inhibition radius in a radial diffusion test: Table 2 summarizes the data. The data were compared

Table 2 *Candida albicans* (ATCC 10231) growth on Sabouraud solid medium covered by a gel containing an oxidative system (G/GOD producing H₂O₂, G/GOD/KSCN/LPO producing hypothiocyanite and G/GOD/KI/LPO producing hypiodite)

Oxidative system	GOD activity (U/gel mL)	Survival rate (%)	Inhibition radius (mm)
G/GOD	0.000	100.0 ± 9.8 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	0.150	105.9 ± 8.7 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	1.500	4.9 ± 2.4 (6) ^{***}	0.0 ± 0.0 (3)
	3.000	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	0.0 ± 0.0 (3)
G/GOD/KSCN/LPO	0.000	107.4 ± 9.3 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	0.050	88.5 ± 4.6 (6) [*]	0.0 ± 0.0 (3)
	0.250	66.9 ± 4.2 (6) ^{***}	0.0 ± 0.0 (3)
	0.500	16.9 ± 1.8 (6) ^{***}	0.0 ± 0.0 (3)
	1.000	13.6 ± 4.1 (6) ^{***}	0.0 ± 0.0 (3)
	1.500	3.0 ± 1.3 (6) ^{***}	0.3 ± 0.2 (3)
	3.000	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	0.0 ± 0.0 (3)
	6.000	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	0.7 ± 0.2 (3) [*]
G/GOD/KI/LPO	0.000	113.9 ± 1.9 (6)	0.0 ± 0.0 (3)
	0.005	43.0 ± 10.9 (6) ^{***}	0.3 ± 0.1 (3)
	0.010	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	1.0 ± 0.3 (3)
	0.020	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	1.8 ± 0.3 (3) ^{**}
	0.040	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	4.9 ± 0.1 (3) ^{***}
	0.400	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	5.2 ± 0.3 (3) ^{***}
	1.000	0.0 ± 0.0 (6) ^{***}	6.9 ± 0.7 (3) ^{***}

Notes: Minimal inhibitory activity of GOD was evaluated by colony forming unit count and by a radial diffusion test after a 2-day incubation at 37°C. Survival rate was expressed as percentage (%) of the paired control without GOD, and the radius around a gel-filled wall was expressed in millimeters (mm). Data for each tested gel were analysed by ANOVA completed by a Dunnett's Multiple Comparison test (no GOD activity condition for each oxidative system was considered as a control group).

Abbreviations: G, glucose; GOD, glucose oxidase; LPO, lactoperoxidase.

with those observed with gel alone. The lowest active GOD activity is quite similar in the presence of both oxidative G/GOD and G/GOD/KSCN/LPO systems: 3 U of GOD per gel mL provided a total inhibition of *Candida* growth. In turn, GOD incorporated in G/GOD/KI/LPO gels already suppressed the *Candida* survival at an activity of 10 mU per gel mL. These data obtained at the interface agar/gels were confirmed by a radial diffusion test. This second procedure resulted in an inhibition area round a gel-filled central wall only in the presence of G/GOD/KI/LPO oxidative system: at an activity of 10 mU per gel mL, inhibition radius was 1.0 ± 0.3 mm (N = 3). Highest GOD amounts (20, 40, 400 and 1000 mU/gel mL) provided an increase of this inhibition radius to 1.8 ± 0.3 mm (N = 3), 4.9 ± 0.1 mm (N = 3), 5.2 ± 0.3 mm (N = 3) and 6.9 ± 0.7 mm (N = 3) respectively. In turn, no inhibition area could be observed around the central wall filled with G/GOD or G/GOD/KSCN/LPO gels.

Efficiency of iodide-lactoperoxidase system (GOD 0.5 U/gel mL) has been confirmed on five *C. albicans* and four *C. glabrata* wild strains isolated from yeast-colonized dentures. Then, survival rates in the presence of iodide-peroxidase system were 1.8 ± 0.6% (N = 5) and 2.7 ± 1.3% (N = 4) of the paired control for *C. albicans* and *C. glabrata* wild strains respectively versus 95.3 ± 5.1% (N = 5) and

88.3 ± 12.5% (N = 4) in the presence of thiocyanate-peroxidase system.

Effect of lactoperoxidase systems on *Candida* biofilm formation

Both lactoperoxidase systems, one with thiocyanate and the other with iodide as peroxidase substrate, were tested in a model of yeast biofilm on titanium powder. Yeast growth in the supernatant (planktonic phase) was monitored by turbidimetry at 600 nm and titanium-adherent yeast biomass (anchored phase) was evaluated by spectrophotometry at 570 nm in a tetrazolium salt MTT assay. Table 3 reports the absorbances obtained in different conditions for both assays simultaneously performed. In the presence of 1.3 U/mL GOD, both G/GOD/SCN⁻/LPO and G/GOD/I⁻/LPO systems prevented *Candida* growth in planktonic and attached phases during at least 4 days. Indeed, the absorbances at 600 nm (testing the planktonic phase) were 0.017 ± 0.008 (N = 9) and 0.059 ± 0.023 (N = 9) respectively versus 0.658 ± 0.056 (N = 12) for the control without oxidative system: this reduction of supernatant turbidity is statistically significant (ANOVA test: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$). The absorbances at 570 nm (reflecting the anchored phase) were 0.065 ± 0.021 (N = 9) and 0.040 ± 0.018 (N = 9) respectively versus 0.788 ± 0.061 (N = 13) for the control

Table 3 *Candida albicans* biofilm formation after 2 versus 4 days incubation with OSCN⁻ and OI⁻ produced in the presence of 0.2 versus 1.3 U/mL GOD

		Control	G/GOD/KSCN/LPO	G/GOD/KI/LPO
GOD:	planktonic phase	0.452 ± 0.075 (3)	0.453 ± 0.005 (3) NS	0.030 ± 0.001 (3)***
0.2 U/mL	(absorbance at 600 nm)			
incubation:	anchored phase	1.153 ± 0.073 (3)	0.366 ± 0.019 (3)***	0.112 ± 0.059 (3)***
2 days	(absorbance at 570 nm)			
GOD:	planktonic phase	0.757 ± 0.100 (3)	0.927 ± 0.042 (3)	0.029 ± 0.001 (3)***
0.2 U/mL	(absorbance at 600 nm)			
incubation:	anchored phase	0.820 ± 0.027 (3)	1.101 ± 0.030 (3)***	0.125 ± 0.007 (3)***
4 days	(absorbance at 570 nm)			
GOD:	planktonic phase	0.658 ± 0.056 (12)	0.017 ± 0.008 (9)***	0.059 ± 0.023 (9)***
1.3 U/mL	(absorbance at 600 nm)			
incubation:	anchored phase	0.788 ± 0.061 (13)	0.065 ± 0.021 (9)***	0.040 ± 0.018 (9)***
4 days	(absorbance at 570 nm)			

Notes: The planktonic phase was monitored by turbidimetry (absorbance at 600 nm) and the anchored phase by the MTT method (absorbance at 570 nm). Data from both peroxidase system conditions were compared to the control condition by ANOVA completed by a Dunnett's Multiple Comparison test.

Abbreviations: G, glucose; GOD, glucose oxidase; LPO, lactoperoxidase.

without oxidative system: this reduction of MTT staining was statistically significant (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$). In the presence of 0.2 U/mL GOD, G/GOD/I⁻/LPO kept both planktonic and attached phases sterile during 4 days while G/GOD/SCN⁻/LPO only delayed *Candida* adhesion onto titanium from day-2 to 4 without effect on its planktonic growth during the same time period. At this GOD activity (0.2 U/mL) and at day 2, the absorbance at 600 nm was 0.453 ± 0.005 ($N = 3$) for the thiocyanate system and 0.030 ± 0.001 ($N = 3$) for the iodine system versus 0.452 ± 0.075 ($N = 3$) for the control without oxidative system: the reduction of supernatant turbidity in the presence of G/GOD/KI/LPO was statistically significant (ANOVA: $P = 0.0007$, Dunnett: $P < 0.001$). The absorbances at 570 nm were 0.366 ± 0.019 ($N = 3$) and 0.112 ± 0.059 ($N = 3$) respectively versus 1.153 ± 0.073 ($N = 3$) for the control without oxidative system: this reduction of MTT staining was statistically significant (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$). A 2-day incubation in the presence of OSCN⁻ thus decreased the attached biomass to $31.7 \pm 2.6\%$ ($N = 3$) of the paired control without effect on the growth in the supernatant ($100.2 \pm 2.8\%$ of the paired control, $N = 3$). However, after a 4-day exposure to OSCN⁻, the attached biomass reached $95.5 \pm 6.6\%$ ($N = 3$) of the control measured at day 2. The absorbances at 600 nm were then (on day 4) 0.927 ± 0.042 ($N = 3$) for the thiocyanate system and 0.029 ± 0.001 ($N = 3$) for the iodine system versus 0.757 ± 0.100 ($N = 3$) for the control without oxidative system: this reduction of supernatant turbidity in the presence of G/GOD/KI/LPO was statistically significant (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$) while the increase in the presence of G/GOD/KSCN/LPO was not.

The absorbances at 570 nm were 1.101 ± 0.030 ($N = 3$) and 0.125 ± 0.007 ($N = 3$) respectively versus 0.820 ± 0.027 ($N = 3$) for the control without oxidative system: the increase with KSCN and decrease with KI substrate of MTT staining were statistically significant (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$).

In another set of experiments, *Candida* biofilm formation was also examined on titanium foils and on different resins for dentures. All the data for resins were pooled since no statistical difference could be observed according to resin characteristics (hard or soft, varnished or not). The G/GOD/I⁻/LPO peroxidase system was able to prevent *Candida* growth in liquid in which any materials were immersed (Figure 3) and to prevent *Candida* biofilm formation onto materials after 2-day incubation. Similar results were found when lactoperoxidase was precoated onto materials. In the presence of G/GOD/KI/LPO, the absorbance at 600 nm of the culture broth was 0.029 ± 0.001 ($N = 24$) and 0.038 ± 0.009 ($N = 24$) for lactoperoxidase solubilized in broth and for lactoperoxidase precoated onto resin foils respectively versus 1.327 ± 0.076 ($N = 24$) for the control. In the case of titanium foils, results were 0.041 ± 0.002 ($N = 4$) and 0.045 ± 0.002 ($N = 4$) versus 1.691 ± 0.038 ($N = 4$). In the presence of G/GOD/KI/LPO, the absorbance at 570 nm after MTT processing was 0.035 ± 0.006 ($N = 24$) and 0.023 ± 0.004 ($N = 24$) for lactoperoxidase solubilized in broth and for lactoperoxidase precoated onto resin foils respectively versus 0.161 ± 0.032 ($N = 24$) for the control. In the case of titanium foils, results were 0.041 ± 0.002 ($N = 4$) and 0.045 ± 0.002 ($N = 4$) versus 1.691 ± 0.038 ($N = 4$). Thus, a 2-day incubation in the presence of generated OI⁻ decreased the turbidity of the liquid culture medium when compared to that observed in the paired

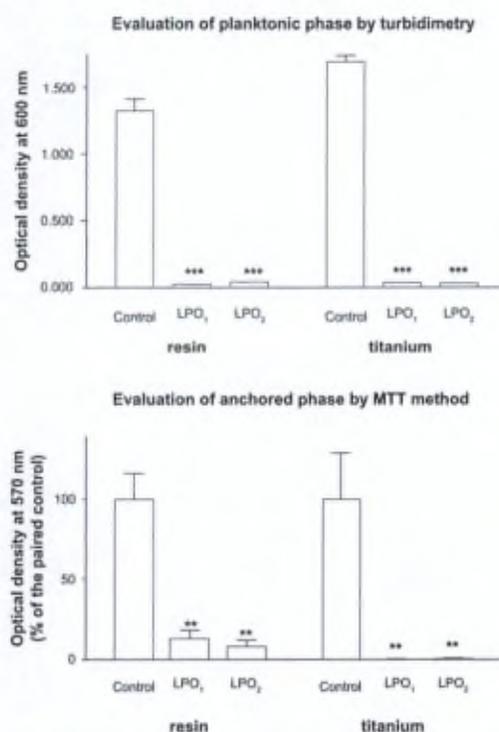


Figure 3 *Candida albicans* biomass in planktonic phase (evaluated by turbidimetry at 600 nm) and anchored phase (evaluated by spectrophotometry at 570 nm) onto materials (titanium or resin) after a 2-day incubation. Lactoperoxidase-adsorbed materials (LPO₁) were compared with the same material exposed to the enzyme in solution (LPO₂) after a 2-day incubation in the presence of OI⁻ produced by various peroxidase systems.

control without the peroxidase system (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$) as well with solubilized lactoperoxidase as with the enzyme precoated onto the material surfaces; these data were confirmed by negative cultures on Sabouraud agar. Moreover, the absorbance at 570 nm (reflecting the attached yeast phase onto resins) was reduced down to $21.1 \pm 5.6\%$ ($N = 24$) of the paired control and $14.3 \pm 3.8\%$ ($N = 24$) for solubilized and precoated lactoperoxidase respectively (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.001$); the decrease of anchored *Candida* biomass was still more severe onto titanium foil and dropped to $1.0 \pm 3.1\%$ of the control (ANOVA: $P < 0.0001$, Dunnett: $P < 0.0001$).

Competition between I⁻ and SCN⁻ for lactoperoxidase

Figure 4 shows the susceptibility of *Candida* growth when both KSCN and KI substrates were simultaneously tested

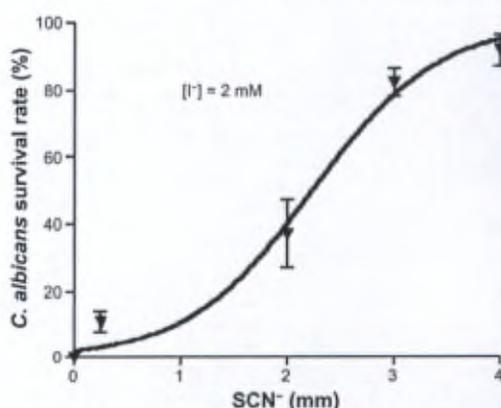


Figure 4 Effect of SCN⁻ competition for lactoperoxidase in oral gel on *Candida* growth on Sabouraud agar. Survival rate (expressed as the percentage of the control without any peroxidase substrate) was assayed for different KSCN concentrations (0–4 mM) in the presence of 2 mM I⁻.

with the lactoperoxidase and the glucose/glucose oxidase sequence. The data demonstrate the competition between SCN⁻ at different concentrations and 2 mM I⁻ through *Candida* survival rate after covering napped Petri dishes with peroxidase gels. The gel alone was unable to limit *C. albicans* growth and H₂O₂ produced by glucose oxidase (GOD 0.2 U/mL) in the presence of glucose was insufficient in the experimental conditions to inhibit the yeast, which is catalase positive. G/GOD/I⁻/LPO reduced the CFU count to zero but addition of SCN⁻ (0.25, 2, 3 and 4 mM) progressively decreased this antifungal effect. Only a slight although significant (unpaired Student's *t*-test: $P < 0.0001$) anti-*Candida* effect of G/GOD/SCN⁻/LPO was observed after 48 hours incubation by measuring colony diameter: 2.23 ± 0.01 mm ($N = 102$) for SCN⁻/LPO condition versus 2.57 ± 0.01 mm ($N = 102$) for control. In 3 experiments, H₂O₂ produced by G/GOD in water reached 3.1 ± 0.3 mM after 4-hours incubation at 37°C in absence of the lactoperoxidase sequence. Addition of peroxidase and of substrates (thiocyanate or iodide) to G/GOD abolished chemiluminescence (Figure 5).

Discussion

Iodine compounds have long been used in oral health care against fungi, particularly against yeasts, with limited efficiency. Among the different forms of iodine mentioned for their antifungal properties, only hypoiodous acid/hypoiodite has been reported to be active *in vitro*.¹⁶ Production of this iodine compound simultaneously needs an iodide intake and the presence of peroxidase activity with H₂O₂. Its strong

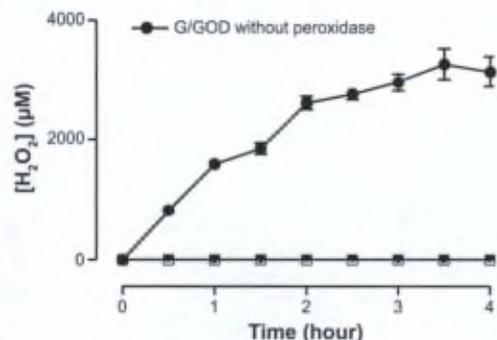


Figure 5 Iodide/peroxidase (■) and thiocyanate/peroxidase (□) effect on H₂O₂ concentration produced by glucose (G)/glucose oxidase (GOD) and measured by the luciferin method.

oxidation capacity and the need for enzymes, which in turn can be immunogenic, have prevented its therapeutic use *in vivo*. Moreover topical use could be limited by the presence of a competitive substrate for peroxidase, as thiocyanate is present in exocrine secretions. Nevertheless, it may be envisaged for *ex vivo* use as food preservative or device cleaner where thiocyanate is absent from the support environment to be protected.

In the present study, peroxidase system with 1.2 mM iodide required less H₂O₂ than with thiocyanate at the same concentration to inhibit *Candida* growth. Similar observations were reported for *Curvularia* haloperoxidase systems where 0.1 mM iodide contributed to reduce *Rhodotorula sp.* and *Candida sp.* in a more efficient manner than other substrates of the enzyme.²¹ In the present investigation, *C. albicans* was shown to be more susceptible to iodide/peroxidase systems in 3 different experimental designs: (i) in a liquid culture medium, (ii) in an interface model between solid medium culture (Sabouraud agar) and gel, (iii) in a biofilm model onto titanium powder and acrylic resin. In the case of the lactoperoxidase system using 1.2 mM iodide solubilized in a liquid medium, yeast growth was completely inhibited after 16 hours incubation. By contrast, when thiocyanate was used as substrate in the same lactoperoxidase system, the number of colony forming units reached at least 4 logarithmic units (4.625 ± 0.527 , $N = 6$) and more than 5 in different control conditions (from 5.3810 ± 0.055 , $N = 6$ to 5.741 ± 0.181 , $N = 6$). This difference of 1 logarithmic unit between G/GOD/KSCN/LPO and control means that the CFU/mL of liquid culture represented about 10% of that found in the control tubes while the iodine/lactoperoxidase system totally suppressed the yeast count. Similarly, turbidimetry data (A_{600nm}) confirmed

the growth inhibition in the presence of iodide substrate in comparison with thiocyanate, the other compounds of the peroxidase systems being identical and used at the same concentrations. Incorporation of a lactoperoxidase system in gel, in order to cover yeast-napped solid medium surfaces, led to similar conclusions. The lowest active amount of GOD (providing H₂O₂ from glucose) was at least 200 fold less important in the presence of KI when compared to KSCN. Moreover, at a GOD activity of 0.2 mU/mL, the iodide/lactoperoxidase system inhibited *Candida* biofilm formation on titanium and resin materials immersed in an infected broth while thiocyanate/lactoperoxidase was only able to delay it. In all these experiments, the enzyme sequence G/GOD was used as H₂O₂ donor. In the presence of a peroxidase sequence, H₂O₂ is totally transformed into hypohalous compound. Indeed, H₂O₂ can be detected by chemiluminescence (luciferin method) but only in the absence of peroxidase. Addition of peroxidase and of substrates (thiocyanate or iodide) abolished chemiluminescence (Figure 5) so that media with G/GOD, G/GOD/KSCN/LPO and G/GOD/KI/LPO enabled to specifically evaluate the effects of H₂O₂, OSCN⁻ and OI⁻ respectively without interference of one on the other.

The efficiency of an iodide/peroxidase system demonstrated *in vitro* through this investigation is difficult to transfer to either animal or human. Beside the toxicity of oxidant products on host cells and the immunogenicity of enzymes isolated for example from bovine milk, the oxidation of iodide is under the control of thiocyanate, which is not only present in several exocrine secretions (for example in human saliva) but is also preferentially used as substrate by lactoperoxidase. Indeed, simultaneous incorporation of both substrates in the same gel provided a decrease of the beneficial effect of 2 mM iodide in the presence of increasing concentrations of thiocyanate ranging from 0.25 to 4 mM, which correspond to the normal range of thiocyanate in saliva. The ability of OI⁻ to affect yeast growth and survival must be questioned in regard of the other iodine compounds, since clinical trials have shown limited or weak beneficial effects of other iodine formulations used for *in vivo* antifungal purposes. Re-examining this in the light of data obtained *in vitro* with the iodide/lactoperoxidase system, one could hypothesize that these poor results *in vivo* were due to small amounts of OI⁻ formed by peroxidases, present in the investigated medium, which preferentially oxidize thiocyanate. Finally, the molecular mechanisms, which would explain the specific toxicity of hypoiodite in comparison with other oxidant

products of peroxidase activities remain unknown. Previous studies have shown that *C. albicans* blastoconidia incubated with $^{125}\text{I}^-$ and lactoperoxidase could fix radioactive iodide through their own H_2O_2 metabolism and that this iodination was mostly detected in a cell wall mannoprotein.^{22,23} Further studies concerning the role of this specific iodination target could lead to a better understanding of the specific mechanisms of OI^- toxicity in *C. albicans*. Implication of these data for dentistry, especially for prosthesis care, is questionable since candidosis represents a frequent complication in edentulous patients, resulting from the high prevalence of dentures contaminated by *Candida*. Indeed, a previous screening had shown *Candida* contamination of upper prosthesis in 76% of denture wearers hospitalized in geriatric units for long term care.² The most frequent species isolated in this series were *C. albicans* (78%), *C. glabrata* (44%) and *C. tropicalis* (19%). Carriage of more than one yeast species was found in 49% of the contaminated dentures. There was a significant association between denture contamination and palatal mucosa colonization making mandatory *ex vivo* denture decontamination together with *in vivo* mucosa disinfection. Iodide/ H_2O_2 /lactoperoxidase system use in dentistry runs up not only against SCN^- presence in saliva, but also against catalase presence in some micro-organisms, among which different oral bacteria beside *Candida* itself. Catalase contributes to decrease the amount of available H_2O_2 substrate necessary for the peroxidase, and therefore the OI^- production. Overpassing both limitations of peroxidase use in oral medicine needs further research about OI^- enzymatic production in the oral environment.

Conclusion

In the absence of thiocyanate, iodide/peroxidase system has been shown active *in vitro* against *C. albicans* 1) in an liquid culture medium, 2) in an interface model (Sabouraud agar covered by a peroxidase gel), and 3) finally in a biofilm model onto titanium and acrylic resin. Efficiency of lactoperoxidase-generated OI^- to prevent *C. albicans* biofilm development allows refining iodine antifungal use in *ex vivo* conditions (for instance denture or material decontamination) when environment is free of thiocyanate.

Acknowledgments

The authors thank F Chagri, H Dewèvre and S Mavutukidi from the Haute Ecole Francois Ferrer (section of Medical Biology) for their enthusiastic participation in the investigations in the frame of their final memory. The authors

also thank Prof C de Burbure, for reviewing the manuscript writing and Prof M Stas, for all her helpful advice.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Horgan MM, Powderly WG. Oral fungal infections. In Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (editors). *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2003;443-455.
2. Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, et al. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008;25:222-228.
3. Ahariz M, Loeb I, Courtois Ph. *Candida*, oral candidosis and dentures. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*. 2010; in press.
4. Okuda K, Adachi M, Iijima K. The efficacy of antimicrobial mouth rinses in oral health care. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1998;39:7-14.
5. Abirami CP, Venugopal PV. Antifungal activity of three mouth rinses - *In vitro* study. *Indian J Pathol Microbiol*. 2005;48:43-44.
6. Ishikawa A, Yoneyama T, Hirota K, et al. Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria. *J Dent Res*. 2008;87:594-598.
7. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *In vitro* activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:272-276.
8. Warnke PH, Becker ST, Podschun R, et al. The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009;37:392-397.
9. Gorman SP, McCafferty DF, Woolfson AD, et al. A comparative study of the microbial antiadherence capacities of three antimicrobial agents. *J Clin Pharm Ther*. 1987;12:393-399.
10. Berkowitz RJ, Hugues C, Rudnick M, et al. Oropharyngeal *Candida* prophylaxis in pediatric bone marrow transplant patients. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1985;7:82-86.
11. Okuda K, Kimizuka R, Abe S, et al. Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. *J Periodontol*. 2005;76:2154-2160.
12. Mizrahi B, Domb AJ. Mucoadhesive tablet releasing iodine for treating oral infections. *J Pharm Sci*. 2007;96:3144-3150.
13. Utz JP. Chemotherapy for the systemic mycoses: the prelude to ketoconazole. *Rev Infect Dis*. 1980;2:625-632.
14. Lehrer RI. Antifungal effects of peroxidase systems. *J Bacteriol*. 1969;99:361-365.
15. Bosch EH, Van Doorne H, De Vries S. The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *J Appl Microbiol*. 2000;89:215-224.
16. Majerus P, Courtois P. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J Biol Buccale*. 1992;20:241-245.
17. Levitz SM, Diamond RD. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*. 1985;152:938-945.
18. Basivireddy J, Jacob M, Balasubramanian KA. Oral glutamine attenuates indomethacin-induced small intestinal damage. *Clin Sci*. 2004;107:281-289.
19. Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F, Baldoone DC, et al. Purification and characterization of human salivary peroxidase. *Biochemistry*. 1988;27:233-239.

20. Ahariz M, Mouhyi J, Louette P, et al. Adsorption of peroxidase on titanium surfaces: a pilot study. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:567-571.
21. Hansen EH, Albertsen L, Schäfer T, et al. *Corynebacterium* haloperoxidase: antimicrobial activity and potential application as a surface disinfectant. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:4611-4617.
22. Danley DL, Hilger AE, Winkel CA. Generation of hydrogen peroxide by *Candida albicans* and influence on murine polymorphonuclear leukocyte activity. *Infect Immun*. 1983;40:97-102.
23. Molloy C, Shepherd MG, Sullivan PA. Identification of envelope proteins of *Candida albicans* by vectorial iodination. *Microbios*. 1989;57:73-83.

Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry

Publish your work in this journal

Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry is an international, peer-reviewed, open access, online journal focusing on the latest clinical and experimental research in dentistry with specific emphasis on cosmetic interventions. Innovative developments in dental materials, techniques and devices that improve outcomes and patient satisfac-

tion and preference will be highlighted. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/clinical-cosmetic-and-investigational-dentistry-journal>

Dovepress



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Reçu le :
8 juillet 2008
Accepté le :
19 octobre 2009

Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Candidoses orales et prothèses dentaires

Oral candidosis and dentures

M. Ahariz^a, I. Loeb^a, P. Courtois^{b*}

^a Service de stomatologie et chirurgie maxillofaciale, CHU Saint-Pierre, université libre de Bruxelles (ULB), 129, boulevard de Waterloo, 1000 Bruxelles, Belgique

^b Laboratoire d'hormonologie expérimentale ULB, faculté de médecine (CP 626), Haute École F-Ferrer, université libre de Bruxelles (ULB), 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique

Summary

Yeasts belonging to the *Candida* genus usually colonize the human oral cavity. Immunocompromised patients or individuals with an imbalance of their oral microflora can develop yeast infections from this reservoir. However, saliva protects oral mucosa against candidosis; in turn, dry mouth is associated with increased yeast counts and candidosis risk. In vivo and in vitro studies have shown *Candida* incorporation into biofilms covering different biomaterials such as dentures: these biofilms may be an increased risk factor for invasive candidosis when the host immune system is compromised. Daily denture brushing is recommended to all wearers. Family or healthcare workers must take over this task when there is autonomy loss, especially in the elderly. In case of candidosis in denture wearers, decontamination of dentures is mandatory. Antimycotics (azoles, nystatin) must be kept for curative treatments of infected patients; they are less active against *Candida* biofilms on dentures and could lead to emergent resistance if applied daily to dentures against yeast colonization. There are several antiphlogistic solutions with antifungal properties. Nevertheless, literature data does not integrate all aspects of denture care: welfare of denture wearers, prevention of candidosis, biomaterial defects after decontamination processing, and taking into account possible *Candida* biofilm development. Daily brushing of dentures remains the key recommendation.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Candida*, Dentures, Oral hygiene

Résumé

Les levures du genre *Candida* sont des hôtes habituels de la cavité orale humaine. Les sujets dont les défenses immunitaires sont amoindries ou ceux dont la microflore orale est perturbée, peuvent développer une infection à partir de ce réservoir. La salive protège les muqueuses orales contre les candidoses ; la sécheresse buccale entraîne une augmentation du nombre de levures et du risque de candidose. Des études in vivo et in vitro ont montré la présence de cette levure sur les biofilms de différents biomatériaux dont ceux des prothèses dentaires amovibles : ces biofilms sont un facteur de risque supplémentaire de candidose invasive lorsque les défenses immunitaires de l'hôte diminuent. Le brossage quotidien des prothèses dentaires doit être préconisé chez tous les sujets qui en sont porteurs. L'entourage, famille ou personnel soignant, doit suppléer à ces mesures en cas de perte d'autonomie, particulièrement chez les personnes âgées. En cas de candidose chez un porteur de prothèse dentaire, la décontamination de la prothèse est essentielle. Le recours aux antimycosiques (azolés, nystatine) à cet usage est prohibé car ils sont peu actifs contre les biofilms des prothèses et pourraient sélectionner des *Candida* résistants. Peu d'études cliniques valides sont en faveur des solutions antiphlogistiques ou autres antiseptiques qui peuvent avoir des effets délétères sur les matériaux des prothèses. Le brossage régulier de la prothèse dentaire reste le principal geste à encourager.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : *Candida*, Prothèses dentaires, Hygiène orale

Les levures du genre *Candida* sont des hôtes habituels de la cavité orale humaine [1]. La colonisation de la bouche est précoce. Près de 40 % des enfants sont porteurs de

Candida dès l'âge de deux ans [4,5]. Il est également isolé, en faible nombre, chez 2 à 37 % des jeunes adultes en bonne santé [1-3]. En cas d'immunodépression ou de perturbation de la microflore orale, une infection peut se développer à partir de ce réservoir. Une augmentation du nombre de levures en bouche est associée aux appareils orthodontiques [6]. Les

* Auteur correspondant.
e-mail : philippe.courtois@ulb.ac.be (P. Courtois).

prothèses dentaires sont également colonisées par les levures [7].

Aspects biologiques du *Candida* sp.

Différentes espèces de *Candida* sont rencontrées dans la bouche : les plus fréquemment isolées sont *Candida albicans*, *Candida glabrata* (anciennement *Torulopsis glabrata*) et *Candida tropicalis*. *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* et *Candida kefyr* sont plus rarement observés [8]. *Candida dubliniensis* est associé aux candidoses orales des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [9]. Sur les muqueuses orales, ces espèces sont sous forme de blastoconidies (cellules rondes bourgeonnantes de plus ou moins 4 µ de diamètre) [10] ; le passage au parasitisme se traduit par l'apparition de filaments. Les levures peuvent surinfecter des lésions de parodontite ou de péri-implantite. Des blastoconidies de *Candida* ont aussi été observées dans les tubuli dentaires et dans les canaux dentaires [11].

La salive protège les muqueuses orales contre les candidoses : la sécheresse buccale ou xérostomie entraîne une augmentation du nombre de levures et du risque de candidose orale [8]. Les histatines salivaires inhibent les blastoconidies et la filamentation de la levure [12]. D'autres protéines salivaires, le lysozyme et la lactoferrine, contribuent à diminuer la viabilité des blastoconidies [13].

Les cellules épithéliales des muqueuses sécrètent des peptides ou défensines doués de propriétés anti-*Candida* par diminution de l'adhérence, activité fongicide directe et inhibition de la filamentation [17]. Les neutrophiles phagocytent les levures qui ont envahi un tissu et libèrent du lysozyme, de la lactoferrine ainsi de la myéloperoxydase dans la salive. Enfin, la susceptibilité des patients VIH+ à une candidose orale plaide pour un rôle protecteur de l'immunité cellulaire [18]. Des neutrophiles non fonctionnels (maladie granulomateuse chronique) ou des affections des lymphocytes T se traduisent par des infections dermiques et muqueuses récurrentes à *Candida* [19].

C. albicans est inhibé in vitro par les produits de peroxydases, que ce soit l'hypoiodite [14] ou l'hypochlorite [15]. Le peroxyde d'hydrogène à 3 % diminue de 90 % les spores de *C. albicans* en suspension, mais cette concentration est toxique pour les muqueuses [16]. Le *Candida* est un microorganisme catalase positif.

Aspects cliniques : les candidoses

Les infections par les levures du genre *Candida* (anciennement monillias ou candidiasis) sont appelées candidoses [8]. Elles peuvent être orales et digestives, cutanées (intertrigo, onyxis et périonyxis, otite externe), gynécologiques, ophtalmiques (kératomycose), bronchiques et pulmonaires. Un envahissement général est possible. Dans la cavité orale, différentes

Tableau I
Facteurs favorisant la survenue d'une candidose.

Âge

Enfance
Vieillesse

Assuétudes

Tabagisme

Médicaments

Antibiotiques à large spectre
Corticostéroïdes
Chimiothérapie cytotoxique

Pathologies orales

Prothèses, appareils dentaires
Sécheresse buccale
Radiothérapie
Médicaments xérostomians
Maladies des glandes salivaires...

Pathologies immunitaires

Infection par le VIH
Neutropénie
Déficit de l'immunité cellulaire

Pathologie métabolique

Diabète

Pathologie nutritionnelle

Déficience en fer
Malnutrition

VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

lésions peuvent être observées (muguet, chéillite, perlèche, glossite, amygdalite, pharyngite). Certains facteurs [20] sont favorisants (tableau I).

Symptomatologie

La présence de *Candida* en grand nombre est souvent asymptomatique ; certains patients se plaignent de sensation de brûlure, d'altération du goût ou de difficultés pour s'alimenter. Plusieurs formes cliniques sont possibles [8].

La candidose pseudomembraneuse ou muguet peut atteindre toutes les muqueuses orales et se traduit par de petites plaques blanchâtres, détachables ; lorsque ces plaques sont grattées, la muqueuse érythémateuse sous-jacente peut légèrement saigner.

La candidose érythémateuse atrophique se traduit par des plaques rouges sur le palais ou sur une langue atrophique décapillée. Cette forme clinique est particulièrement associée à une xérostomie, des déficiences nutritionnelles ou des irritations locales ; elle est souvent rencontrée chez les patients porteurs de prothèse.

La candidose hyperplasique se traduit par des lésions blanchâtres et concerne la langue, les commissures internes des lèvres ou les vestibules. À l'opposé des infections pseudo-

membraneuses, ces lésions ne peuvent être détachées. En cas d'infection chronique, la nourriture ou le tabac peuvent colorer les lésions en brun. Chez les patients VIH +, le diagnostic différentiel est à faire avec la « leucoplasie orale chevelue » due au virus Epstein-Barr. La candidose hyperplasique est particulièrement associée au tabagisme et au statut non sécréteur des antigènes du groupe sanguin.

Candida peut aussi infecter les commissures labiales (chéilite angulaire ou perlèche) et y occasionner des lésions fissurées accompagnées d'inconfort, de brûlures ou de douleurs.

Les candidoses oropharyngées peuvent s'étendre à l'œsophage. L'œsophagite s'accompagne de dysphagie ou de douleur rétrosternale.

Diagnostic

Le diagnostic de candidose est clinique. La recherche du micro-organisme n'est pas toujours contributive, *Candida* étant un commensal de la bouche. Le produit de grattage des lésions actives, examiné avec 10 % d'hydroxyde de potassium montre les pseudohyphes et les blastoconidies. La mise en culture n'est nécessaire qu'en absence de réponse à un traitement antifongique adéquat. L'écouvillonnage des surfaces orales permet un ensemencement sur milieu de Sabouraud ou sur milieu chromogénique [21]. Celui-ci permet le diagnostic d'espèce (fig. 1). Le test dit de germination ou de filamentation caractérise *C. albicans*. L'identification des autres espèces n'est pas réalisée en routine. Des techniques de biochimie, d'immunologie et de biologie moléculaire sont parfois utilisées pour détecter, caractériser et identifier des souches de *Candida*. Les biopsies sont rarement utiles ou indiquées.

Traitement

Il existe une grande variété d'agents antifongiques : nystatine, azolés, échinocandines (caspofungine, micofungine). Le succès et l'utilisation préventive des premiers composés azolés chez

les patients immunodéprimés (candidose mucocutanée chronique, sida, etc.) ont favorisé l'apparition de souches résistantes au miconazole [22] ou au fluconazole [23]. La recherche pharmaceutique développe de nouveaux dérivés (itraconazole, voriconazole, etc.) sans pour autant éviter les mécanismes adaptatifs des levures. Des résistances croisées ont déjà été décrites vis-à-vis du fluconazole et de l'itraconazole [23].

Candidoses et biomatériaux

Des études in vivo et in vitro ont montré la présence de la levure dans les biofilms sur cathéters, fils de sutures, membranes biodégradables et prothèses dentaires amovibles. Les biofilms sont des communautés de microorganismes (de même espèce ou d'espèces différentes) maintenus dans une matrice polysaccharidique qui se développent à la surface d'un support vivant (biotique) ou inerte (abiotique). Les microorganismes des biofilms se caractérisent par un phénotype distinct de celui exprimé en suspension et par une susceptibilité réduite aux antibiotiques ou antifongiques. La fig. 2 montre un biofilm à *C. albicans* produit au laboratoire sur un feuillet de titane. Les biofilms à *Candida* [24] sont associés à la colonisation des muqueuses orales et digestives lorsque les défenses de l'hôte diminuent. *C. albicans* produit plus de biofilm en termes de poids sec avec une architecture plus complexe comparé à *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* ; moins de 10 % des souches de *C. albicans* en produisent contre 80 % des souches non *albicans*. Les souches invasives sont le plus souvent des souches capables de former des biofilms. Tous les traitements antifongiques actuels sont inefficaces contre les biofilms in vitro. Les mécanismes de cette résistance sont encore mal compris. Elle est indépendante de la matrice du biofilm et paraît liée à des modifications phénotypiques permettant l'expression de certains gènes gérant les pompes qui rejettent les principes actifs à l'extérieur des cellules. Les

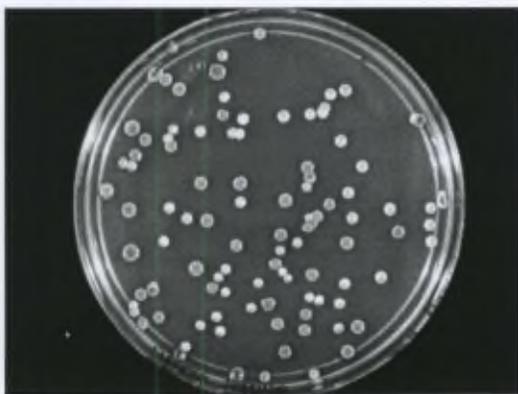


Figure 1. Culture sur milieu chromogénique permettant de différencier au moins deux espèces de *Candida* selon la couleur des colonies.

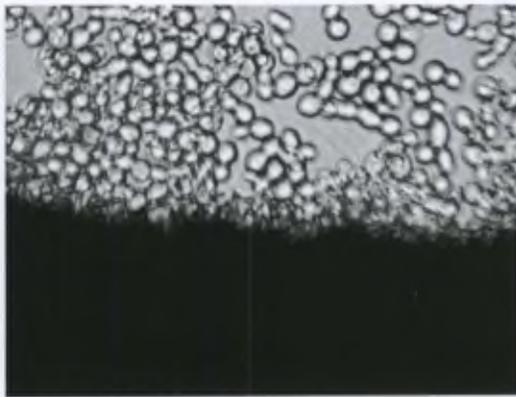


Figure 2. Biofilm à *Candida albicans* produit in vitro sur un feuillet de titane.

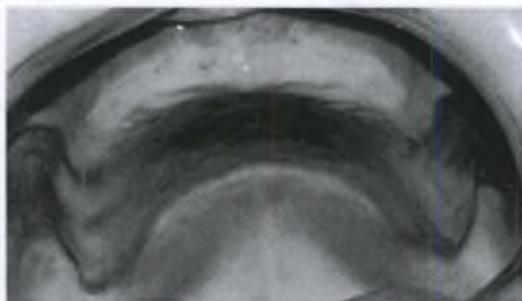


Figure 3. Érythème de la muqueuse palatine dessinant le contour d'une prothèse amovible supérieure contaminée par *Candida albicans*.

membranes des levures organisées en biofilm contiennent moins d'ergostérol que celles des levures libres ; les voies métaboliques de l'ergostérol constituent des cibles aux azolés. Les échinocandines (casposungine et micafungine) qui sont des inhibiteurs de la synthèse de la matrice polysaccharidique, limitent la croissance des biofilms. L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent aussi la croissance des biofilms en inhibant la synthèse des prostaglandines par les levures. Le farnesol et le tyrosol sécrétés par l'ensemble des levures en biofilm atteignent des concentrations biologiquement significatives (phénomène du *quorum sensing*) : le farnesol inhibe la formation des filaments tandis que le tyrosol la stimule [25] ; ces deux activités sont nécessaires à la croissance et à la maturation des biofilms.

Hygiène des prothèses dentaires

Les prothèses dentaires offrent des surfaces particulièrement propices à la colonisation par le *Candida*. La stomatite prothétique (fig. 3) est une inflammation chronique irritative souvent liée à une colonisation de la prothèse par *Candida*, parfois par d'autres bactéries. Elle est rarement due à une réponse allergique au matériel prothétique [23].

S'il est absurde de vouloir éradiquer un commensal du milieu buccal, il est important de considérer la prothèse comme un réservoir de *Candida*, source possible d'une infection des muqueuses. Le brossage quotidien est à préconiser chez tous les porteurs de prothèse dentaire ; lors d'une candidose, la décontamination de la prothèse est nécessaire. L'entourage – famille ou personnel soignant – doit souvent suppléer les difficultés que rencontrent les personnes âgées (perte d'autonomie, de dextérité, de mémoire). Les antimycosiques (azolés, nystatine), moins actifs contre les biofilms sur prothèse et pouvant entraîner des résistances ne sont pas conseillés pour cet usage. L'utilisation de solutions antiphlogistiques à base de plantes, dont certaines sont fongicides in vitro, rencontre un grand succès mais ne repose sur aucune donnée clinique fiable.

Les antiseptiques des bains de bouche ou des tablettes effervescentes sont fongicides. L'hypochlorite de sodium – composé majeur de l'eau de Javel et aussi produit in vivo par la myéloperoxydase – a un effet anti-*Candida*. L'eau ozonée avec ou sans ultrasons réduit les levures adhérentes à la résine. L'utilisation des ultrasons réduit les concentrations fongicides nécessaires de la plupart des antimycotiques ou antiseptiques. L'utilisation de four à micro-ondes n'est pas conseillée car les conditions qui suppriment les levures sont trop proches de celles qui abîment la prothèse. Mal utilisés, certains produits peuvent endommager les matériaux : l'usage répété de chlorhexidine colore les résines en brun, l'hypochlorite à forte dose les blanchit. L'eau oxygénée n'est active qu'à doses très élevées proche de la toxicité pour les muqueuses ; les *Candida* s'y adaptent en exprimant davantage de catalase et de glutathion-oxydase. L'utilisation de molécules des sécrétions exocrines est une voie de recherche intéressante : des études in vitro [14,15] ont déjà montré le bénéfice des systèmes peroxydases (avec du thiocyanate, du chlorure et surtout de l'iodure), du lysozyme et de la lactoferrine. La transposition en clinique ne donne pas encore les résultats escomptés et des études incluant un grand nombre de patients sont nécessaires. Le brossage régulier de la prothèse dentaire reste le principal geste à encourager.

Conflit d'intérêt

Pas de conflits d'intérêts à déclarer en lien avec l'article.

Remerciements

Les auteurs remercient le Dr C. de Burbure, MD PhD, pour la correction des textes anglais.

Références

- [1] Odds FC. Mycology in oral pathology. Acta Stomatol Belg 1997;94:75-80.
- [2] Brawner DL, Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 1989;27:1335-41.
- [3] Wang H, Wang Y, Chen J, Zhan Z, Li Y, Xu J. Oral yeast flora and its internal transcribed spacer (ITS) sequence diversity among a large cohort of medical students in Hainan. Mycopathologia 2007;164:65-72.
- [4] Hannula J, Saarela M, Jousimies-Somer H, Takala A, Syrjänen R, Könönen E, et al. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. Oral Microbiol Immunol 1999;14:176-82.
- [5] Rozkiewicz D, Dañiluk T, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Stokowska W, Pawinska M, et al. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. Adv Med Sci 2006; 51(5):187-90.

- [6] Addy M, Shaw WC, Hansford P, Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br J Orthod* 1982;9:158-63.
- [7] Vandenbussche M, Swinne D. Yeasts oral carriage in denture wearers. *Mykosen* 1984;27:431-5.
- [8] Horgan MM, Powderly WG. Oral fungal infections. *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone;2003. p. 443-55 (chapitre 21).
- [9] Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:3007-12.
- [10] Gorman SP, Jones DS, McGovern JG, Woolfson AD. Frequency distribution of *Candida albicans* blastospores adhered to mucosal epithelial cells *in vitro*. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48:1315-9.
- [11] Siqueira Jr JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:632-41.
- [12] Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun* 1991;59:2549-54.
- [13] Samaranyake YH, Samaranyake LP, Pow EH, Beena VT, Yeung KW. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected Southern Chinese cohort. *J Clin Microbiol* 2001;39:3296-302.
- [14] Majerus P, Courtois P. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J Biol Buccale* 1992;20:241-5.
- [15] Tournay C, Majerus P, Fourtois M, Moguilevsky N, Bollen A. Candidicidal activity of the human recombinant myeloperoxidase system. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:142-3.
- [16] Tombes MB, Galluci B. The effects of hydrogen peroxide rinses on the normal oral mucosa. *Nurs Res* 1993;42:332-7.
- [17] Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against *Candida* species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res* 2005;84:445-50.
- [18] Challacombe SJ, Naglik JR. The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv Dent Res* 2006;19:29-35.
- [19] Atkinson JC, O'Connell A, Aframian D. Oral manifestations of primary immunological diseases. *J Am Dent Assoc* 2000;131:345-56.
- [20] Soysa NS, Samaranyake LP, Ellepola AN. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis - a brief overview. *Oral Dis* 2008;14:138-43.
- [21] Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol* 2007;103:2046-55.
- [22] Carrilo-Muñoz AJ, Tur C, Torres J. *In-vitro* antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole, and miconazole against yeasts of the *Candida* genus. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:815-9.
- [23] Ellepola AN, Samaranyake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:172-98.
- [24] Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol* 2005;43:191-208.
- [25] Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *PNAS* 2004;101:5048-52.



Denture contamination by yeasts in the elderly

Astrid Vanden Abbeele¹, H el ene de Meel², Mohamed Ahariz³, Jean-Paul Perraudin⁴, Iago Beyer⁵ and Philippe Courtois⁶

¹Universit  Libre de Bruxelles (ULB), Department of Dentistry, Erasme CHU, route de Lennik 808 (CP 621), 1070 Brussels, Belgium; ²Universit  Libre de Bruxelles (ULB), Department of Stomatology, Brugmann CHU, place Van Gehuchten 4, 1020 Brussels, Belgium; ³Universit  Libre de Bruxelles (ULB), Department of Stomatology, Saint-Pierre CHU, boulevard de Waterloo 129, 1000 Brussels, Belgium; ⁴Biopole, rue Herman Meganck 21, 5032 Gembloux (Parc Crealys - Les Isnes), Belgium; ⁵Universit  Libre de Bruxelles (ULB), Department of Geriatrics, Brugmann CHU, place Van Gehuchten 4, 1020 Brussels, Belgium; ⁶Universit  Libre de Bruxelles (ULB), Laboratory of Experimental Hormonology ULB & Haute Ecole F. Ferrer, route de Lennik 808, 1070 Brussels, Belgium

doi:10.1111/j.1741-2358.2007.00247.x

Denture contamination by yeasts in the elderly

Objectives: The aim of this study was to investigate yeast carriage in healthy denture wearers by swabbing and to evaluate the effect of denture hygiene habits.

Materials and methods: Denture wearers ($n = 87$) without evidence of denture stomatitis or any other oral disease were investigated by separately swabbing the fitting surface of the upper denture and the corresponding palatal mucosa in contact with the appliance. In a group of volunteers, a gel without any active compound was spread on the palatal side of the denture once in every morning for 2 weeks.

Results: Screening showed *Candida* colonisation of upper prosthesis in 75.9% of individuals. The most frequent species isolated were *Candida albicans* (77.9% of the positive cultures), *Candida glabrata* (44.1%) and *Candida tropicalis* (19.1%). Carriage of more than one yeast species was found in 48.5% of the contaminated dentures. There was a statistically significant association between denture contamination and palatal mucosa colonisation (chi-squared test: $p < 0.0001$). Repeated swabbings after 1 week as well as during a weekly follow-up for 1 month confirmed the denture contamination and its degree of severity. A daily gel application produced a yeast-count decrease to 10% of the initial value after 2 weeks (chi-squared test: $p = 0.0134$ and $p = 0.2841$ for prosthesis and palatal mucosa, respectively).

Conclusion: This study documented the reliability of oral swabbing when investigating yeast carriage in healthy denture wearers. Moreover, just a diagnostic tool, sampling upper dentures for *Candida* could be the opportunity to verify the patient's compliance to hygiene advice.

Keywords: *Candida*, dentures, hygiene, yeast.

Accepted 28 April 2008

Introduction

Candida species are commensal yeasts isolated from the oral environment in a large proportion of healthy individuals¹⁻⁴. *Candida albicans* is the yeast species most frequently found in isolates; the other yeasts encountered are: *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida stellatoidea*, *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata*⁵. Yeast infections often affect the elderly⁵⁻⁸. Moreover, some authors⁹ have shown a significant association between mouth colonisation and infection by yeasts. Denture wearing and deficient oral hygiene are recognised as two local factors predisposing to

Candida overgrowth as well as to oral infections¹⁰⁻¹³. *Candida albicans* on denture material is also considered as the major cause of denture-associated oral mucosa erythema¹⁴. Though *Candida* oral pathologies originate in commensal yeasts, contamination from person to person (elderly patients and health-care workers) has been demonstrated¹⁵. Detection of denture contamination by yeasts can thus be useful to promote better oral hygiene. Several sampling methods (mouth rinsing, denture imprint and swabbing) are available to detect oral yeast carriage; swabbing is particularly easy in elderly subjects. The aim of this study in healthy denture wearers was to report mycological data related to the swabbing

procedure, to analyse the variability of results due to the sampling technique itself and to describe the distribution of yeast carriage between the denture and the adjacent mucosa.

Patients and methods

Patients

This study was carried out collaboratively by the departments of Geriatrics and Stomatology in the Brugmann Hospital (Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium) over a period of 6 months (November 2005–April 2006). A total of 87 healthy denture wearers (61 females and 26 males; median age: 83 years; range: 55–97 years) without evidence of denture stomatitis or any other oral disease were investigated by separately swabbing the fitting surface of the upper denture and the corresponding palatal mucosa in contact with the appliance. Inclusion criterion was wearing a maxillary removable acrylic prosthesis and exclusion criteria were the presence of stomatitis, acute illness, chronic infection and the use of oral hygiene care products with antimicrobials or antifungals. At the point of enrolment in the study and through the investigation, the absence of exposure to medication susceptible to upset the oral microbiological balance was assessed by checking the medical files. During the follow-up time (mainly 1 week, sometimes up to 4 weeks), only one individual developed, 2 weeks after the initial screening, a yeast infection of the mouth, with painful erythema, thrush and glossitis and subsequently received antimycotics; this patient was included for the contaminated-denture rate determination but not for the hygiene follow-up. All subjects or their tutors were informed about the purpose and procedures to be used in this survey and signed an informed consent form; this investigation was approved by the local ethical committee. Medical anamnesis, oral examination and swab samplings of all subjects were conducted by a team of two dentists accompanied by one biologist who organised all the laboratory procedures. The studied denture wearers ($n = 87$) had a mean age of 82.3 ± 8.9 years (median: 83.0 years) with no significant difference (unpaired t -test; $p = 0.0610$; Mann–Whitney test: $p = 0.1753$) between females (83.2 ± 8.5 years; median: 84.0 years) and males (80.3 ± 9.7 years; median: 81.5 years); 92% of the tested population was over 70 years of age. Table 1 documents the prosthetic status of the recruited subjects. The superior removable acrylic denture was complete in 82.8% of cases and partial in

Table 1 Prosthetic status of the investigated edentulous patients.

	All patients ($n = 87$)	Yeast positive ($n = 66$)	Yeast negative ($n = 21$)
Superior removable prosthesis status			
Partial	15	11	5
Complete	72	55	30
Superior prosthesis damage			
Not damaged (<5 years)	36	25	11
Damaged (>10 years)	51	41	10
Inferior removable prosthesis status			
Absence	19	13	6
Presence	68	53	15
Palatal mucosa aspect			
Healthy	65	49	16
Redness	22	17	5

others (17.2% of cases), with (10.3% of cases) or without metallic framework (6.9% of all patients). The maxillary denture was free of damage in 53.7% of cases. Among the subjects with a maxillary prosthesis, 78.2% also wore mandibular dentures. Palatal mucosa was healthy in all subjects but a borderline redness of the mucosa (without any complaints or other signs of disease) was observed in 25.3% of cases. During the same period of time, 44 appliance-free young volunteers (26 females and 18 males; median age: 23 years; range: 20–25 years) were investigated by swabbing separately the tongue and the corresponding palate mucosa.

Sampling

In the elderly group, the presence of yeast was assessed at least two hours after the last meal on both the palatal mucosa and the acrylic surface of the removable prosthesis; positive denture wearers were controlled 1 week later. Moreover, 11 subjects among these (eight females and three males aged from 77 to 94 years; median age: 82 years) were tested during two additional weeks and 10 others (four females and six males aged from 57 to 94 years; median age: 78 years) were submitted to daily care involving the application of a gel without any active compounds against *Candida*: a controlled amount of gel was spread once on the palatal side of the acrylic surface every morning for 2 weeks and a swab sampling of the prosthesis and palate was carried out after the 2-week hygiene care programme in addition to the swabbing performed before the care programme. The gel consisted of a

polyglycerol methacrylate polymer, starch hydrolysed hydrolysate and hydroxyethylcellulose and water. This oral gel was conditioned in monodose bags (5 g/bag); each bag was weighed before and after use in order to control the administered amount of gel. In young people, the presence of yeasts was assessed at least 2 h after the last meal, on the tongue and palatal mucosa using a similar material and procedure for sample collection as in the denture wearers.

Mycological investigations

All swabs were inoculated on CHROMagar plates (BD Diagnostics™, Erembodegem, Belgium) which were incubated for 2 days at 37°C. Cultivable *Candida* species were then identified from the macroscopic morphology of colonies¹⁶ and from additional tests after subculture on Sabouraud agar with chloramphenicol and gentamycin (BD Diagnostics™). The latter involved namely germ tube formation in human serum, chlamydoconidia formation on rice agar tween (RAT) medium and API™ yeast identification system. Green colonies on CHROMagar with germ tubes and chlamydoconidia formation were considered as *C. albicans*; other strains were identified on the basis of their carbohydrate assimilation pattern using the ID32C API system (bioMérieux™, Marcy-l'Étoile, France). *Candida* insensitivity to oral care gel was assessed *in vitro*. *Candida albicans* ATCC 10231 (Culti-Loops™, Oxoid™, Basingstoke, UK) was grown at 37°C on Sabouraud–gentamycin–chloramphenicol agar (BD Diagnostics™, Belgium); all the experiments were performed on the third subculture. A yeast suspension in Sabouraud broth (OXOID™ CM147, Basingstoke, UK) was adjusted to 8 blastoconidia/μl. Inocula (20 μl) of the suspension were spread onto the surface of a Sabouraud plate and then covered by 2 g of oral care gel. Colonies were counted after 2 days incubation at 37°C and controls were performed in absence of gel covering.

Statistics

Data were analysed using the GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software™, San Diego, CA, USA). Paired and unpaired *t*-tests of Student, Wilcoxon signed-rank tests, Mann–Whitney, chi-squared, Fischer's exact tests, risk factor analysis and odds ratio calculations were performed using the same software. Mean values were expressed with their related standard deviation if not indicated otherwise.

Results

Reliability of *Candida* count from swabs

Successive counts ($n = 6$) of four different swabbed Petri dishes facilitated calculation of a coefficient of variation, which ranged between 0.27% (mean \pm SD: 75 ± 1 colony-forming unit (CFU)/dish) and 1.38% (912 ± 3 CFU/dish). *Candida* counts performed by two independent observers (Fig. 1) provided data that were not statistically different (paired *t*-test of Student: $p = 0.7403$, $n = 8$); interobserver difference was $1.0 \pm 0.4\%$ for counts ranging between 77 and 948 CFU/dish ($n = 6$) and $10.2 \pm 2.1\%$ for two counts above 2000 CFU/dish (2021 and 2212 CFU/dish). Figure 2a illustrates the repeatability of *Candida* count from two successive swabs of the same material (prosthesis or mucosa): variability

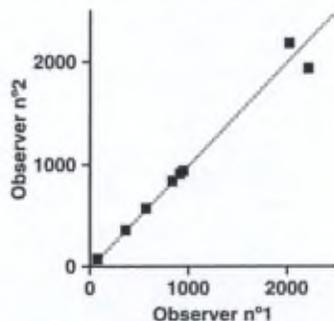


Figure 1 Interobserver correlation for *Candida* counts.

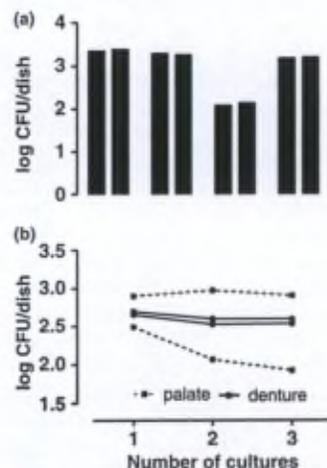


Figure 2 (a) Variability of yeast counts between two successive swabbings. (b) Variability of yeast counts in three different cultures originating from the same swab.

Table 2 Strength of association between palatal mucosa colonisation and maxillary prosthesis contamination.

Maxillary prosthesis contamination	Palatal mucosa colonisation	
	Yes	No
Yes	61 (a)	5 (b)
No	2 (c)	19 (d)
Relative risk $[a/(a+b)]/[c/(c+d)] = 9.705$ (relative risk equals 1 in absence of association).		
Difference between proportions $[(a/(a+b)) - (c/(c+d))] = 82.9\%$ (it equals 0 in absence of association).		
Odds ratio $(a/b)/(c/d) = 115.9$ (odds ratio equals 1 in absence of association).		

ranged within an interval of 0.1 logarithmic unit. Figure 2b shows the variability range of data for three successive cultures obtained from the same swab: this was inside an interval of 0.5 logarithmic unit.

Mycological data

Swabbing of the palatal side of the prosthesis was yeast-positive in 66 out of 87 subjects (75.9%), while the adjacent mucosal surface was positive in 63 of 87 cases (72.4%); 68.2% of subjects simultaneously showed contamination of both denture and mucosa. The contaminated maxillary dentures were heavily colonised (more than 50 CFU) in 90.9% of cases and more than one yeast species was found in 50.0% of samples. There was a statistically significant association between denture contamination and palatal mucosa colonisation (chi-squared test: $p < 0.0001$): denture wearing was found to be a significant risk factor for yeast colonisation (Table 2). Indeed, 92.4% of contaminated denture wearers also carried *Candida* on their mucosa, while only 9.5% of yeast-free denture wearers were *Candida*-positive on their mucosa: the difference between the proportions was 82.9% (it equals 0 in absence of association). The strength of association was appreciated by calculating the relative risk, with odds ratios of 9.705 and 115.9, respectively. The median value in yeast count ratio for palatal mucosa over denture was 4.8% in subjects wearing heavily contaminated dentures (that is more than 50 CFU and less than 10^4 CFU – a range where this ratio can be calculated). Identified yeast species in isolates are listed in Table 3. Taking all subjects into account, either with denture contamination or with mucosal colonisation, *Candida albicans* was the main species encountered, occurring in 77.9% of yeast-positive subjects. *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* were

Table 3 Prevalence of the different species identified in 68 maxillary denture wearers.

	Yeast carrier (n = 68)	
	(Number)	(%)
<i>Candida albicans</i>	53	77.9
<i>Candida glabrata</i>	30	44.1
<i>Candida tropicalis</i>	13	19.1
<i>Candida lusitanae</i>	2	2.9
<i>Candida sake</i>	2	2.9
<i>Candida dattila</i>	1	1.5
<i>Candida kefyr</i>	1	1.5
<i>Candida rugosa</i>	1	1.5
<i>Geotrichum capitum</i>	1	1.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	2.9

isolated from 44.1 and 19.1% of swabs, respectively. Other *Candida* species (*Candida lusitanae*, *Candida sake*, *Candida dattila*, *Candida kefyr* and *Candida rugosa*) and additional (*Geotrichum capitum* and *Saccharomyces cerevisiae*) were detected at a lower rate (1.5–2.9%). An identical species or association was found simultaneously on dentures and palatal mucosa in 95.1% ($n = 61$) of cases: 100.0% of the mono-colonised ($n = 38$) and 87.0% of the pluri-colonised subjects ($n = 23$). In subjects followed for 4 weeks without gel application, one new species appeared during the investigation in two out of 11 cases (18.2%), while one species disappeared in one case (9.1%). Data management of all samples (dentures and palatal mucosa) was conducted separately in patients with presumed (or doubtful) mucosal redness and in patients with an indisputably healthy palatal mucosa. Statistical discrepancy, if any (chi-squared test and Fischer's exact test), could then be demonstrated in terms of overall yeast carriage, *C. albicans* carriage, heavy yeast carrier, heavy *C. albicans* carrier or number of different species ($p > 0.05$). In young people without orthodontic appliances ($n = 44$), yeast colonisation of tongue or palatal mucosa was observed in 25.0 and 27.3% of cases, respectively; the only heavy yeast carrier (>50 CFU) admitted the use of antimicrobials during the previous days. The yeast count was always inferior to 10 CFU except in two cases. The tongue and palatal mucosa were simultaneously colonised in 64.3% of yeast-positive volunteers.

Effect of the professional health care

Table 4 shows the results of performing two swabbings of both dentures and palate at an interval of 1 week in 46 subjects. The second yeast count represented 100.0 and 53.2% (median values) of the

	Number of cases
Yeast count from denture swabs	
Remains in the range 'initial count \pm 1 logarithmic unit'	41
Decreases under the limit 'initial value - 1 logarithmic unit'	5
Increases above the limit 'initial value + 1 logarithmic unit'	0
Yeast count from palatal mucosa swabs	
Remains in the range 'initial count \pm 1 logarithmic unit'	39
Goes below the limit 'initial value - 1 logarithmic unit'	6
Exceeds the limit 'initial value + 1 logarithmic unit'	1
	Median value
Second over 1st swabbing count ratio from denture	1.00
Second over 1st swabbing count ratio from palatal mucosa	0.53

Table 4 Comparison between two swabbings performed at a 1-week interval in 46 subjects.

initial count obtained from prosthesis and palatal mucosa respectively; the Mann-Whitney test ($p = 0.3088$, NS) and the Wilcoxon signed-rank sum test ($p = 1.0000$, NS) did not show any statistically significant discrepancy. Taking into account, the range of ± 1 logarithmic unit, 5 out of 46 (10.9%) vs. 6 (13.0%) subjects presented a CFU decrease under the limit 'initial value minus 1 logarithmic unit' from their dentures and palatal mucosa, respectively; only one patient showed an increased yeast count in the second swab from palatal mucosa. These results minimised the hygiene-stimulation effect produced by the investigators themselves.

A group of 11 subjects was followed for two additional weeks. For 10 other denture wearers, an oral gel conditioned in a 5-g bag was spread on the palatal side of the acrylic surface once in every morning for 2 weeks. The administered amount per patient averaged 2.49 ± 0.72 g/day ($n = 143$ weighted bags). This oral gel has been shown ineffective *in vitro* against typed strain *Candida albicans* ATCC 10231. Indeed, the recovery percentage in the presence of the oral gel averaged $110.1 \pm 8.6\%$ ($n = 7$) of the CFU count found in absence of gel through seven independent *in vitro* experiments conducted every 2 months during the course of the clinical trial (Table 5). Nevertheless, this gel application protocol was observed to produce a yeast-count reduction to 10% of the initial value for prosthesis contamination after 2 weeks (chi-squared test: $p = 0.0134$), but not for palatal mucosa colonisation (chi-squared test: $p = 0.2841$). Table 6 summarises these data.

Discussion

In order to be able to colonise and infect the oral environment, yeasts must first adhere to oral

Table 5 CFU counts on Sabouraud plates sowed with *Candida albicans* ATCC 10231 and then recovered by an oral gel.

	Oral gel % of control (n)	Control, i.e. no gel CFU/plate (n)
Time 0	124.8 ± 5.4 (6)	262 ± 8 (6)
Time 2 months	101.6 ± 8.0 (6)	63 ± 3 (6)
Time 4 months	112.4 ± 9.3 (6)	89 ± 2 (6)
Time 6 months	116.0 ± 11.4 (6)	150 ± 12 (6)
Time 8 months	100.0 ± 6.6 (6)	86 ± 4 (6)
Time 10 months	104.8 ± 5.8 (6)	83 ± 2 (6)
Time 12 months	111.1 ± 7.8 (6)	81 ± 5 (6)

surfaces (host mucosa or prosthetic materials) or coaggregate with oral bacteria. Initial attachment is followed by proliferation and biofilm formation which enhances yeast resistance to salivary host defences and antimicrobial agents¹⁷. Roughness of biomaterials such as acrylic polymers and hydrophobicity of yeast cells could explain the high prevalence of *Candida* contamination on dentures¹⁸. *Candida* detection on upper dentures could be useful to follow the progress of yeast colonisation on the one hand and to investigate the benefit of antifungal prophylaxis by drugs or natural antifungal proteins/systems on the other. In this perspective, the procedures used to evaluate yeast biomass in the oral environment need to be validated and the effect of the investigation design on patients' hygiene must be specified.

Reliability of *Candida* count from swabs

Procedures to quantify yeast biomass *in vitro* are not applicable *in vivo* for epidemiological studies and hygiene purposes, particularly as denture wearers

Table 6 Palate vs. prosthesis yeast counts: effects of a daily gel application on the palatal surface of dentures for 2 weeks.

	Number of cases	
	gel	Nil
Yeast count from denture swabbings		
Remains in the range 'initial count \pm 1 logarithmic unit'	3	8
Goes below the limit 'initial value - 1 logarithmic unit'	6	1
Exceeds the limit 'initial value + 1 logarithmic unit'	1	2
Total	10	11
Yeast count from palatal mucosa swabbings		
Remains in the range 'initial count \pm 1 logarithmic unit'	5	7
Goes below the limit 'initial value - 1 logarithmic unit'	5	3
Exceeds the limit 'initial value + 1 logarithmic unit'	0	1
Total	10	11

are not always compliant. Yeast extraction from the oral environment can be carried out by rinsing, imprinting or swabbing. Swabs and imprints are more suitable for accessing yeasts adherent to surfaces; swabbing is technically easier for studies on a larger scale. Yeast counts after swab culture reflect the biomass present on the oral surfaces, but the number of yeast cells included in oral biofilms and their extraction by swabbing should be more efficient. Data in Fig. 2 suggested that CFU counted on the agar medium represented only a small part of the cells harvested, as assessed by three successive spreadings of the same cotton that provided similar data in the range interval of 0.1 logarithmic unit. Furthermore, two successive swabs of the same oral surface yielded similar quantities of yeast cells (in the range interval of 0.5 logarithmic unit) indicating that the extracted fungal cells by one swab from the oral surface represented only a small part of the fungal cells present on this surface. This double low extraction rate contributes to decrease the variability due to the sampling itself. Repeated sampling (at an interval of 1 week) of 46 healthy denture wearers showed yeast counts remaining in the same range \pm 1 logarithmic unit for 89.1% of the denture swabs and 84.7% from the mucosal samples. Exceeding the upper limit (+1 logarithmic unit) was incidental ($n = 1$ for palate) and moving below the lower limit (-1 logarithmic unit), occurred in 10.9 and 13.0% of denture and mucosa swabs, respectively; this could be attributed to behavioural change in hygiene practice following the first visit.

The palatal vs. denture yeast counts

These findings confirmed that dentures are often contaminated by yeasts (75.9% of 87 prostheses)

and that *C. albicans* is the species predominantly found in the mouth. These data confirm several previous studies in hospitalised patients¹⁹, especially those from geriatric units for long-term care^{9,11}. Applying the 50-CFU breakpoint for oral swabs taken from dentures, 90.9% of the contaminated subjects were considered heavy carriers. Despite a statistically significant association between denture contamination and palatal mucosa colonisation, the palatal mucosa over denture yeast count ratio showed a preferential attachment of yeasts onto dentures rather than on mucosa. Further investigations on a larger group of denture wearers are needed to ascertain the predictive value of the *Candida* count ratio from the biomaterial surface and adjacent mucosa to develop oral candidosis.

Hygiene effect

A second swabbing taken in 46 patients after an interval of 1 week demonstrated only minor variations, thus minimising the hygiene-stimulation effect produced by the investigators themselves. In contrast, the hygiene programme with an oral gel prescription led to a decrease of yeast carriage after 2 weeks even in the absence of any active compounds in the gel. It could be hypothesised that the gel not only stimulated hygiene practice, but also modified yeast attachment conditions and biofilm formation by changing the physical properties of the potential attachment surfaces and making the support less hydrophobic. Clinical trials testing antifungals (or other antimicrobials) should therefore take these factors into consideration as well as the hygiene effect produced by the investigators' intervention when reporting on the beneficial effects of oral gels.

Conclusions

This study documented the reliability of oral swabbing when investigating yeast carriage in healthy denture wearers. Sampling upper dentures for *Candida* could be more than just a diagnostic tool and provide the opportunity to verify the patient's compliance to hygiene advice as well as the efficiency of new topical antifungals. The influence of the investigators on the hygiene behaviour and the galenic formulation of products, without any active antimicrobial, are the two important biases that have to be taken into account when evaluating oral health care products.

Acknowledgements

This study was supported financially by Henogen and Biopole (ULB contract reference number GB37 24CR1240). The authors are grateful to all the nurses and dentists of the Geriatrics (Director I. Beyer) and Dentistry (Director P. Damseaux) Departments of Brugmann Hospital (Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium) for their help in contacting patients wearing dentures. The authors also thank all the students for their enthusiastic participation in the investigations and Dr C. de Burbure, MD PhD, for her review of the manuscript.

References

- Brawner DL, Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from non-hospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 1335–1341.
- Odds FC. *Candida and Candidosis*. London: Leicester University Press, 1988.
- Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; **10**: 359–383.
- Negróni M, González MI, Levin B, Cuesta A, Iovanniti C. *Candida* carriage in the oral mucosa of a student population: adhesiveness of the strains and predisposing factors. *Rev Argent Microbiol* 2002; **34**: 22–28.
- Samaranayake LP, Lamey PJ. Oral candidosis: 1. Clinico-pathological aspects. *Dent Update* 1988; **15**: 227–231.
- Wilkieson C, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, MacKenzie D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 1991; **20**: 13–16.
- Wang J, Ohshima T, Yasunari U, et al. The carriage of *Candida* species on the dorsal surface of the tongue: the correlation with the dental, periodontal and prosthetic status in elderly subjects. *Gerodontology* 2006; **23**: 157–163.
- de Resende MA, de Sousa LV, de Oliveira RC, Koga-Ito CY, Lyon JP. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. *Mycopathologia* 2006; **162**: 39–44.
- Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, et al. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 223–228.
- Lyon JP, da Costa SC, Totti VM, Munhoz MF, de Resende MA. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol* 2006; **52**: 462–467.
- Cardash HS, Helft M, Shani A, Marshak B. Prevalence of *Candida albicans* in denture wearers in an Israeli geriatric hospital. *Gerodontology* 1989; **8**: 101–107.
- Kanli A, Demirel F, Sezgin Y. Oral candidosis, denture cleanliness and hygiene habits in an elderly population. *Aging Clin Exp Res* 2005; **17**: 502–507.
- Dar-Odeh NS, Shehab AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses* 2003; **46**: 187–191.
- Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; **95**: 51–59.
- Fanello S, Bouchara JP, Jousset N, Delbos V, Le Flohic AM. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. *J Hosp Infect* 2001; **47**: 46–52.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1923–1929.
- LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3839–3846.
- Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; **10**: 99–116.
- Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci* 2006; **51**(S1): 77–80.

Correspondence to:

Dr Ph. Courtois, Laboratory of Experimental Hormonology (CP 626), Université Libre de Bruxelles (ULB), route de Lennik 808, B-1070 Brussels, Belgium.
E-mail: philippe.courtois@ulb.ac.be

Adsorption of peroxidase on titanium surfaces: A pilot study

Mohamed Ahariz,¹ Jaafar Mouhyi,¹ Pierre Louette,² Jack Van Reck,¹ Chantal Malevez,¹ Philippe Courtois¹

¹Faculty of Medicine, Free University of Brussels, Route de Lennik 808, B-1070 Brussels, Belgium

²LISE Laboratory, Physics Department, University of Namur, Belgium

Received 3 January 2000; revised 8 May 2000; accepted 9 May 2000

Abstract: The present study demonstrates the *in vitro* and *in vivo* adsorption of peroxidase onto titanium surfaces. Titanium foils (mean \pm SEM: 365 ± 2 mm², $n = 114$) were incubated during 30 min with lactoperoxidase (4 mg in 5 mL 100 mM phosphate buffer pH 7). After 15 washings by H₂O, titanium foils were incubated with *o*-phenylenediamine (6 mg/mL) and H₂O₂ (7 mM) during 30 min. The reaction was then stopped by the addition of HCl 1M and the absorbance of the liquid phase was read on a spectrophotometer at 492 nm. *In vitro* adsorbed lactoperoxidase onto titanium surfaces was 0.70 ± 0.05 ng/mm² (mean \pm SEM, $n = 30$). X-ray photoelectron spectroscopy confirmed the incorporation of pro-

tein nitrogen onto titanium surfaces: the nitrogen atomic percentage increased from 0.9 ± 0.3 to $12.7 \pm 0.2\%$ ($n = 3$) and from 3.7 ± 0.1 to $14.4 \pm 0.4\%$ ($n = 5$) when titanium foils were incubated in the lactoperoxidase solution during 30 min and 24 h respectively. *In vivo*, oral peroxidases adsorbed on titanium healing abutments from 0.01 to 0.58 ng/mm² ($n = 19$) after 2 weeks in the oral environment. © 2000 John Wiley & Sons, Inc. *J Biomed Mater Res*, 52, 567–571, 2000.

Key words: biocompatible materials; dental implants; peroxidase; titanium

INTRODUCTION

Various proteins have been shown to bind to titanium surfaces: albumin,^{1,2} amylase,² collagenase,³ fibrinogen,⁴ glyco-aminoglycans.⁵ Dental titanium implants are in contact with peroxidases: sialoperoxidase from salivary glands or myeloperoxidase from neutrophils.⁶ In the oral cavity, both peroxidases catalyze the oxidation of thiocyanate into hypothiocyanite in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂); in tissues, myeloperoxidase oxidizes chloride into hypochlorite.⁷ Peroxidases can therefore contribute, in the presence of adequate substrates, to both limit growth of various bacteria⁸ and damage surrounding tissues.⁹ The peroxidases are known to bind to different materials such as hydroxyapatite powder, enamel surfaces, salivary sediments, various species of streptococci, and some Sepharose gels;¹⁰ however, there are no data available in the literature concerning the adsorption of peroxidases to titanium. The present study aims to demonstrate the adsorption of peroxidase activity onto titanium surfaces.

MATERIAL AND METHODS

Titanium foils

Titanium pieces were cut from native foil (Advent™, Eynsham, UK, 99.6% purity; thickness 25 μ m, size 25 \times 5 mm). Each piece was weighed and the total surface was calculated using the following algorithm:

$$S=2[(m/\rho h)+h(L+I)]$$

where S = total surface (mm²); m = foil mass (mg); ρ = volumic mass (4.544 mg/mm³); h = foil thickness (0.025 mm); L = foil length (mm); and I = foil width (mm). Total surface averaged 365 ± 2 mm² (mean \pm SEM, $n = 114$) with a coefficient of variation of 6.3%.

Adsorption assay

Lactoperoxidase (Biopole™, Louvain-La-Neuve, Belgium) was dissolved in demineralized water or in another solution when indicated. The titanium foil was immersed during 30 min at 37°C in 5 mL of a 0.8 mg/mL lactoperoxidase solution or in demineralized water alone (control). After incubation, liquid phase was removed according to the procedure summarized in Table I. Titanium foils were washed three times with 5 mL of demineralized water and then

Correspondence to: P. Courtois

TABLE I
Lactoperoxidase Adsorption onto Glass and Titanium Surfaces Through the Described Procedure

Experimental Conditions	Adsorbed Lactoperoxidase (ng/mm ²)
Onto the glass wall of the incubation assay tube	2.10 ± 0.20
In the 1st intermediate washing assay tube	0.00
In the 2nd intermediate washing assay tube	0.00
In the 3rd intermediate washing assay tube	0.00
In the 4th intermediate washing assay tube	0.00
Onto the titanium foil surface	0.70 ± 0.05

Incubation tube and each intermediate tube were washed three times before transferring the titanium foil. The different tubes and titanium foils finally transferred into a 5th clean tube were tested by the addition of the reagents for enzymatic reaction. All the results are expressed as adsorbed lactoperoxidase amount/glass or Ti foil surface (ng/mm²) and represented the mean ± SEM of six experiments for glass wall and 30 with titanium foils.

transferred into another tube with the last washing. This procedure was repeated five times and the liquid phase was removed.

Enzyme assay

Lactoperoxidase activity was measured by following the oxidation of 33.1 mM ortho-phenylenediamine (in 0.1M acetate buffer pH 5.5) in the presence of 7 mM H₂O₂ at 492 nm on a Beckman DU-65 spectrophotometer. The reaction was stopped by the addition of 5 mL HCl 1M. Oxidation rate of the substrates in the presence of adsorbed lactoperoxidase was compared with that from a standard amount of free lactoperoxidase. Results were expressed as the equivalent amount of free lactoperoxidase providing the same activity per titanium mm² (this supposed that adsorption of titanium did not change lactoperoxidase kinetic parameters).

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses

The basic principle¹¹ of XPS consists in the analysis of the kinetic energy of electrons extracted from atoms under photon radiation (photoelectric effect). To extract one electron from an atom, the incoming photon energy ($h\nu$) must be at least equal to the binding energy (BE) of this electron in the atom. The spectrometer measures the kinetic energy (KE) of the extracted photoelectrons. BE is then inferred from Einstein's equation (energy conservation law) $BE = h\nu - KE$. Results are presented as spectra giving a number of electrons related to their BE on an energy range covering BE for all atomic elements. XPS spectra then show "fingerprints" of all the elements that are on a very near surface (100 Å maximum). XPS analysis was performed on an SSX-100 spectrometer using a hemispherical analyzer and a monochromated Al_{K_{1,2}} X-ray ($h\nu$: 1486.6 eV). This photon beam was produced by a 10-keV electron bombardment of an alumi-

nium anode and monochromated by Bragg's diffraction on a single crystal. The resulting spectrometer energy resolution was 0.85 eV as measured by the full width at half maximum of the C1s signal coming from a carbon graphite sample. All spectra were recorded on flat surfaces with an X-ray spot of 1-mm diameter. The electron take-off angle was 35°. BE was calibrated using the contamination C1s peak at 285.0 eV. Relative intensities of each element were calculated using sensitivity factors which included extraction probability and spectrometer transmission.

In vivo study

The Bränemark implant system requires a two-stage surgery. The first surgical step leads to the osseointegration of an endosseous fixture. In the second surgical step, a temporary transgingival titanium healing abutment is connected to the osseointegrated fixture and replaced after gingival tissues healing by a definitive abutment.

In this investigation, the temporary healing abutments, instead of being thrown away, were kept for peroxidase detection. Eighteen titanium healing abutments were thus removed from three totally edentulous patients (aged 44-74 years) after 2 weeks in the oral cavity without any denture. A last healing abutment was removed from a fourth patient (aged 29 years) who needed an anterior single tooth replacement; this healing abutment was covered by a temporary appliance. The exposed surface of each healing abutment (ranging from 76 to 139 mm²) was deduced from manufacturer's data (Nobel Biocare™, Göteborg, Sweden). The healing abutments were collected in saline and immediately transferred to the laboratory for peroxidase measurement.

Statistics

Statistical analysis was made using Prism™ version 2.0 from GraphPad Software (San Diego, CA).

RESULTS

In vitro investigation

When the time course of the *o*-phenylenediamine peroxidation was followed on a spectrophotometer (Fig. 1) for different free lactoperoxidase concentrations (20, 40, 60, 80, µg/mL), absorbance at 492 nm always reached a steady state after 15 min. Initial rate and steady state value without or after HCl addition were proportional to lactoperoxidase concentration. Repeated measurements on lactoperoxidase standard at different concentration levels provided a coefficient of variation less than 6%.

Table I shows the values of adsorbed lactoperoxi-

dase on glass and titanium surfaces. The presence of lactoperoxidase adsorbed onto a glass surface was assessed in the incubation assay tube despite the removal of the titanium foil and three different washings. The presence of lactoperoxidase adsorbed onto a titanium surface was assessed in the last assay tube where titanium foil was finally placed after five transfers and a total of 15 washings. There was no peroxidase activity in the intermediate washing tubes. The amount of adsorbed lactoperoxidase, calculated on the basis of lactoperoxidase activity, was equivalent to $2.10 \pm 0.04 \text{ ng/mm}^2$ ($n = 6$) onto glass surfaces and $0.70 \pm 0.05 \text{ ng/mm}^2$ ($n = 30$) onto titanium surfaces. The within-run precision ranged from 11 to 24% ($n = 6$) whereas the day-to-day precision reached 37% ($n = 30$).

When the kinetic properties of bound and free lactoperoxidase were compared, no difference in activity between free and adsorbed lactoperoxidase could be observed. Indeed, the bound peroxidase activity yielded $94.3 \pm 10.8\%$ (mean \pm SEM, $n = 8$) of the free activity measured for different hydrogen peroxide concentrations ranging from 0.12 to 7 mM, and $93.5 \pm 7.9\%$ (mean \pm SEM, $n = 4$) for different orthophenylenediamine concentrations used (ranging from 5.5 to 82.8 mM).

The lactoperoxidase adsorption measured for different incubation conditions ($n = 6$) are summarized in Table II. Among different NaCl concentrations from 0 to 15 g/L, the physiological concentration of 9 g/L provided an optimal condition for lactoperoxidase adsorption (ANOVA completed by a Bonferroni test; $p < 0.05$). The tested buffers did not affect the *in vitro* lactoperoxidase adsorption except for acetate buffer which was inhibitor (ANOVA completed by a Bonferroni test; $p < 0.05$). Titanium foils' pretreatment in 100

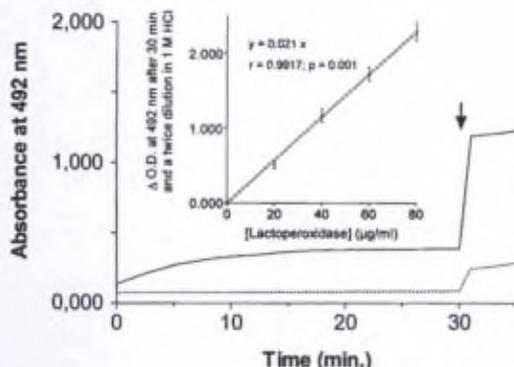


Figure 1. Time course of the peroxidase activity ($40 \mu\text{g/mL}$ lactoperoxidase in 0.1M acetate buffer pH 5.0): dotted line and full line represent control and assay respectively. Inset: calibration curve obtained after 30 min and a 1:2 dilution, from six independent experiments (mean \pm SEM, $n = 6$).

TABLE II
Effect of Different Experimental Incubation Conditions on the Lactoperoxidase Adsorption onto Titanium Surfaces: NaCl Concentration of the Incubation Medium, Buffer and pH Conditions, Pretreatment of Titanium Foil by CaCl_2

Experimental Conditions	Adsorbed Lactoperoxidase (%)
[NaCl] 0 g/L	100
[NaCl] 3 g/L	98.2 ± 6.9
[NaCl] 6 g/L	76.8 ± 8.3
[NaCl] 9 g/L	144.6 ± 8.9
[NaCl] 12 g/L	66.1 ± 6.9
[NaCl] 15 g/L	98.2 ± 5.8
H_2O	100
0.1M Phosphate buffer pH 7.0	110.5 ± 7.9
0.1M HEPES pH 7.0	110.5 ± 6.8
0.1M TRIS pH 7.0	63.3 ± 13.9
0.1M Acetate buffer pH 5.5	17.7 ± 21.3
0.1 Citrate buffer pH 5.5	133.1 ± 12.2
Titanium foil not pretreated	100
Titanium foil pretreated with CaCl_2	163.6 ± 4.7

All the results are expressed as percentage (mean \pm SEM, $N = 6$) of the adsorbed lactoperoxidase/ mm^2 Ti surfaces in the within-day control. One hundred percent represented 0.56 ± 0.04 (first panel); 0.67 ± 0.05 (second panel); and $0.83 \pm 0.04 \text{ ng/mm}^2$ (third panel).

mM CaCl_2 resulted in a higher peroxidase fixation: 1.37 ± 0.22 instead of $0.83 \pm 0.10 \text{ ng/mm}^2$ corresponding to an increase of $163.6 \pm 4.7\%$. This difference was statistically significant (Student *t* test, $p < 0.001$). The saturation of the titanium surface (Fig. 2) was already reached at a 0.08 mg/mL concentration in lactoperoxidase with a maximal binding value averaging $0.35 \pm 0.03 \text{ ng/mm}^2$ ($n = 4$).

The XPS analysis from foils immersed in ultrapure lactoperoxidase (from SigmaTM St. Louis, MO, USA) solution during 30 min or 24 h confirmed adsorption of protein nitrogen onto titanium surfaces. The titanium and the oxygen atomic percentages decreased while carbon and nitrogen increased as shown in Table III. The nitrogen atomic percentage rose then from 0.9 to 12.7% and from 3.7 to 14.1% after an incubation of 30 min and 24 h, respectively. Analysis of the XPS spectra¹² pointed out characteristic N1s nitrogen peak at 400.5 eV in the control and at 400.3 eV after lactoperoxidase incubation (Fig. 3).

In vivo investigation

Oral peroxidase activities adsorbed onto 18 titanium healing abutments (from three totally edentulous patients) after 2 weeks in the oral environment without any appliance: bound peroxidases ranged from 0.02 to 0.58 ng/mm^2 (Fig. 4). No significant correlation could be made between adsorbed oral peroxidases with the

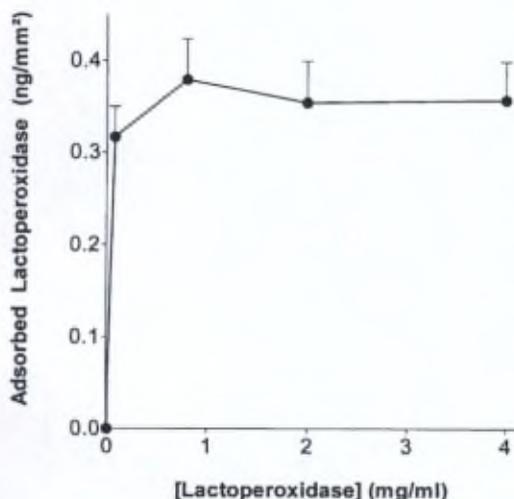


Figure 2. Effect of the lactoperoxidase concentration in the incubation medium on the binding capacity onto titanium surfaces (mean \pm SEM, $n = 6$).

location of the corresponding implant (sextant number) except for a significant difference between both anterior sextants: 0.12 ± 0.03 versus 0.39 ± 0.08 ng/mm² for the superior and the inferior region respectively (t test, $p = 0.007$). One last titanium healing abutment removed in the central superior region (sextant II) from a fourth patient provided the smallest amount of adsorbed peroxidase: 0.01 ng/mm²; this patient wore, for esthetic reasons, a removable appliance separating the healing abutment from the salivary environment and thus minimizing contact with oral peroxidases.

DISCUSSION

An *in vitro* 30-min immersion of titanium foils in lactoperoxidase solutions resulted in the presence of adsorbed lactoperoxidase onto titanium surfaces. The absence of lactoperoxidase in the intermediate wash-

ing tubes (Table I) proved that the lactoperoxidase in the last tube containing the titanium foil only came from the titanium foil itself. However, these numerous washings are not easily standardized and desorption phenomenon¹³ probably explains a poor day-to-day precision (coefficient of variation up to 37%, $n = 30$) whereas within-run precision ranged from 11 to 24% ($n = 6$). For this reason, performances of adsorption in different experimental conditions were always reported in function of the day-control. Calcium pretreatment of the titanium surface increases the adsorption of lactoperoxidase (165% of the control) but is not a necessary condition for it such as described for the anionic glycoaminoglycans.⁵ Lactoperoxidase is known to be a more cationic protein⁶ so that a direct binding with the TiO₂ anionic layer is possible.¹⁴ The adsorbed lactoperoxidase was detected on the basis of its activity—it was assumed that adsorption did not change kinetic properties of the enzymatic activity. Indeed, it was not possible to show any difference between free and bound lactoperoxidase activities at different substrate concentrations when normalized values were compared. XPS spectroscopy confirmed the incorporation of lactoperoxidase onto titanium surfaces. The titanium, oxygen, carbon, and nitrogen signals (Table III) were found after a 30-min incubation in a ratio (3.7, 23.0, 60.7, and 12.7%) similar to that of the protein. According to the data reported in the literature,¹⁵ relative percentage of the titanium, oxygen, carbon, and nitrogen atoms present in the lactoperoxidase molecule could indeed be evaluated at 0.0, 29.9, 56.4, and 13.7% respectively.

In vivo, the presence of oral peroxidases (sialo- and myeloperoxidase) was assessed on titanium healing abutments after 2 weeks in the salivary environment. The samples were immediately examined after removal to avoid desorption phenomenon.¹³ The peroxidases measured on the surface of the healing abutments represented the peroxidases still present after 15 washings. The single abutment removed from a fourth patient showed the smallest adsorbed (0.01 ng/mm²) amount suggesting that his removable appliance minimized the contact between oral peroxidases

TABLE III
Relative Atomic Percentage (Obtained by XPS) of Titanium (Ti), Oxygen (O), Carbon (C), and Nitrogen (N) on Titanium Foils after Incubation (30 min or 24 h) in the Presence of Lactoperoxidase (L)

	Ti	O	C	N
Control foil ($N = 3$)	12.9 ± 0.5	46.1 ± 1.0	39.4 ± 0.3	0.9 ± 0.5
30-Min L-pretreated foil ($N = 3$)	3.7 ± 0.3	23.0 ± 1.0	60.7 ± 0.9	12.7 ± 0.3
Control foil ($N = 3$)	12.0 ± 1.5	41.7 ± 0.9	42.7 ± 2.7	3.7 ± 0.3
24-h L-pretreated foil ($N = 5$)	1.4 ± 0.2	20.4 ± 0.6	63.0 ± 0.4	14.4 ± 0.9
Relative atomic percentage in lactoperoxidase according to Thomas, 1991	—	29.9	56.4	13.7

Relative atomic percentages of the same atomic species in lactoperoxidase, calculated from literature data (Thomas, 1991), have been indicated for comparison.

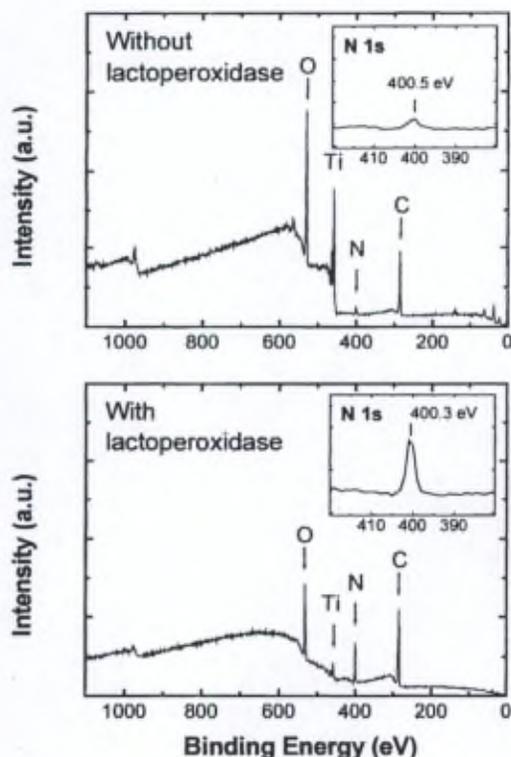


Figure 3. XPS spectra obtained from titanium surfaces exposed to water (upper panel) or lactoperoxidase (0.8 mg/mL) dissolved in water (lower panel). Inset: enlargement of the nitrogen signal (a.u., arbitrary units).

and the titanium surface. This *in vivo* part of the study confirms lactoperoxidase adsorption onto titanium surfaces first demonstrated *in vitro* and shows that peroxidase adsorption is possible in a biological system such as the oral cavity.

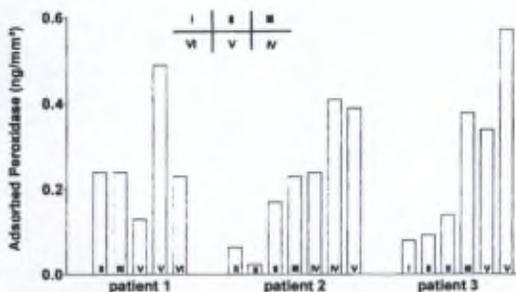


Figure 4. Peroxidase adsorbed on healing abutments after 2 weeks in the oral cavity. Each bar represents the peroxidase adsorbed on one titanium healing abutment. Label of each bar represents the sextant localization of the implant.

CONCLUSION

This pilot study shows the *in vitro* and *in vivo* adsorption of peroxidases onto titanium surfaces. H_2O_2 is described to increase *in vitro* the oxide layer thickness of titanium surface.¹⁶ Further investigation is required to establish the specific effect of H_2O_2 (substrate of peroxidases) versus hypohalous compounds (powerful oxidants produced by peroxidases in biological systems) on titanium interfaces.

The authors thank Miss H. El Amri for her technical help and Prof. A. Sener (Laboratory of Experimental Medicine, Free University of Brussels) for the critical reading of the manuscript.

References

- Steinberg D, Klinger A, Kohavi D, Sela MN. Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials* 1995;16:1339-1343.
- Kohavi D, Klinger A, Steinberg D, Maru E, Sela MN. α -Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: An *in vivo* study. *Biomaterials* 1997;18:903-906.
- Kane KR, Deheer DH, Owens SR, Beed JD, Swanson AB. Adsorption of collagenase to particulate titanium: A possible mechanism for collagenase localization in periprosthetic tissue. *J Appl Biomater* 1994;5:353-360.
- Waalivara B, Aronsson BO, Rodahi M, Lausmaa J, Tengvall P. Titanium with different oxides: *In vitro* studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials* 1994;15:827-834.
- Collis JJ, Embery G. Adsorption of glycoaminoglycans to commercially pure titanium. *Biomaterials* 1992;13:548-552.
- Thomas EL, Jefferson MM, Joyner RE, Cook GS, King CC. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: Identification and quantification in human mixed saliva. *J Dent Res* 1994;73:544-555.
- Thomas EL, Fishman M. Oxidation of chloride and thiocyanate by isolated leukocytes. *J Biol Chem* 1986;261:9694-9702.
- Fruitt KM, Reiter B. Biochemistry of peroxidase system: Antimicrobial effects. In: Pruitt KM, Tenuovo J, editors. The lactoperoxidase system—chemistry and biological significance. New York: Marcel Dekker; 1985. p 143-178.
- Leff JA, Repine JE. Neutrophil-mediated injury. In: Abramson JS, Wheeler JG, editors. The natural immune system: The neutrophil. Oxford, UK: IRL Press; 1993. p 228-262.
- Tenuovo J, Kurkijärvi K. Immobilized lactoperoxidase as a biological active and stable form of an antimicrobial enzyme. *Arch Oral Biol* 1981;26:309-314.
- Briggs D, Seah MP. Practical surface analysis by Auger and XPS photoelectron spectroscopy. Chichester: John Wiley & Sons; 1983.
- Lausmaa J, Kasemo B. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Appl Surf Sci* 1990;44:133-146.
- Williams DF, Askill IN, Smith R. Protein adsorption and desorption phenomena on clean metal surfaces. *J Biomed Mater Res* 1985;19:313-320.
- Ellingsen JE. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO_2 . *Biomaterials* 1991;12:593-596.
- Thomas EL, Bozeman PM, Learn DB. Lactoperoxidase: Structure and catalytic properties. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB, editors. Peroxidases in chemistry and biology. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991. p 123-142.
- Tengvall P, Lundström I, Sjöqvist L, Elwing H, Bjursten LM. Titanium-hydrogen peroxide interaction: Model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants. *Biomaterials* 1989;10:166-175.

