

ÉTUDE *IN VITRO* DE L'EFFICACITÉ ANTIFONGIQUE DE LA PIROCTONE OLAMINE SUR *MALASSEZIA* *PACHYDERMATIS*

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par
Elisabeth, Christiane, Régine TANÉ
Née le 7 Mai 1979 à Perpignan (Pyrénées-Orientales)

Directeur de thèse : **Monsieur le Professeur Michel FRANC**

JURY

PRESIDENT :
M. Jean-Pierre SEGUELA

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Michel FRANC
M. Guy BODIN ROZAT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

| | | |
|------------------------|------|-------------------------|
| Directeur | : M. | A. MILON |
| Directeurs honoraires | M. | G. VAN HAVERBEKE |
| | M. | J. FERNEY |
| | M. | P. DESNOYERS |
| Professeurs honoraires | M. | L. FALIU |
| | M. | C. LABIE |
| | M. | C. PAVAUX |
| | M. | F. LESCURE |
| | M. | A. RICO |
| | M. | D. GRIESS |
| | M. | A. CAZIEUX |
| | Mme | V. BURGAT |
| | M. | J. CHANTAL |
| | M. | J.-F. GUELFI |
| | M. | M. EECKHOUTTE |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **DUCOS de LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*

REMERCIEMENTS

A notre jury de thèse

Monsieur le professeur Jean-Pierre SEGUELA

Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Parasitologie, Mycologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux

Monsieur le Professeur Michel Franc

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et maladies parasitaires

Qui nous a proposé ce travail et qui a accepté de diriger cette thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le professeur Guy BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie

Qui nous a soutenu dans ce travail et qui a mis à notre disposition son laboratoire
Qui nous fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse

Remerciements particuliers au **laboratoire CLARIANT** qui m'a fourni un échantillon de la poudre de Piroctone olamine et sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé.

Un grand MERCI à toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ainsi qu'à l'équipe de parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Ils ont su m'accueillir, me guider et me conseiller lors de l'élaboration des protocoles expérimentaux.

Merci à Cédric PETIT qui m'a aidée et encouragée, en particulier pendant les premières phases de l'étude.

Merci à M. Alvinerie, de l'équipe de pharmacocinétique de l'INRA de St Martin du Touch, qui avait bien voulu accepter de me guider dans mon premier sujet de thèse.

Je remercie également Bruno Gruson-Vescovali pour son travail de thèse remarquable sur les *Malassezia*, et pour m'avoir autorisée à scanner des images de sa thèse.

DEDICACES

Mes premières pensées vont à mes parents. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet, cette vocation. Merci de m'avoir soutenue pendant les années difficiles et de continuer à le faire encore aujourd'hui. Cette thèse est pour vous...avec toute mon affection.

Merci à mon frère, Julien, d'être toujours là quand il faut, tapi dans l'ombre mais prêt à bondir !

Merci à mes grands parents, Panou, Manou et mamie Blanche, pour leur présence depuis mon plus jeune âge... à Panou qui nous a fait le bonheur de revenir de loin...

Une pensée toute particulière pour ma cousine Nadège, ma biouche !!!

Merci à toute ma famille d'être aussi proches les uns des autres ; c'est rare et réconfortant ! Merci à TOUS, pour toutes vos attentions touchantes, qui sont toujours bienvenues, d'autant plus en ce moment !

A tous mes amis, les jeunes et les moins jeunes... :

Muriel, jolie maman, amie depuis si longtemps ! Merci de me faire cadeau de ton don d'écoute et de conseils. Nathan et Bi sont de petits veinards !!

Mes amis de maternelle, primaire, collège et de lycée, même si nous nous sommes perdus de vue : Alexandra, Nathalie, Florise, Mélanie, Claire, Roselyne, Zabounie, Céline H., Fret, Gilles, Jean-Luc, Christophe, l'Anglais et sa marmite,...

Mes copains d'équitation et les moniteurs fabuleux ! C'était le bon vieux temps !

Ma famille parisienne aux Lauréades : Mathieu, Titom et Gunt pour commencer. Anne-Cé ma petite femme, Majid et sa bonne humeur, Céline, Florence, DOP, Olivier, Peepoo, Julien, Fred, Aurélien, TBA et tous les autres ! Un gros mimi à ceux que j'ai la chance de toujours fréquenter et un encore plus gros à Anne-Cé, qui m'héberge régulièrement à Toulouse ! Une pensée particulière à Mathieu pour sa patience, son flegme et son aide durant les années de galère...Hihhi !

Les amis savoyards : notre regretté Damien, ses parents, Ma Mickette, Lionel, Vivi et Aurélie, la famille de Mathieu et sa sœur ... et tous les autres...

Mes amis de l'école véto (par ordre alphabétique ;-) : Audrey F., Bichou et Pascalou, Charlotte, David H., Elise et Davy, Far West, Kourouc', Marie-Laure et Alexandre, Myriam L., Sarah, Sonia M., Sonia I., Sylvain et Mélanie, Virginie, mes Docteurs et d'autres pas vétos : Julia, Greg...

La famille Puduff's, leurs enfants, leurs parents, les amis des enfants... ! Les Juanitos de la Pampa !! S'il fallait que je fasse une liste précise des choses pour lesquelles je vous remercie, elle serait aussi longue que cette thèse !!

Didier, Danny, Manue, Stéphane. Merci pour les vacances au ski, le ski nautique et les repas ensemble...

Marie-Jo, pour son aide au fil des années...

André L. pour sa sagesse.

Merci à toute l'équipe du 65 : Le Chef, Eric (Mitch') qui m'a mis le pied à l'étrier dans ce métier, Audrey (c'était la fête sans le chef !), Nicolas malgré tout, Laurette et son sourire bienveillant, Muriel pour sa disponibilité et ses délicieux canards, ses filles, Pascal et tous ceux qui m'ont accueillie à bras ouverts. Merci aussi aux chiens de Muriel E., en particulier, à l'oreille gauche de Vénus, qui m'a fournie toutes mes *Malassezia*...elle aura laissé une trace dans l'Histoire de la Mycologie Vétérinaire!

Merci à M. Bourguignon et M. Jaume pour leurs cours de Maths passionnants !

Merci aux structures vétérinaires qui m'ont accueillie pendant mes stages, en particulier à la clinique vétérinaire de Cabestany pour l'ambiance, la présence, le savoir et la sympathie.

Merci à mes employeurs : anciens, actuels (et futurs !) pour leur patience et leur soutien...

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| SOMMAIRE | 1 |
| SOMMAIRE DES FIGURES ET DES TABLEAUX | 5 |
| INTRODUCTION | 6 |
| I. LE GENRE <i>MALASSEZIA</i> | 7 |
| 1. Taxonomie | 7 |
| 1.1 Eléments de classification | |
| a. Généralités sur les champignons | 7 |
| b. Place des levures du genre <i>Malassezia</i> dans la systématique | 7 |
| 1.2 Diversité au sein du genre <i>Malassezia</i> | 8 |
| 1.3 Origine du nom : <i>Malassezia pachydermatis</i> et synonymie | 9 |
| 2. Présentation d'une levure non-lipodépendante : <i>Malassezia pachydermatis</i> | 9 |
| 2.1 Description de cette levure | 9 |
| a. Morphologie macroscopique et microscopique | |
| b. Ultrastructure | 11 |
| 2.2 Biologie de <i>Malassezia pachydermatis</i> | 12 |
| a. Assimilation des nutriments | 12 |
| b. Reproduction | 13 |
| c. Ecologie de <i>Malassezia pachydermatis</i> | 13 |
| • Répartition de <i>M. pachydermatis</i> sur les êtres vivants | 13 |
| • Fréquence d'isolement chez les chiens et les chats | 14 |
| • Localisation sur les animaux | 15 |
| • Prédispositions raciales | 15 |
| • Densité de populations de levures | 16 |
| • Localisation au niveau de la peau | 16 |
| 2.3 Conditions de culture | 16 |
| a. Milieux de culture | 16 |
| b. Environnement : température, atmosphère et pH | 18 |
| • Température | 18 |
| • Atmosphère | 18 |
| • pH | 19 |
| c. Conditions de conservation des levures | 19 |
| 3. Etude des autres espèces appartenant au genre <i>Malassezia</i> | 20 |
| 3.1 Critères de diagnose des <i>Malassezia</i> | 20 |
| a. Etude morphologique | 20 |
| b. Caractéristiques physiologiques et biochimiques | 20 |
| c. Etude du génome par différentes techniques de biologie moléculaire | |
| 3.2 Ecologie de ces espèces | 21 |

| | |
|---|----|
| 4. Etude clinique des dermatites à <i>Malassezia</i> | 22 |
| 4.1 Techniques d'isolement de ces levures | 22 |
| a. Cytologie | 22 |
| b. Mise en culture | 22 |
| 4.2 Etude des formes cliniques des Malassezioses | 23 |
| a. Chez l'animal | 23 |
| b. Chez l'Homme | 24 |
| 4.3 Interactions des <i>Malassezia</i> avec la peau de l'hôte | 24 |
| 4.4 Facteurs favorisants | 25 |
| 5. Traitement des Malassezioses en médecine vétérinaire | 25 |
| 5.1 Présentation des antifongiques disponibles et de leurs formulations | 25 |
| a. Antiseptiques | 26 |
| b. Antifongiques stricts | 26 |
| c. Antibiotiques ayant une activité antifongique | 26 |
| 5.2 Démarches thérapeutiques | 27 |
| | |
| II. LA PIROCTONE OLAMINE | 28 |
| | |
| 1. Famille et structure de la Piroctone olamine | 28 |
| 1.1 Famille des Hydroxy-pyridones | 28 |
| 1.2 Synonymes et noms chimiques de la Piroctone olamine | 28 |
| a. Noms courants | 28 |
| b. Noms systématiques | 28 |
| 1.3 Dénomination officielle : Piroctone olamine | 28 |
| 1.4 Formules chimiques | 29 |
| a. Formule brute | |
| b. Formules développée et simplifiée | |
| | |
| 2. Propriétés de la Piroctone olamine | 29 |
| 2.1 Propriétés physiques | 29 |
| 2.2 Propriétés chimiques | 30 |
| 2.3 Stabilité de la Piroctone olamine | 31 |
| a. Thermostabilité | 31 |
| b. Photodégradation et photosensibilité | 31 |
| c. Conservation lors du stockage | 31 |
| 2.4 Compatibilité de la Piroctone olamine avec les matières premières utilisées en cosmétique | 31 |
| 2.5 Pharmacocinétique | 32 |
| 2.6 Toxicité | 33 |
| a. Toxicité par voie orale | 33 |
| b. Toxicité par voie cutanée | 34 |
| c. Embryotoxicité et tératogénèse | 35 |

| | |
|---|----|
| 3. Spectre et mode d'action | 36 |
| 3.1 Spectre de la Piroctone olamine | 36 |
| 3.2 Mode d'action | 36 |
| 4. Formes galéniques des Hydroxy-pyridones | 37 |
| 4.1 Présentations en médecine humaine | 38 |
| a. Produits disponibles sur le marché | 38 |
| b. Influence du temps d'application | 39 |
| 4.2 Présentations en médecine vétérinaire | 39 |
| 4.3 Etudes comparatives de la Piroctone olamine avec d'autres Antifongiques | 40 |
| | |
| III. ETUDE EXPERIMENTALE | 42 |
| | |
| 1. Etapes communes à tous les protocoles | 42 |
| 1.1 Obtention du principe actif | 42 |
| 1.2 Préparation du milieu de culture et répartition dans les boîtes de Pétri | 42 |
| a. Choix du milieu | 42 |
| b. Préparation du milieu | 42 |
| c. Répartition du milieu de culture dans les boîtes de Pétri | 42 |
| 1.3 Obtention des <i>Malassezia pachydermatis</i> et mise en culture | 43 |
| | |
| 2. Protocole A : Etude de l'efficacité antifongique du shampooing Allermyl® sur des <i>Malassezia pachydermatis in vitro</i> | 44 |
| 2.1 Matériels et méthodes | 45 |
| a. Détermination des quantités de shampooing à appliquer sur la surface d'une boîte de Pétri | 45 |
| b. Application sur les géloses | 46 |
| • Effet préventif antifongique | 46 |
| • Effet curatif antifongique | 46 |
| • Chronologie de l'essai | 46 |
| 2.2 Résultats du protocole A | 47 |
| a. Résultats de l'étude de l'effet préventif antifongique de la Piroctone olamine | 47 |
| b. Résultats de l'étude de l'effet curatif antifongique sur des colonies de 3 jours d'âge | 50 |
| c. Conclusion du protocole A | 52 |
| | |
| 3. Protocole B : Application du shampooing sur les <i>Malassezia</i> puis élimination du shampooing résiduel | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Protocole C : Etude de l'efficacité antifongique de la Piroctone olamine en solution sur <i>Malassezia pachydermatis</i> en boîte de Pétri | 54 |
| 4.1 Matériels et méthodes | 54 |
| a. Détermination des quantités de Piroctone olamine à appliquer sur les géloses | 54 |
| • Préparation d'une solution à 1% de Piroctone olamine | 54 |
| • Effet préventif | 55 |
| • Effet curatif | 55 |
| b. Protocole expérimental | 55 |
| • Effet préventif | 55 |
| • Effet curatif | 55 |
| 4.2 Résultats du protocole C | 56 |
| a. Résultats de l'étude de l'effet préventif de la Piroctone olamine | 56 |
| b. Résultats de l'étude de l'effet curatif de la Piroctone olamine | 59 |
| | |
| IV. DISCUSSION | 63 |
| | |
| 1. Critique du protocole C | 63 |
| 1.1 Choix de la souche de <i>Malassezia pachydermatis</i> | 63 |
| 1.2 Nombre de boîtes utilisées par concentration | 63 |
| 1.3 Réalisation des solutions à tester | 63 |
| | |
| 2. Discussion des résultats des protocoles A et C | 63 |
| 2.1 Protocole A | 63 |
| 2.2 Protocole C | 64 |
| • Etude de l'effet préventif antifongique de la Piroctone olamine sur les <i>Malassezia</i> | 64 |
| • Etude de l'effet curatif antifongique de la Piroctone olamine sur les <i>Malassezia</i> | 65 |
| | |
| 3. Comparaison de nos résultats avec les publications concernant l'efficacité antifongique de la Piroctone olamine | 65 |
| | |
| 4. Perspectives | 66 |
| | |
| CONCLUSION | 68 |
| BIBLIOGRAPHIE | 69 |

SOMMAIRE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

- Figure 1 : Observation de *Malassezia pachydermatis* par examen direct de cérumen d'un chien (immersion x100) après coloration au bleu de toluidine (53).
- Figure 2 : Ultrastructure de *Malassezia pachydermatis* (x20000). N : noyau, m : mitochondrie, vac : vacuole, CW : paroi cellulaire (53).
- Figure 3 : *Malassezia pachydermatis* au microscope optique. Observation du bourrelet cicatriciel sur la cellule mère (gauche) (53).
- Figure 4 : Formule développée de la Piroctone olamine.
- Figure 5 : Répartition des formes acides et basiques de la Piroctone olamine selon le pH.
- Figure 6 : Concentration x : pas de croissance fongique. Haut : Allermyl®; Bas : Shampoing physiologique.
- Figure 7 : Croissance avec une dilution d'Allermyl® de x/32.
- Figure 8 : Concentration 2x : pas d'augmentation de la taille des colonies. Haut : Shampoing physiologique; Bas : Allermyl®.
- Figure 9 : Témoin.
- Figure 10 : Haut : Boîte traitée avec 43 mg/m² de Piroctone olamine; Bas : témoin.
- Figure 11 : Haut : Boîte traitée avec 86 mg/m² de Piroctone olamine; Bas : témoin.
- Figure 12 : Haut : boîte traitée avec 172 mg/m² de Piroctone olamine; Bas : témoin.
- Figure 13 : Témoins : Haut : Propylène glycol- eau; Bas : levures uniquement.
- Figure 14 : Haut : Témoin; Bas : 344 mg/m² de Piroctone olamine.
- Figure 15 : Haut : Témoin; Bas : 172 mg/m² de Piroctone olamine.
- Figure 16 : Haut : Témoin; Bas : 86 mg/m² de Piroctone olamine.
- Figure 17 : Haut : Témoin; Bas : 43 mg/m² de Piroctone olamine.
- Figure 18 : Haut : 172 mg/m² et Bas : 43 mg/m² de Piroctone olamine.
- Tableau 1 : Formes galéniques et concentrations de la Piroctone olamine.
- Tableau 2 : Comparaison d'Allermyl® et du shampoing témoin.
- Tableau 3 : Résultats de l'étude de l'effet préventif de la Piroctone olamine sur les levures (protocole A).
- Tableau 4 : Résultats de l'étude de l'effet curatif de la Piroctone olamine sur les levures (protocole A).
- Tableau 5 : Résultats de l'étude de l'effet préventif de la Piroctone olamine sur les levures (Protocole C).
- Tableau 6 : Résultats de l'étude de l'effet curatif de la Piroctone olamine sur les levures (protocole C).

INTRODUCTION

Les levures du genre *Malassezia* sont des organismes commensaux présents sur la peau de la plupart des vertébrés homéothermes, au niveau du corps mais aussi au niveau des oreilles, de l'anus et des babines. Le commensalisme peut s'assimiler à un parasitisme bien toléré (21). Le champignon tire sa nourriture, se développe, se reproduit à partir d'un être vivant sans lui occasionner de nuisances notables, ni pour autant lui apporter un quelconque avantage. Ce sont aussi des champignons opportunistes, profitant de la moindre occasion pour exprimer leur virulence et leur agressivité vis-à-vis de leur hôte. Ce fragile équilibre hôte-saprophyte peut-être interrompu à tout moment en cas de défaillance de l'hôte. La levure habituellement commensale provoque alors une mycose (21).

Le rôle pathogène de ces levures a longtemps été sous-estimé. Au même titre que *Staphylococcus intermedius*, elles font partie de la flore cutanée résidente. Toutefois, leur implication dans l'étiologie de certaines dermatoses n'est pas à négliger. En effet, toute affection cutanée à forte composante inflammatoire peut favoriser la prolifération des *Malassezia*, normalement présentes en faible quantité sur la peau des carnivores domestiques (33). Les premières descriptions en tant qu'agent de complication dans certaines dermatoses, ont été faites par Dufait dès 1975 et plus récemment par Larson en 1998, Scott en 1989 et Mason en 1991(49). Les dermatoses en lien avec ces levures furent regroupées sous le terme de « dermatites à *Malassezia pachydermatis* ».

Ainsi, le rôle des levures du genre *Malassezia* dans certaines dermatites du chien, mais aussi du chat et d'autres animaux sauvages ou domestiques, est aujourd'hui bien admis et constitue un élément important de la dermatologie vétérinaire. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de tester l'activité antifongique de la Piroctone olamine qui entre dans la composition de certains shampoings n'ayant pas d'Autorisation de Mise sur le Marché mais qui revendiquent toutefois une activité antifongique.

I. LE GENRE *MALASSEZIA*

1. Taxonomie

1.1 Eléments de classification

a. Généralités sur les champignons

Le genre *Malassezia* regroupe des champignons à thalle unicellulaire réduits à de petits éléments ovoïdes ou sphériques appelés « levures ».

Depuis les travaux de Whittaker en 1969, les Champignons (ou Fungi) constituent un règne à part entière. Ce sont des êtres vivants Eucaryotes, immobiles, hétérotrophes, dépourvus de pigment chlorophyllien. Ils se nourrissent par absorption, stockent leurs réserves sous forme de glycogène et se reproduisent par bourgeonnement (34). Le thalle possède une paroi chitineuse, constituée de stérols et de polyholosides dérivés de mannose, rhamose et glucose (76).

b. Place des levures du genre *Malassezia* dans la systématique

Le règne des Champignons est scindé en deux divisions selon le type de reproduction sexuée ou asexuée (21, 22, 34, 84) :

- les fungi perfecti dont font partie les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Mastigomycètes
- les fungi imperfecti qui sont artificiellement rassemblés dans le phylum des Deutéromycètes. Ce phylum englobe les espèces dont on ne connaît pas de reproduction sexée, comme les levures.

Les Deutéromycètes comportent eux-mêmes trois classes, selon l'aspect du thalle (levure ou filament) et le mode de formation des spores asexuées :

- Thalle filamenteux : Hyphomycètes et Coelomycètes
- Thalle levuriforme : Blastomycètes.

Le fait que les levures se reproduisent exclusivement par bourgeonnement de blastospores les classe dans la famille des Cryptococcacées (51). Les *Malassezia* se distinguent au sein de cette famille par l'absence de capsule (à la différence de *Cryptococcus*), leur absence de pouvoir chromatogène (contrairement à *Rhodotorula*) et par leur lipophilie.

Toutefois la structure multilamellaire de la paroi des *Malassezia* et l'étude de leur génome (proportion en bases azotées guanine-cytosine dans l'ADN nucléaire supérieure à 50%) les range parfois dans les Basidiomycètes, même si la reproduction sexuée n'a jamais été démontrée (2, 21).

Le genre *Malassezia* appartient au règne des champignons, à la division des *Fungi imperfecti*, au phylum des Deuteromycètes et à la classe des Blastomycètes (21, 84).

1.2 Diversité au sein du genre *Malassezia*

Le genre *Malassezia* est représenté par des levures dont les principales caractéristiques sont de ne pas pouvoir fermenter les sucres mais aussi d'être lipophile, puisque leur croissance est stimulée par la présence de lipides composés d'acides gras essentiels (comme ceux trouvés dans l'huile d'olive). On recense actuellement sept espèces lipodépendantes : *M.furfur*, *M.sympodialis*, *M.globosa*, *M.slooffiae*, *M. restricta* et *M.obtusa* et une non-lipodépendante : *Malassezia pachydermatis*. Ce clivage n'est pas uniquement basé sur des capacités nutritionnelles mais aussi sur des caractéristiques moléculaires, morphologiques et biochimiques (50,114).

Les levures lipodépendantes nécessitent la présence d'acides gras à longues chaînes (C₁₂ à C₂₄). Il faut donc compléter les milieux de culture en acides gras tels que l'acide oléique (huile d'olive), l'acide arachidonique, l'acide palmitique ou encore l'acide stéarique. Par contre des études ont montré que les lipides normalement présents à la surface de la peau étaient suffisants pour permettre leur croissance (1). Leur culture *in vitro*, par contre, est moins facile à réaliser.

La culture de *Malassezia pachydermatis*, levure non-lipodépendante, est plus aisée car elle se développe avec la présence d'acides gras à courte chaîne, déjà présents dans les milieux de culture usuels.

Ces sept espèces sont les plus fréquentes et les mieux connues. Cependant, les progrès des techniques d'analyse moléculaire ont permis d'identifier de nouvelles espèces. Une levure appartenant au genre *Malassezia* a été trouvée sur la peau de chevaux sains et fut baptisée *Malassezia equi* (16, 115). L'équipe de SUGITA *et al.* en a isolé trois: *Malassezia dermatis* en 2002 (109), *Malassezia japonica* en 2003 (108) et *Malassezia yamatoensis* en 2004, cette dernière étant moins fréquente (107). *Malassezia nana*, une espèce lipodépendante a été découverte en 2004 et se rapproche d'un point de vue morphologique et physiologique de *Malassezia dermatis* et de *M. sympodialis* mais se différencie par ses propriétés biochimiques (62).

De plus, plusieurs études semblent en accord sur le fait qu'il existe des souches différentes de *Malassezia pachydermatis* (34, 48). En effet, Huang *et al.* ont décrit deux phénotypes se différenciant autant au niveau morphologique (petite et grande colonies) qu'au niveau de leur composition biochimique en acides gras (63). Il a été prouvé par des études phylogénétiques qu'il s'agissait bien de *Malassezia pachydermatis*, mais que les types de colonie correspondaient à des biotypes différents. Kiss *et al.* , aux vues de leurs observations microscopiques et des études des propriétés biochimiques des différentes colonies, ont conclu que *Malassezia pachydermatis* est une espèce hétérogène et peut-être divisée en deux groupes (68). La publication de Guillot *et al.* indique que la peau d'un animal peut être colonisée par plusieurs types de *Malassezia pachydermatis*, qui se différencient par leurs séquences de nucléotides (56).

1.3 Origine du nom : *Malassezia pachydermatis* et synonymie.

La taxonomie et la nomenclature des *Malassezia* ont été très chaotiques et confuses durant les deux siècles précédents.

Le genre *Malassezia* a été créé par Baillon en 1889, suite aux observations de Malassez en 1874 de cellules filamenteuses dans les pellicules issues de cheveux humains. Les levures de forme filamenteuse appartenaient à ce genre. Puis Sabouraud en 1904 créa le genre *Pityrosporum* pour nommer les structures bourgeonnantes associées au pityriasis capitis. En effet, ils ne savaient pas à l'époque que les *Malassezia* sont dimorphiques et peuvent donc exister à la fois sous forme filamenteuse et bourgeonnante pour certaines espèces (1). Dès 1927, ces deux dénominations seront reconnues comme synonymes, et c'est en 1984 que l'appellation « *Pityrosporum* » cédera sa place au terme « *Malassezia* », du fait de son antériorité, pour définir les levures de ce genre (48).

En 1925, une levure bourgeonnante, répondant aux critères de classification du genre *Pityrosporum*, mais plus petite que *P. furfur* et se développant sur milieu de Sabouraud simple, est isolée à partir de squames d'un rhinocéros indien et prend donc le nom de *Pityrosporum pachydermatis*. En 1955, une nouvelle levure semble avoir été découverte à partir de cérumen de chien et est alors dénommée *Pityrosporum canis*. Toutefois des études montreront qu'il ne s'agit que d'une seule et même espèce (60). La règle de l'antériorité tranchera pour la dénomination *Malassezia pachydermatis* pour cette levure non lipodépendante (48, 49, 51, 76). La dénomination officielle devient *Malassezia pachydermatis*, mais on trouvera indifféremment dans la littérature les synonymes *Pityrosporum canis* ou *Pityrosporum pachydermatis*.

2. Présentation d'une levure non-lipodépendante : *Malassezia pachydermatis*

2.1 Description de cette levure

a. Morphologie macroscopique et microscopique

En culture, on observe de petites colonies, rondes, convexes, presque lisses, de couleur crème à jaune pâle, mates ou peu brillantes. Elles glissent sur la gélose sans déformation, surtout lorsqu'elles sont jeunes, ce qui constitue une particularité pour cette levure (34, 48). Cette caractéristique sera aussi à l'origine de difficultés lors de notre protocole expérimental. La taille d'une colonie varie de 0,5 mm à 1 mm en 2 à 3 jours. Ces îlots fongiques finissent par au fil des jours, en même temps que leur couleur devient brunâtre et que leur aspect devient sec et craquelé. En culture en milieu liquide (ou bouillon) de Sabouraud, les levures forment un film à la surface qui s'opacifie durant les deux premiers jours. Ensuite, cette pellicule se fragilise, puis coule au fond du tube (48).

Dans sa thèse, Desormeaux (34) précise que contrairement aux autres espèces et notamment à *M. furfur*, *M. pachydermatis* n'a pas la capacité de

filamenter sous forme de mycélium ou de pseudo-mycélium. Toutefois, d'après la thèse de Gruson (48), avec des conditions de culture particulières, il semblerait que cette levure ait la capacité d'émettre des hyphes. Ces observations restent cependant rares dans le cas de *M. pachydermatis*, et limitées à la culture *in vitro*. Les hyphes observées *in vitro* sont de taille plus réduite que celles produites dans les mêmes conditions par *M. furfur*. L'apparition de ce pseudo mycélium semble être induite par la présence de cholestérol ou d'esters de cholestérol, d'huile d'olive ou de glycérine et tween 80 en milieu aérophile ou mieux, microaérophile (34).

Dans le cas de *Malassezia furfur* et *M. globosa*, l'observation de ce mycélium est plus fréquent, tant par examen direct de prélèvement de lésions qu'en culture (76). Il est même considéré comme une forme d'invasion lorsque le champignon passe de l'état saprophyte à parasitaire. Ces conditions peuvent être réunies *in vivo*, pour ces espèces, si ces lipides sont en quantité suffisante sur la peau (2).

Au microscope optique, avec un objectif à immersion x100, les *Malassezia* se présentent sous forme de petites cellules ovales à cylindriques (rondes parfois), de 3 à 6,5 µm de long sur 2 à 5,5 µm de large (22). Leur mode de reproduction, par bourgeonnement unipolaire, leur confère une silhouette à base élargie caractéristique, qui leur a valu des comparaisons souvent imagées comme : levures en « bouteille de Perrier », « cacahuète », « empreinte de pas », « en quille » ou « poupée russe » (2, 18, 34) (figure 1).

La structure de *M. pachydermatis* est souvent considérée comme référence du genre *Malassezia*.

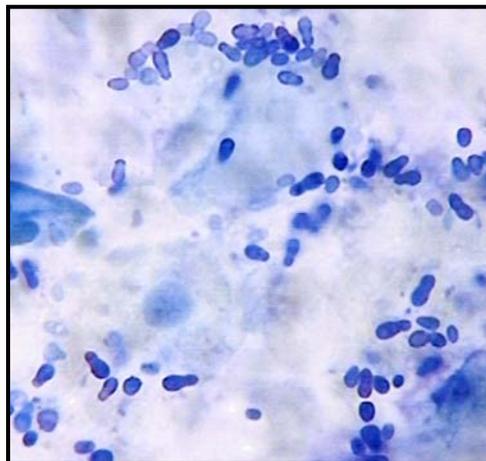


Figure 1 : Observation de *Malassezia pachydermatis* par examen direct de cérumen d'un chien (immersion x100) après coloration au bleu de toluidine (48).

b. Ultrastructure

Les microscopes électroniques à transmission ou à balayage nous ont permis d'aller plus loin dans l'étude de l'ultrastructure de ces levures. Les organites cytoplasmiques sont comparables à ceux des autres levures (noyau, vacuoles, mitochondries voire REG et appareil de Golgi...) (1). On a même pu démontrer que le noyau contient six chromosomes (48). C'est l'enveloppe cellulaire qui constitue l'originalité des *Malassezia*. Elle est particulièrement épaisse comparée à la plupart des autres levures (environ 0,12 μm) et représente 26 à 37% du volume de la cellule (2).

Les dernières études à son sujet révèlent que cette enveloppe est multilamellaire, dont les couches s'agencent comme suit (1, 34) :

- une couche externe, qui ne permettrait pas le passage des électrons à cause de sa composition a priori lipidique. Elle serait l'équivalent d'une capsule et participerait au processus d'adhésion de la levure sur son hôte (82).
- une paroi cellulaire, épaisse (de 0,1 à 0,25 μm) et multilamellaire ; elle est un critère d'appartenance aux Basidiomycètes (76). Ces multiples couches sont de densités différentes et forment une structure unique dans le règne des champignons. La face interne de la paroi est crénelée, ce qui crée de multiples invaginations (1, 2, 34).
- une membrane plasmique, qui épouse la forme crénelée de la face interne de la paroi, ce qui lui donne un aspect festonné (2, 34)

Cette ultrastructure, caractéristique du genre, est retrouvée à n'importe quel âge de ces levures. La paroi est plus épaisse pour *M. pachydermatis* que pour *M. furfur*. Le microscope électronique permet également d'observer la structure de la paroi lors du bourgeonnement de la cellule mère et notamment la paroi de séparation (48) (figure 2).

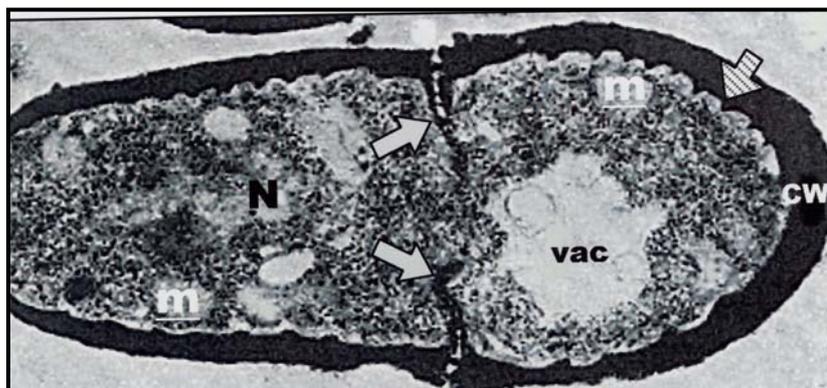


Figure 2 : Ultrastructure de *Malassezia pachydermatis* (x20000). N : noyau, m : mitochondrie, vac : vacuole, CW : paroi cellulaire (48).

2.2 Biologie de *Malassezia pachydermatis*

a. Assimilation des nutriments

Les *Malassezia* utilisent les substances mortes des organismes qu'elles colonisent en se comportant en saprophytes stricts. Leur bagage enzymatique leur permet de dégrader les cellules mortes pour se procurer les éléments nutritifs nécessaires. Elles ont des capacités enzymatiques variées : uréasique (85), catalasique, peroxydasique et protéolytique de manière générale (avec des protéases, des lécithinases et des caséinases) (26, 34). La digestion de la caséine peut être mise en évidence par l'apparition d'une opacification autour des colonies, après 3 à 4 jours à 37°C, quand elles sont cultivées sur un gel à base de lait (48).

Comme nous l'avons déjà évoqué, *Malassezia pachydermatis* est une levure non-lipodépendante mais qui reste lipophile. C'est pourquoi elle peut se développer sur milieu de Sabouraud simple. Rappelons que *M. pachydermatis* ne nécessite pas la présence d'acides gras à longue chaîne, contrairement aux espèces lipodépendantes. Toutefois, elle voit sa vitesse de croissance augmenter pour 73,8% des souches étudiées si l'on rajoute au milieu de culture des acides gras, comme l'acide oléique ou l'acide palmitique. C'est pourquoi la croissance dans le conduit auditif est facilitée pour ces levures, et stimulée d'autant plus lors d'otites (34). Ces levures utilisent les lipides comme seule source de carbone (1).

Les levures du genre *Malassezia* ne sont pas capables de fermenter les sucres (1, 22, 34, 48). Par contre, certaines souches de *M. pachydermatis* sembleraient pouvoir assimiler le glucose, le mannitol et le sorbitol comme source d'énergie (34, 68). Elles n'ont pas besoin de minéraux ou d'électrolytes (1). La seule vitamine qui s'est révélé nécessaire à la croissance de 42 souches sur 80, lors de l'étude de Kiss en 1996 (34) est l'acide nicotinique, ou vitamine PP. Ces levures trouvent leur source de soufre dans la méthionine, mais aussi dans la cystine ou cystéine (1). Les *Malassezia* utilisent les peptones comme source d'azote, et non les nitrates et les sulfates d'ammonium (48).

Il est intéressant d'expliquer le sujet du « phénomène satellite » (34, 49, 68). En étudiant les caractéristiques de souches de *Malassezia pachydermatis* isolées à partir d'otites externes, Kiss a montré que des souches qui ne pouvaient pas pousser en l'absence d'acide nicotinique, pouvaient croître en présence de *Staphylococcus intermedius* (68). Il n'y a pas de phénomène de compétition entre ces deux espèces (34, 49, 68), puisque les Staphylocoques synthétisent une substance qui est en fait un facteur de croissance pour *M. pachydermatis*.

Certaines propriétés biochimiques contribuent à la diagnose de cette espèce. Par exemple, *M. pachydermatis* présente une activité estérasique, en particulier sur les Tween 20, 40, et 60 (qui sont des lipides) pour toutes les souches étudiées. Par contre, seulement 50% environ des souches étudiées sont capables de dégrader le Tween 80. Aucun pouvoir d'hémagglutination ou d'activité coagulase n'a été observé (34, 49).

b. Reproduction

La reproduction connue aujourd'hui est uniquement asexuée. Les bourgeonnements successifs des cellules filles (blastoconidies,76) s'effectuent sur une base large, à l'origine du bourrelet cicatriciel sur la cellule mère. Cette collerette est bien la preuve que la multiplication débute toujours au même pôle de la cellule (48). Le processus se divise en six étapes (1,34) :

- au niveau de l'un des pôles de la cellule mère, une partie de la paroi cellulaire fait saillie à l'extérieur et délimite une portion de cytoplasme de la cellule mère. Ce bourgeon augmente de volume et la paroi cellulaire apparaît comme plus fine que celle de la cellule mère.
- la 2ème et la 3ème étape voient le bourgeon augmenter de taille et la paroi se créneler.
- Lors de la 4ème étape, alors que la taille du bourgeon devient proche de celle de la cellule mère, une paroi de séparation s'ébauche à la base de la cellule fille. Les deux cellules ont à ce stade la même structure. A partir de la 3ème étape, la levure commence à prendre sa forme caractéristique dite en bouteille, ce qui se poursuit pendant la 4ème étape.
- La paroi de séparation s'édifie et divise les cellules, et laisse entrevoir un espace entre ces deux cellules. La cellule mère et la cellule fille se séparent (figure 3).

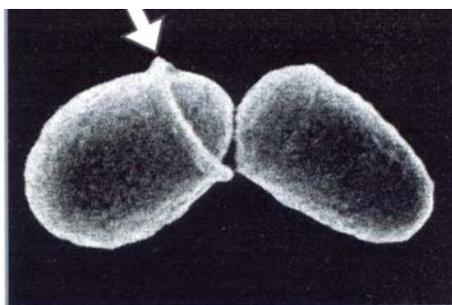


Figure 3 : *Malassezia pachydermatis* au microscope optique. Observation du bourrelet cicatriciel sur la cellule mère (gauche) (48).

c. Ecologie de *Malassezia pachydermatis*

• Répartition de *Malassezia pachydermatis* sur les être vivants

Les levures du genre *Malassezia* sont isolées sur la peau de l'Homme, de nombreux mammifères et même d'oiseaux et appartiennent à la flore habituelle de la peau. *M. pachydermatis* est plutôt considérée comme une espèce zoophile, communément associée aux carnivores domestiques et particulièrement aux canidés (34, 76). On la retrouve aussi chez les pachydermes, les bovins et les

porcs. Pour certains animaux, comme les rongeurs et lagomorphes, aucune levure lipophile n'a pu être isolée (34). Les oiseaux quant à eux, sont porteurs de levures du genre *Malassezia* et ce au niveau de la peau, des plumes et même dans le tractus digestif, notamment dans la bouche (2, 34). Les reptiles pour leur part ne montrent pas de colonisation fongique par les *Malassezia* ; ceci pourrait être expliqué par la sécheresse particulière de la peau de ces animaux.

L'étude de Raabe montre que les animaux ne sont pas colonisés uniquement par *Malassezia pachydermatis*. La plupart du temps, il s'agit de colonisation mixte avec *M. sympodialis* et *M. furfur* (95).

M. pachydermatis a été retrouvée exceptionnellement chez l'Homme, contrairement aux autres espèces du genre. Cependant des cas humains ont été décrits chez des patients immunodéprimés et des nourrissons prématurés (1, 28, 83). D'après Guillot et Bond, le portage fréquent de ces levures par nos carnivores domestiques pourrait constituer un réservoir et donc représenter une risque de zoonose pour des individus sensibles (53). Toutefois ces cas, qui se limitent aux domaines hospitaliers, restent rares. Le transfert passif par le biais des mains peut être limité par le respect des mesures d'hygiène (83). Le risque de zoonose par *Malassezia pachydermatis* semble faible et ne concerne que les personnes fragilisées (48, 84).

- **Fréquence d'isolement chez les chiens et les chats**

Il est reconnu que *M. pachydermatis* est plus isolée chez le chien que chez le chat. Sur la peau, entre 8 et 56% des chiens sains seraient porteurs de cette levure (18, 49), ce qui confirme que *Malassezia pachydermatis* est un constituant habituel et commensal de la peau du chien sain. Dans l'oreille, *Malassezia pachydermatis* a été isolée sur 62,2% de chiens présentant une otite externe, et sur 50% de chiens n'ayant pas de signes cliniques. Ces proportions ont été calculées chez le chat : 41,2% pour les chats atteints d'otites contre 17,6% des chats sains (30). On peut d'abord conclure de ces résultats que cette levure peut être présente sur la peau sans pour autant créer de lésions. On peut ajouter que les chats semblent également moins atteints par cette levurose que les chiens et qu'ils hébergent moins fréquemment *Malassezia pachydermatis*. Cette étude montrait de plus, comme l'étude de Raabe (95) que des levures lipo-dépendantes (*M. sympodialis*, *M. furfur* et *M. obtusa*) peuvent être également à l'origine d'otites chez les carnivores domestiques. De son côté, Guillot précise que dans son étude, aucune espèce lipodépendante n'a été détectée, mais ne nie pas pour autant leur implication dans les otites (54).

D'ailleurs, l'isolement de levures lipodépendantes a été clairement démontré pour *M. Sympodialis* et *M. Globosa* (16), notamment chez les félinés (54). *Malassezia sympodialis* serait l'espèce la plus fréquemment isolée chez les chats sains selon Crespo. Dans son étude, Bensignor trouve à 98% *Malassezia pachydermatis*. Les chats et les guépards sont les seuls carnivores chez lesquels des levures lipo-dépendantes ont été mis en évidence. Cette fréquence reste toutefois faible (2 chats en 2000) (27).

- **Localisation sur les animaux**

De nombreuses études ont tenté de quantifier et de définir la localisation de ces champignons, tant pour comprendre la place de cette levure dans la flore fongique normale du chien, que pour approcher son implication dans les dermatites canines. Cependant, les résultats sont rarement comparables, car les techniques de prélèvement et d'isolement sont différentes d'une étude à l'autre. De plus la variabilité individuelle est également à considérer, certaines races étant prédisposées à cette colonisation fongique (18, 76).

Il est logique de retrouver ces levures dans des régions riches en glandes sébacées ou propices à la macération, comme les plis. Des levures du genre *Malassezia* ont également été trouvées dans la région mammaire de juments saines ainsi qu'au niveau de la fosse préputiale de chevaux sains (115).

Contrairement à une idée reçue, il semblerait que le biotope de prédilection de *Malassezia pachydermatis* chez le chien sain ne soit pas le conduit auditif externe mais le corps (33, 34, 49, 51), contrairement aux autres levures du genre *Malassezia* qui sont présentes dans 27% des oreilles d'animaux contre 16% sur la peau (2, 34).

La peau est le site électif des *Malassezia* mais le pelage pourrait constituer également une zone de portage puisque l'on a retrouvé ces levures sur des échantillons de poils (18, 49).

Certaines muqueuses peuvent également être colonisées par *Malassezia pachydermatis*. On la retrouve au niveau de la cavité buccale, sur les muqueuses pituitaires, génitales, au niveau du rectum et surtout au niveau de l'anus (2, 17, 34). Des auteurs rapportent même que cette espèce de levure a été mise en évidence chez le chien dans 46% des sacs anaux normaux et dans 86% des cas lors d'inflammation (49, 61). Dans une étude, on retrouve même ces levures au niveau de la cornée et particulièrement en présence d'ulcère cornéen (94).

- **Prédispositions raciales**

Dans 70% des cas, les malassezioses sont associées à une cause sous-jacente (3). Cependant, certaines races semblent être prédisposées au portage (sans qu'il y ait de lésions) et aux infections à *Malassezia*. Voici les races les plus souvent citées dans les études de cas (2, 18, 49) : Le West-Highland-White Terrier, le Basset Hound, le Teckel, le Cocker, le Springer Spaniel, le Labrador, le Berger Allemand, le Colley, le Shetland, le Jack Russel Terrier, le Terrier Silky, le Terrier Australien, le Yorkshire Terrier, le Sharpeï, le Boxer, le Saint Hubert, le Shih-Tzu, le Pékinois, le Lhasa Apso et le Caniche.

Dans cette liste, certains chiens sont prédisposés aux états kérato-séborrhéiques comme les Labradors ou les Bergers Allemands, d'autres ont les oreilles pendantes ce qui favorise la macération dans le conduit auditif (cocker) (16) et d'autres ont des plis comme le Shar Peï. La prédisposition du West Highland Terrier s'expliquerait par une prévalence élevée dans cette race d'une dysplasie épidermique (3, 18). Ces prédispositions raciales semblent donc liées à des caractéristiques morphologiques ou physiologiques de l'animal constituant des facteurs favorisant le développement des *Malassezia*.

- **Densité de population de levures**

Toutes les études citées auparavant ont eu comme autres avantages de mettre en évidence les variations de densité des populations de levures sur un animal mais aussi sur un site donné. On a pu noter que certaines zones pouvaient être abondamment colonisées (babines, espaces interdigités) et d'autres moins (ars, abdomen) (34).

Pour un site donné et en l'absence de lésions, la densité de population peut varier en fonction des races. Le Basset Hound est un bon exemple, car il montre un portage plus fréquent, mais en plus, une densité plus élevée. Ceci explique la prédisposition du Basset Hound aux dermatites à *Malassezia*. La raison de ce portage plus fréquent n'est pas très claire à ce jour. Toutefois une hypothèse est avancée : la prolifération fongique serait autorisée par un défaut de kératinisation primaire qui conduit à un érythème et à une séborrhée grasse (52).

- **Localisation au niveau de la peau**

Des biopsies cutanées ont montré que ces levures peuvent se localiser à la surface de la peau mais aussi dans la couche cornée voire dans les infundibulums pilaires (49).

2.3 Conditions de culture

a. Milieux de culture

Il existe différents types de milieux adaptés à la culture des levures, sous forme solide ou liquide. *Malassezia pachydermatis* est une levure non-lipodépendante qui, de ce fait, croit aisément sur les milieux usuels. Cependant, dans certaines conditions, son isolement nécessite des milieux enrichis.

Le plus fréquemment utilisé est la gélose de Sabouraud qui permet l'isolement, l'identification et la culture (7, 21, 22). Son utilisation est recommandée d'ailleurs par le Codex de la Pharmacopée Française pour le contrôle de stérilité des produits pharmaceutiques. Il est composé de peptone (10 g), de glucose (20 à 60g), de gélose (20g) et d'eau (qsp 1000 ml) (22). En routine, il permet l'isolement de la plupart des espèces fongiques responsables des dermatoses chez les carnivores domestiques (*Microsporum canis* et autres Dermatophytes, *Malassezia pachydermatis* et *Candida spp.*). Le milieu de Dixon modifié est aussi utilisé pour la culture fongique (54, 95). A la différence du milieu de Sabouraud, il est enrichi en lipides (2). Ce dernier est composé de malt, de peptone, de Tween 40, de glycérol, acide oléique et d'agar. Selon Guillot, il semble que ce milieu soit plus favorable à la croissance de *Malassezia pachydermatis* que le milieu de Sabouraud (54). En conclusion ces deux milieux peuvent être utilisés en routine pour la culture de *Malassezia pachydermatis* (9).

D'autres milieux ont été utilisés et testés, mais se sont révélés moins pratiques ou moins adaptés à leur développement. Par exemple, la gélose au sang n'est pas adéquate car la croissance des levures est réduite et de ce fait difficile à

mettre en évidence (48). Pourtant, Blanco a obtenu de bons résultats dans son expérience avec une association de gélose au sang et de gélose MacConkey (7).

Les milieux de culture usuels peuvent être supplémentés en antibiotiques ou en vitamines. Les antibiotiques les plus fréquemment employés sont le chloramphénicol et la gentamicine, et permettent d'éviter la croissance de contaminants bactériens. La gélose de Sabouraud-gentamicine est indiquée pour l'isolement de toutes les espèces de levures. La gentamicine inhibe presque la totalité des espèces bactériennes, et particulièrement les bacilles à Gram négatif résistant au chloramphénicol (certains *Proteus*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*). Ces derniers pourraient soit inhiber la croissance fongique soit gêner l'identification des levures. Mais rappelons que l'association de *Staphylococcus intermedius* avec certaines souches de *Malassezia pachydermatis* permettrait au contraire la croissance de ces dernières (*cf. ante*) (34, 68).

D'après Blanco, le milieu de Sabouraud-glucose sans antibiotique est le milieu le plus adapté pour l'isolement des levures, en particulier pour *Malassezia pachydermatis*. La présence d'une flore bactérienne sur la gélose ne serait pas un obstacle à l'identification de micro-organismes. Dans sa publication, il insiste sur le fait que les antibiotiques ont ralenti voire inhibé la croissance durant les trois premiers jours de l'incubation lors de son expérience. La sensibilité à certains antibiotiques a été reportée dans d'autres études (7). Pour Guillot, le milieu de Dixon modifié et supplémenté en antibiotiques est le plus adapté (54).

De la vitamine PP, ou acide nicotinique, peut être ajoutée aux milieux usuels. Il s'agit de la seule vitamine utile à la croissance *M. pachydermatis*, et peut même se révéler indispensable pour la culture de certaines souches.

La cycloheximidine (Actidione®) est un antifongique qui permet d'inhiber le développement de champignons dits « contaminants » dans le milieu (22), mais qui est sans action sur *Malassezia*. Au contraire, l'Actidione® favoriserait sa croissance au lieu de l'inhiber (48, 50).

Malassezia n'est pas une levure lipodépendante mais elle reste cependant une levure lipophile. Elle se développe aisément sur les milieux usuels car ceux-ci contiennent une quantité restreinte mais suffisante d'acides gras à courtes chaînes. Mais l'ajout de lipides supplémentaires, notamment d'acides gras à longue chaîne (48), peut être bénéfique à sa croissance (2, 9). Dans sa thèse, Bazin précise que l'ajout d'huile d'olive peut-être utile car certaines souches de *M. pachydermatis* ne peuvent être isolées en culture Sabouraud sans huile (2, 18, 50). Blanco pense que cet ajout n'augmente pas la fréquence d'isolement, en particulier au bout de 24h. Par ailleurs, du fait de la faible sélectivité de ce milieu et des difficultés d'observation des colonies, Blanco ne le recommande que pour une utilisation occasionnelle, dans le cadre d'études particulières (7). Il ajoute que *Malassezia pachydermatis* n'a pas besoin de lipides supplémentaires à ceux trouvés dans le milieu pour croître. Ceci va dans le sens des études précédentes qui classent toutes les levures non-lipodépendantes dans l'espèce *Malassezia pachydermatis*. Il reconnaît toutefois que la présence de lipides adéquats stimulent la croissance.

Le milieu peut être aussi enrichi en Tween. Il s'agit de polysorbate, généralement utilisé comme tensio-actif. C'est une huile végétale soluble dans l'eau, l'alcool et le propylène glycol et constitue donc une autre source de lipides à ajouter

aux milieux de culture, qui semblerait optimiser la croissance. Mais il faut être prudent car selon les souches, soit les molécules n'apportent aucune amélioration soit elles peuvent inhiber la pousse (7, 48). D'ailleurs certains acides gras présents dans du cérumen de chien seraient également capables d'inhiber le développement de certains micro-organismes (63).

On répertorie encore d'autres milieux, additionnés en lipides : Leeming'medium (supplémenté en lipides) ou le milieu de Ushijima. Ces milieux sont appropriés pour l'isolement de toutes les espèces de *Malassezia*, y compris les lipodépendantes qui peuvent être retrouvées parfois sur la peau des chiens et des chats (54).

b. Environnement : Température, atmosphère et pH

• Température

La température généralement recommandée pour la culture des levures est de 37°C, ce qui correspond d'ailleurs à la température du conduit auditif externe (7). Pour Guillot (54), la gamme de température 32-37°C convient au développement des *Malassezia*, sans différence notable entre ces deux limites. Par contre, le milieu de Sabouraud semble moins performant à la température de 27°C, les colonies se développent plus lentement ; on peut donc avoir des faux négatifs si la durée d'incubation n'est pas assez longue (7 jours minimum sur Sabouraud) (9). De meilleurs résultats pour ce milieu peuvent être obtenus en réglant l'étuve à 37°C ou en utilisant une atmosphère enrichie en CO₂ (54). Des résultats similaires ont été obtenus par Bond et Lloyd qui ne trouvent de différence significative entre 32°C et 37°C (9).

La croissance semble être inhibée à partir de 40-45°C (48).

• Atmosphère

- Oxygène

Elle poussent en milieu aérobie mais sont également capables de se développer dans des conditions microaérophiles, ou anaérobies pendant une durée limitée pour cette dernière et avec une croissance faible (1, 34).

La culture en milieu microaérophile est peu répandue bien qu'elle ait prouvé à maintes reprises son efficacité (7). 5 à 10% de CO₂ augmentent de manière significative la fréquence d'isolement de *Malassezia pachydermatis* mais uniquement sur un milieu de Sabouraud comme nous l'avons déjà souligné (9).

- Hygrométrie

En étuve, il est nécessaire de maintenir une hygrométrie adaptée au développement fongique. On rajoute souvent un récipient rempli d'eau dans l'étuve. D'ailleurs, des variations géographiques ont été détectées lors de la culture et l'isolement de *Malassezia pachydermatis*. Il apparaîtrait que cette levure serait plus facile à isoler lorsque les prélèvements des échantillons à tester sont réalisés par temps humide (7).

- **pH**

La croissance est optimale pour des pH compris entre 4 et 8. Elle est par contre inhibée pour des gammes de pH de 1 à 3 et de 9 à 10. A pH 4, la croissance est meilleure qu'aux pH 1 à 3, mais est inférieure à ceux compris entre 5 et 8. L'étude de Matousek et al. ne montre pas de différence significative pour les pH 5 à 8 (77).

Cette étude suggère aussi qu'une acidification locale de la peau pourrait avoir des effets thérapeutiques bénéfiques sur des infections fongiques chez les chiens (77). Ceci reste toutefois délicat car des conditions seulement "légèrement acides" (pH 4 à 6) favorisent le développement des levures. Par contre, même si les pH au-delà de 9 inhibent la croissance des levures, il n'est pas possible d'utiliser cette propriété dans le cadre d'un traitement. L'alcalinisation de la peau provoque, chez les humains, des effets secondaires inacceptables, à savoir des irritations et des prédispositions aux infections bactériennes.

c. Conditions de conservation des levures

Il existe plusieurs méthodes de conservation des souches de levure. On les choisit en fonction de la durée de stockage souhaitée et du matériel dont on dispose.

On peut les placer dans de l'eau distillée ou les laisser sur milieu de culture. Pour cela, le milieu le plus adapté est le milieu de Dixon seul ou avec du glycérol qui permet aux levures de rester intactes. On peut alors les stocker pendant neuf mois sans modification de leurs caractéristiques (46). Ces deux méthodes sont les plus employées mais lors de l'étude de Crespo *et al.*, elles n'ont pas permis de conserver correctement les levures (29).

La conservation des souches peut aussi être obtenue par repiquage. Elle est fastidieuse mais aisée à réaliser en laboratoire. Si l'on utilise un milieu de Sabouraud- Actidione®- Chloramphénicol, il faut repiquer les souches tous les deux mois. On peut espacer les repiquages d'un mois par ajout de Tween 80 dans le milieu de culture (48).

Il est possible de les conserver par le froid, au réfrigérateur à 4°C, en les congelant à -50°C ou à -80°C, ou en immersion dans l'azote liquide (-196°C) (14). La congélation à -80°C nécessite un agent cryoprotecteur comme le glycérol (29, 48). Contrairement aux autres levures, l'utilisation du réfrigérateur à +4°C pour le genre *Malassezia* donne de mauvais résultats.

La conservation dans de la paraffine (14) est également mentionnée ainsi que la lyophilisation. Cette dernière permettrait une conservation à très long terme, mais peut-être fatale pour certaines espèces (29, 48).

Conclusion

Si l'on respecte les besoins physiologiques, l'isolement et la culture des levures de ce genre est aisée, en particulier pour *Malassezia pachydermatis* qui ne nécessite pas, de manière générale, d'adjonction de lipides dans le milieu. La conservation dans l'azote liquide est la méthode la plus satisfaisante pour préserver des cultures pures de *Malassezia pachydermatis* (14), mais n'est pas la plus utilisée.

3. Etude des autres espèces appartenant au genre *Malassezia*

3.1 Critères de diagnose des *Malassezia*

Plusieurs espèces de *Malassezia* semblent pouvoir coexister sur un même animal. Certains auteurs comme Crespo semblent penser que des confusions sont possibles entre les différentes espèces (entre *M. pachydermatis* et *M. sympodialis* chez le chat, dans cette publication) si l'on se base seulement sur des moyens de diagnose morphologiques (27). Nous allons évoquer les différents moyens d'identification disponibles actuellement, sans entrer dans les détails techniques.

a. Etude morphologique

On se base sur la taille et la forme de la cellule au microscope (84). En culture, on étudie la couleur, la forme et la texture de la colonie (39). La diagnose morphologique est tentante car rapide, mais peu fiable. Elle reste subjective et de plus les morphologies et les tailles des cellules peuvent varier au cours du cycle cellulaire mais également selon le type de souche (48).

b. Caractéristiques physiologiques et biochimiques

Les levures sont testées selon leurs capacités de croissance en présence de certaines molécules dans le milieu de culture ou en fonction de la température :

- Croissance en l'absence de supplémentation lipidique.
- Croissance selon le milieu de culture : seule *M. pachydermatis* se développe sur le milieu de Sabouraud non supplémenté et seule *M. furfur* se développe sur un milieu de Dixon modifié avec de la glycine comme seule source d'azote (86).
- Croissance en présence de Tween 20, 40, 60, 80 (108).
- Assimilation de Cremophor EL (ou polyéthylène glycol-35 castor oil). Seule *M. furfur* est capable de pousser en sa présence (79).
- Inhibition de la croissance en présence de Polidocanol. Il s'agit d'un anti-prurigineux et d'un analgésique topique qui peut inhiber la croissance des *Malassezia* en fonction des concentrations utilisées. *Malassezia pachydermatis* est la plus sensible et *M. furfur* la plus résistante (78, 80).
- Température : *M. japonica* croît sans difficultés à 40°C contrairement aux autres espèces (108).

Les activités biochimiques permettent également d'identifier les espèces de levures :

- Réaction catalasique : libération de bulles de gaz en présence de peroxyde d'hydrogène (67). Elle est positive pour l'espèce qui nous intéresse (34).
- Activité β -glucosidase sur l'esculine négative pour *Malassezia pachydermatis* (34, 43, 48, 114).

- Production de pigments marrons en présence de tryptophane comme seule source d'azote (45, 81). Ce dernier test peut-être utilisé comme test rapide en routine (45).

c. Etude du génome par différentes techniques de biologie moléculaire

- Proportion en guanine et cytosine dans l'ADN nucléaire (55). Elle se situe autour de 55,5% pour *M. pachydermatis* (48).
- Séquençage partiel d'ARN ribosomal (56, 58)
- Electrophorèses (58, 105)
- PCR (43) et PCR-REA (Polymerase Chain Reaction-Restriction Endonuclease analysis) permettent de typer les sept espèces différentes et de les différencier. Notons que *M. restricta* et *M. globosa* sont très proches au niveau des régions étudiées et que l'identification est dans ce cas moins aisée (58).

En Mai 2006, un kit d'identification a été établi par l'équipe de Kaneko pour les espèces suivantes : *Malassezia pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* et *M. obtusa* mais aussi pour *Malassezia dermatis* et *M. japonica*. Il se base sur l'utilisation de Tween 40, de croissance sur différents milieux de culture supplémentés ou non en Cremophor-EL, esculine... et sur la réaction catalasique. Les résultats de ce kit ont été confrontés à ceux obtenus par biologie moléculaire et ont donné satisfaction (65).

3.2 Ecologie de ces espèces

On a longtemps supposé que les espèces lipodépendantes étaient plutôt anthropophiles et les autres plutôt zoophiles. Même s'il est vrai que *M. pachydermatis* semble adaptée aux animaux et particulièrement au chien, nous avons déjà évoqué le fait que des contaminations humaines sont possibles. Grâce aux nouvelles techniques de diagnose, il a été découvert que les animaux pouvaient être colonisés par plusieurs espèces de *Malassezia* et notamment par des espèces lipo-dépendantes.

On retrouve *M. slooffiae* et *M. sympodialis* chez des porcs sains (41) et *M. sympodialis* chez des chats (27, 61). *M. furfur* et *M. obtusa* ont été isolées en 2000 pour la première fois, d'après les auteurs, sur des chiens ayant des otites externes (28). Une étude en 2002 a fait la découverte de la présence de *M. restricta* sur un cheval (31), alors que cette espèce n'avait été observée jusqu'alors que sur la peau humaine (34). Cette même étude révèle également que, sur les animaux testés (chevaux, caprins, ovins et bovins), la présence d'espèces lipodépendantes (42%) est plus importante que celle de *Malassezia pachydermatis* (3%). En 2005, on retrouve simultanément sur trois chats trois espèces différentes : *M. pachydermatis*, *M. furfur* et *M. globosa*. Dans 50% des cas, on retrouve *M. pachydermatis* et *M. globosa* ensemble (88).

Finalement, aucune réelle spécificité d'hôte n'a été démontrée, d'autant qu'un hôte peut héberger plusieurs espèces et une étude plus approfondie du sujet serait nécessaire.

4. Etude clinique des dermatites à *Malassezia*

4.1 Techniques d'isolement de ces levures

Le diagnostic de dermatite à *Malassezia* repose sur la mise en évidence des levures. Différentes techniques sont utilisées pour les prélèvements qui seront ensuite étudiés par examen direct (cytologie) ou par culture. Les résultats et la fiabilité diffèrent selon les techniques utilisées. L'histologie peut permettre également de détecter la présence de levures (49).

a. Cytologie

Voici les différentes techniques de prélèvement :

- Ecouvillonnage : écouvillon préalablement humecté, roulé sur une lame.
- Raclage cutané : récolte au bistouri mousse et étalement sur une lame.
- Calque cutané par impression : frottement vigoureux de la lame sur la lésion.
- « Scotch test » (ou test à la cellophane adhésive)

Les prélèvements sont séchés à l'air puis colorés. Plusieurs colorations sont disponibles mais les plus fréquemment utilisées sont le Diff Quick®¹ dont l'avantage est d'être rapide et facile, ainsi que le May Grünwald Giemsa dont la couleur résiste mieux au temps. La lame est ensuite observée au microscope avec les objectifs x40 puis x100 (immersion). Le nombre de levures observées par champ microscopique à dénombrer pour conclure à une action pathogène de *Malassezia pachydermatis* est sujet à controverse (4,5). En effet, le simple isolement de levures sur la peau n'est pas synonyme de dermatite à *Malassezia*. Pour certains auteurs, l'observation d'une levure par champ est significatif, pour d'autres il en faut 3 à 5 (18, 49), voire plus de 10 (4, 5, 34, 49).

Dans le cas d'une pododermatite, le test à la cellophane adhésive s'est révélé être le plus approprié pour mettre en évidence les levures, par rapport au calque par impression ou au raclage. Dans ce cadre, le calque par écouvillonnage semble inadapté (4).

b. Mise en culture

La technique de référence reste la culture fongique. Elle permet de plus d'affiner le diagnostic en tentant d'identifier l'espèce en cause. L'examen direct des

¹ Diff quick : Baxter, France.

lésions est intéressante mais reste moins sensible que la culture fongique. Par contre, la présence de colonies ne prouve pas l'action pathogène des *Malassezia*. Toutefois elle reste onéreuse car nécessite souvent l'envoi des prélèvements dans un laboratoire spécialisé. Elle ne permet qu'un résultat différé, n'est pas quantitative (47) et reste donc peu utilisée en pratique, puisque la cytologie permet une première approche (4, 5).

On retrouve quelques techniques de prélèvement utilisées pour la cytologie (18, 34, 49) :

- Ecouvillonnage : l'écouvillon est délicatement roulé sur la gélose.
- « Scotch-test » : appliquer le scotch sur les zones à tester puis sur la gélose.
- « Contact plates techniques » : application directe d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture sur la zone à prélever.
- Application d'un carré de moquette frotté plusieurs fois sur le corps de l'animal, sur le milieu de culture
- Ensemencement de poils
- Récupération d'un liquide de détergence de la peau ou d'oreille et mise en culture du liquide (10, 34)

La mise en évidence de levures au niveau lésionnel n'est pas suffisante pour établir le diagnostic d'une dermatite à *Malassezia*. Il se fonde sur également sur l'anamnèse et l'examen clinique (49).

4.2 Etude clinique des formes cliniques des Malassezioses

a. Chez l'animal

La dermatite à *Malassezia* est très prurigineuse et souvent corticorésistante (3, 18, 61). Chez le chien, l'érythème (diffus ou localisé) est la lésion primaire la plus constante (49, 61). Cette dermatite se caractérise également par un état kérato-séborrhéique à l'origine d'une odeur rance avec des squames et des croûtes, une alopecie diffuse et parfois des macules, des papules érythémateuses, voire des pustules lors de folliculite bactérienne (11, 12, 18, 47). L'alopecie n'est pas systématiquement associée à cette dermatose, mais le léchage et les mordillements en réponse au prurit favorisent la chute des poils. Les lésions siègent préférentiellement au niveau de la face (conduit auditif externe, lèvres), des régions ventrales, du corps (cou, ars, abdomen, aine, région anale) et des espaces interdigités. Lorsqu'elles sont anciennes, elles se pigmentent et se lichénifient (18).

Une des manifestations les plus fréquentes de la dermatite à *Malassezia* est l'otite érythémateuse cérumineuse et prurigineuse. Le cérumen est abondant, malodorant d'une odeur rance caractéristique, formant un exsudat brun épais et cireux (34).

b. Chez l'Homme

Malassezia pachydermatis est rarement associée aux maladies touchant l'Homme. Toutefois, les autres espèces de *Malassezia* peuvent être responsables de dermatites à la symptomatologie variable :

- Pityriasis versicolor : il affecte le tronc, les bras et les épaules. Il est caractérisé par des squames et des taches hypo ou hyperpigmentées et par un léger prurit (1, 110). *M. globosa* serait la première cause du pityriasis versicolor suivie de *M. furfur* (110).
- Pityriasis capitis : il s'agit d'une maladie chronique du cuir chevelu, caractérisée par des desquamations et dans certains cas par des démangeaisons et des rougeurs (74). Les zones généralement atteintes sont le front et la zone située derrière les oreilles, et parfois d'autres régions du visage. On considère souvent que le principal agent de cette affection est *Malassezia furfur* mais l'étude de Gemmer C.M. montre que ce n'est pas toujours le cas (43, 74).
- Dermite séborrhéique : elle touche le visage, le cuir chevelu et le haut du tronc. L'épiderme est érythémateux et recouvert de squames épaisses jaunâtres. C'est une affection fréquente, particulièrement chez les sidéens et les nouveaux-nés prématurés (1, 84)
- Folliculite à *Malassezia* : ce sont des papules et des pustules prurigineuses localisées au niveau du thorax et du haut des bras. Les levures sont retrouvées autour des duvets et dans les follicules pilaires. Elle est souvent observée chez des individus immunodéprimés (1).

On retrouve les levures du genre *Malassezia* également comme agent de complication dans les dermatites atopiques chez l'Homme ou dans l'acné vulgaire par exemple (1).

4.3 Interaction des *Malassezia* avec la peau de l'hôte

En tant que flore commensale, les levures ne nuisent pas à leur hôte. Lorsqu'elles deviennent pathogènes, elles libèrent plusieurs enzymes qui lèsent la peau. Elles produisent des protéases qui stimulent les terminaisons nerveuses cutanées ce qui explique le prurit (49), ainsi que des lipases qui modifient le film lipidique cutané de surface (18). Les phospholipases en particulier, endommagent les membranes des cellules de l'hôte et contribuent à l'apparition des lésions cutanées (15). Cafarchia *et al.* ont montré que les *Malassezia* que l'on retrouve sur des sites lésionnels, contrairement à celles recueillies sur une peau saine, produisent des phospholipases, qui pourraient faire partie des facteurs expliquant les mécanismes pathogéniques de ces levures (15).

La réponse de l'hôte à la présence des levures et à leurs agressions fait intervenir des mécanismes de défense non spécifiques (barrière physique, flore bactérienne commensale, phagocytose par les polynucléaires neutrophiles) et des mécanismes spécifiques à médiation cellulaire. Dans ce deuxième cas, les

antigènes sont présentés par les cellules de Langerhans aux lymphocytes qui produisent alors des lymphokines et induisent la multiplication de Lymphocytes T killer. Les lymphokines stimulent la phagocytose par les macrophages et la multiplication des cellules basales de l'épiderme. Les levures sont soit éliminées par destruction (LT killer et phagocytose), soit mécaniquement avec les squames, produits en grande quantité suite à l'accélération du turn over épidermique (1, 18, 76). Ces réactions de défense conduisent à la mise en place d'un état kérato-séborrhéique.

4.4 Facteurs favorisants

Les modifications des mécanismes de défense de l'hôte que nous venons de décrire peuvent être altérés et favoriser le passage de l'état saprophyte de la levure à l'état de pathogène. Les facteurs favorisants sont les suivants (18, 52, 87) :

- un désordre kérato-séborrhéique primaire ou secondaire
- une humidité excessive (facteurs climatiques, léchage par l'animal, conformation étroite du conduit auditif externe ou présence de poils dans celui-ci)
- une rupture de la barrière épidermique
- des plis cutanés

Les ultraviolets (à forte dose) pourraient moduler la réponse immunitaire et diminuer la résistance aux levures mais aussi aux bactéries, parasites et virus (111).

Ces facteurs sont souvent liés à l'existence de causes sous-jacentes :

- Etats allergiques : Dermatite atopique, Dermatite Allergique aux Piqûres de Puces, Intolérance alimentaire, Allergies de contact (18, 47, 49)
- Pyodermite (18)
- Dermatites parasitaires : Gale (34, 57), Démodécie (34, 49). La démodécie est un cas particulier car elle est généralement associée à une immunodépression propice au développement des agents opportunistes. De plus, *Demodex canis* est responsable d'une hyperproduction de sébum favorisant la multiplication de *Malassezia pachydermatis* (49).
- Dysendocrinie (hypothyroïdie)
- Trouble primaire de kératinisation : dysplasie du West Highland Terrier ou dermite hyperplasique idiopathique encore mal connue (3, 49)
- Cause iatrogène (administration de corticoïdes ou d'antibiotiques) (49, 61)

5. Traitements des Malassezioses en médecine vétérinaire

5.1 Présentation des antifongiques disponibles et de leurs formulations

Trois classes de molécules ont un pouvoir antifongique, c'est-à-dire qui empêchent le développement des champignons. Ce sont les antiseptiques, les antifongiques stricts et les antibiotiques ayant des propriétés antifongiques. On peut

mentionner également des traitements dits naturels, comme l'utilisation topique de *Melaleuca alternifolia* (59) ou l'emploi d'extrait de fruit d'*Archangelica officinalis* (48).

a. Antiseptiques

Ils sont couramment utilisés dans les préparations pharmaceutiques, humaines ou vétérinaires. Il s'agit de la chlorhexidine (Pyoderm®), de la polyvidone iodée (Vétédine®), de l'acide undécylénique (Pruritex lotion®), du polidocanol (détécaïne®) ou du sulfure de sélénium (Selsun®) (35).

b. Antifongiques stricts

Ils sont fortement représentés par la famille des azolés avec le kétoconazole, l'énilconazole le climbazole, le thiabendazole, l'itraconazole, le voriconazole, le clotrimazole, le fluconazole, le bifonazole etc... (34, 48, 91, 103). Ils perturbent la synthèse de l'ergostérol, constituant majeur de la paroi des champignons en se fixant sur le cytochrome P450. Il en résulte une perturbation de l'activité des différentes enzymes membranaires et de la perméabilité cellulaire (18). A forte concentration, certains dérivés azolés (miconazole, énilconazole, kétoconazole) ont également une action anti-coccis Gram+ (34).

Le kétoconazole possède de plus des propriétés anti-inflammatoires par son action sur la synthèse des leucotriènes. Il s'utilise à une posologie de 10 mg/kg/j (Kétofungol®) en début de repas par voie orale. Le traitement dure d'un à deux mois et doit être poursuivi 7 à 10 jours au-delà de la guérison (3, 18, 49, 61). Le kétoconazole est généralement bien toléré, mais une surveillance biochimique est nécessaire pour un traitement sur le long terme. En effet, il présente une toxicité hépatique qui se traduit par une anorexie, des vomissements et des transaminases qui augmentent (18, 49, 61). Il existe aussi des risques de tératogénèse (48).

Parmi les antifongiques, on répertorie également la terbinafine ou l'amorolfine. La terbinafine par voie orale à 30 mg/kg/j pourrait constituer une bonne alternative à l'administration de kétoconazole pour la gestion des dermatites à *Malassezia* chez le chien car elle présente peu de toxicité et un indice thérapeutique élevé sur les humains (52, 100).

Les hydroxy-pyridones sont une autre famille d'antifongiques (112). Le ciclopirox à 1,5% (ou ciclopiroxolamine) est le plus utilisé de la famille dans les formulations pharmaceutiques antipelliculaires (72), suivi de la Piroctone olamine. Cette famille possède en plus des propriétés antibactériennes.

Il est intéressant de noter qu'un antifongique strict, la 5-fluorocytosine n'a aucune action sur *Malassezia pachydermatis* (43, 48).

c. Antibiotiques ayant une activité antifongique

Il s'agit surtout de macrolides polyènes : la nystatine, l'amphotéricine B et la pimaricine. Ces molécules forment des complexes insolubles avec les stérols (ergostérol) de la membrane cellulaire de la levure qui provoquent l'altération physique de la membrane (48).

5.2 Démarches thérapeutiques

Le traitement par voie systémique est administré lorsque les levures sont situées en profondeur dans l'épiderme, dans les follicules pileux ou dans des endroits peu accessibles aux traitements topiques.

Un traitement antifongique local associé à des shampooings kératolytiques et/ou antifongiques et des humidifiants peut se révéler suffisant lorsque les levures ne sont présentes qu'en nombre réduit. Il représente une alternative au traitement systémique et est rarement associé à ce dernier (18).

Il serait aussi intéressant de combiner plusieurs molécules à modes d'action différents : antiseptiques et antifongiques comme la chlorhexidine et le miconazole par exemple (12). L'emploi d'acides gras essentiels et de réhydratants n'est pas indispensable mais permet une guérison plus rapide de la dermatose (34).

II. LA PIROCTONE OLAMINE

La piroctone olamine est une molécule antifongique de la famille des hydroxy-pyridones. Ce composé est souvent utilisé dans des produits cosmétiques en médecine humaine à une concentration maximale de 1% (produits rinçables) ou 0,05% à 0,1% (concentration suffisante dans les produits qui ne se rincent pas). La piroctone olamine est très efficace et est même considérée comme un agent antipelliculaire de seconde génération (97). De plus, elle possède une très faible toxicité. Elle est par ailleurs particulièrement adaptée à la fabrication de shampooings antipelliculaires et de soins pour les cheveux de par sa solubilité dans les tensio-actifs aqueux ou mixtes (eau-alcool).

1. Famille et structure de la Piroctone olamine

1.1 Famille des hydroxy-pyridones

La piroctone olamine appartient à la famille des hydroxy-pyridones au même titre que le ciclopirox et le rilopirox. Cette famille forme une classe d'antifongiques qui ne ressemble à aucune autre car leur mode d'action est à la fois original et complexe (69). Les propriétés biologiques de ce groupe ont été étudiées en se basant sur l'exemple du ciclopirox ; celui-ci a en effet été longtemps le seul composé à être utilisé en médecine humaine. Les hydroxy-pyridones possèdent des propriétés antifongiques mais également antibactériennes et montrent d'excellentes capacités de diffusion dans la kératine (75).

1.2 Synonymes et noms chimiques de la Piroctone olamine

a. Noms courants

Piroctone olamine est la dénomination courante de ce composé. On la retrouve dans la littérature sous le terme d'Octopirox, son synonyme (24). Elle se présente sous forme de sel, combiné à de l'éthanolamine (23), ce qui lui vaut également l'appellation de sel de Piroctone éthanolamine.

b. Noms systématiques (23)

- 1-Hydroxy-4-méthyl-6-(2,4,4-triméthylpentyl)-2(1H)-pyridone avec 2-aminoéthanol (1:1)
- 2(1H)-Pyridinone, 1-hydroxy-4-méthyl-6-(2,4,4-triméthylpentyl)-, avec 2-aminoéthanol (1:1)

1.3 Dénomination officielle : Piroctone olamine

La piroctone olamine est également répertoriée dans des bases de données par des codes.

- Numéro CAS : 68890-66-4

Il s'agit du numéro d'enregistrement après de CAS (Chemical Abstracts Service), une division du groupe American Chemical Society. Chaque numéro est unique, correspond à une seule substance et n'a pas de signification chimique.

- Numéro EINECS : 272-574-2

Ce numéro permet d'identifier une substance chimique répertoriée dans l'Inventaire Européen des Substances chimiques Commerciales Existantes (EINECS : European Inventory of Existing Commercial chemical Substances).

1.4 Formules chimiques

a. Formule brute

La Piroctone olamine C₁₄H₂₃NO₂ est liée à son sel C₂H₇NO.

b. Formules développée et simplifiée (37, 38)

La formule développée correspond à l'agencement des atomes. Dans la formule simplifiée on ne représente pas les atomes de carbone (figure 4).

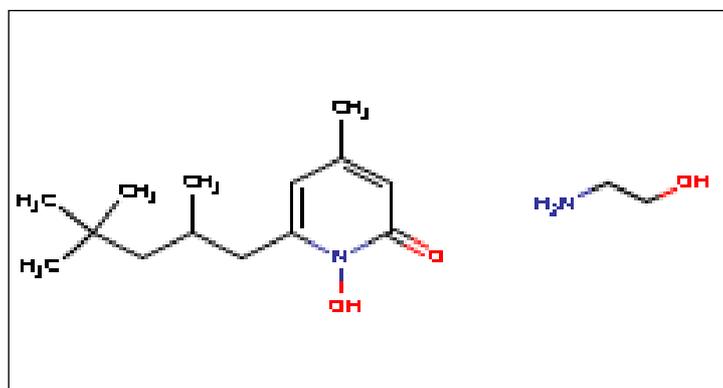


Figure 4 : Formule développée de la Piroctone olamine.

2. Propriétés de la Piroctone olamine

2.1 Propriétés physiques

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre blanche cristalline dont la masse molaire de composé est de 298,4 g/mol. Elle n'a pas d'odeur caractéristique. Sa pureté est de 98% et son point de fusion se situe entre 130 et

135 °C, température à laquelle la piroctone olamine est en voie de décomposition. L'humidité maximale est de 0,3% et la teneur en sulfate doit être au maximum 0,2% (23, 24).

2.2 Propriétés chimiques

Le **pH** d'une suspension aqueuse contenant 1% de piroctone olamine varie, selon l'échantillon testé, de 8,5 à 10 (à 20°C). Pour la Piroctone olamine utilisé dans cette expérience, le pH en solution aqueuse (1%) a été évalué à 9,5 (24). Son pKa est de 7,4 (figure 5). Donc, dans une solution à pH neutre, la part la plus importante de la Piroctone olamine est sous forme d'acide libre (23, 24). Dans une gamme de pH allant de 3 à 9, aucune détérioration du principe actif ni diminution de son efficacité n'a été observée même après un stockage prolongé.

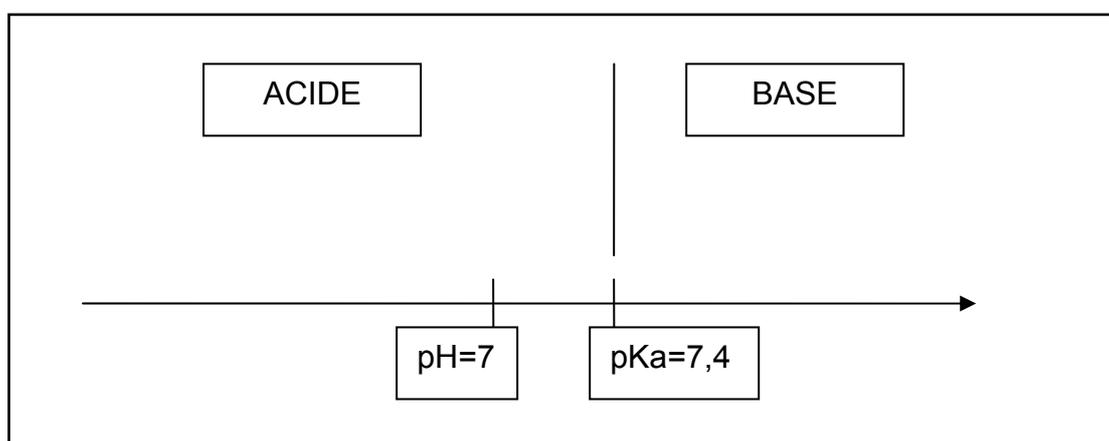


Figure 5 : Répartition des formes acides et basiques de la Piroctone olamine selon le pH.

La **solubilité de la Piroctone olamine** est assez variable selon le solvant et le pH.

Elle varie de 1 à 20% selon la nature du solvant (23). Elle se situe autour de 10 à 20 % dans l'alcool, selon que l'on approche d'une solution pure d'alcool ou non. On notera que la solubilité est très convenable dans le 1,2-propylène glycol (16%) et meilleure que dans l'éthanol (10%). La Piroctone olamine est peu soluble dans l'eau (seulement 0,05%) et dans les huiles (0,05% à 0,1%). La solubilité peut-être améliorée par l'adjonction de tensio-actifs (37).

Cette solubilité dépend également du pH de la solution. La solubilité de ce composé dans les solutions aqueuses est meilleure à pH neutre voire faiblement alcalin, plutôt qu'à pH acide, puisque comme nous venons de le voir, à pH acide, la Piroctone olamine est sous forme d'acide libre. En fait, la Piroctone olamine a une

solubilité suffisante dans les mélanges eau-alcool ainsi que dans les tensio-actifs utilisés dans le commerce (dont le pH s'échelonne entre 5 et 8).

2.3 Stabilité de la Piroctone olamine

a. Thermostabilité

La Piroctone olamine est connue pour être relativement thermostable. Des températures supérieures à 80°C, atteintes lors de la préparation de certains cosmétiques, n'endommagent pas le produit et ne réduisent pas son efficacité. De plus, malgré le traitement thermique, aucune diminution de la quantité de principe actif contenue dans du shampoing n'a été observée après un stockage de 12 mois à 40°C (23).

Une étude en 1999 (25) a comparé la thermostabilité d'antipelliculaires naturels (Sulfoprolamine et usnate de sodium) et de synthèse (climbazole et piroctone olamine), en solution aqueuse diluée à un pH proche de la neutralité. Il est apparu que la piroctone olamine est la molécule la plus stable, avant le climbazole, l'usnate de sodium et de la sulfoprolamine, cette dernière étant particulièrement thermolabile.

Toutefois, une exposition de longue durée à des températures élevées est à éviter autant que possible (23).

b. Photodégradation et photosensibilité

Le Minh et al. en 1996 ont montré que la photodégradation de solutions de Piroctone olamine avec ou sans tensio-actif anionique est pH dépendant. Le taux de dégradation est constant pour un pH donné et une formulation donnée (71).

c. Conservation lors du stockage

Le stockage de la piroctone olamine à la lumière du jour peut endommager le principe actif à cause des rayons UV de la lumière naturelle. Il est donc conseillé de d'utiliser des matériaux opaques pour l'emballage des produits. Des tests de stabilité devraient être entrepris si des matériaux transparents étaient employés. La Piroctone olamine doit être conservée de préférence dans son emballage d'origine, à température ambiante et dans un endroit sec. Dans des conditions convenables, elle peut être stockée au moins trois ans (23).

2.4 Compatibilité de la piroctone olamine avec les matières premières utilisées en cosmétique

La Piroctone olamine est compatible avec la plupart des tensio-actifs, additifs et principes actifs utilisés en cosmétique.

Malgré le caractère anionique de la Piroctone olamine, on peut l'associer avec la plupart des tensio-actifs cationiques (ammoniums quaternaires) ou des principes actifs cationiques. Néanmoins, il est recommandé de prendre garde et de tester la stabilité de ces substances une fois associées. Par contre, des problèmes peuvent se poser en présence d'huiles parfumées, en particulier celles contenant des aldéhydes ou des fonctions cétones (23).

Il faudra être également vigilant à la formation de complexes avec des ions métalliques, particulièrement avec du fer et du cuivre. Par exemple, avec de très faibles quantités de fer (1 ppm Fe), un complexe jaune aisément visible se forme, ce qui peut poser problème lors la commercialisation du produit (23).

Des études ont montré que la piroctone olamine augmente la viscosité de nombreux surfactants. Cette qualité, en général intéressante d'un point de vue économique (réduction de la quantité d'agents modifiant la consistance) doit être prise en considération lors de la formulation d'un nouveau produit (23).

Conséquences pharmacologiques des propriétés physico-chimiques

- Les solutions aqueuses ou alcooliques de Piroctone olamine (à 1%) ont un pH compris entre 9-10. Le rétablissement d'un pH adapté aux préparations dermatologiques (pH entre 5 et 7) peut être obtenu par adjonction d'acide citrique ou d'acide lactique, mais diminue la solubilité de la Piroctone olamine.
- Lors de l'élaboration d'un shampooing, la viscosité peut être augmentée par l'utilisation de la Piroctone olamine.
- La température de 80°C devrait ne pas être dépassée lors de la fabrication d'un shampooing contenant de la Piroctone olamine.
- Il est conseillé de faire des essais de compatibilité préliminaires si l'on utilise des tensio-actifs cationiques ou des colorants.

2.5 Pharmacocinétique

La pharmacocinétique est l'étude de quatre paramètres : l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination. Les études pharmacocinétiques ont pu être menées grâce au marquage au carbone 14 de la Piroctone olamine sur des rats et des chiens (66). L'étude de Black et Kamat (8) précise les données de la pharmacocinétique de la Piroctone olamine :

- Absorption

La biodisponibilité cutanée dépend du temps d'exposition de la peau à la piroctone olamine. En effet, une augmentation significative de la pénétration est obtenue entre 2,5 et 10 minutes de temps de contact. Mais, un temps de contact supérieur à 20 minutes ne modifie pas le taux de pénétration du principe actif (8, 23). Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de différence, en terme d'absorption cutanée, entre une peau rasée ou tondue et une peau avec sa fourrure (8). La peau et les poils conservent 36 à 43% de la dose administrée. L'absorption par la peau du

principe actif et donc le passage dans la circulation systémique s'élève à 4,5% de la dose administrée au bout de 7 jours d'expérimentation (66, 104). Dans un rapport déterminant la quantité de Piroctone olamine restant sur le cuir chevelu, on apprend que la quantité de Piroctone olamine adsorbée est fonction de la concentration en principe actif et du pH. Le taux moyen est de 10 à 20% (40). L'absorption du principe actif est donc faible, tandis que l'adsorption et donc, la diffusion au niveau de la peau est élevée (97), ce qui peut s'expliquer par la haute affinité de la piroctone olamine pour la kératine (42, 75, 97). L'action antifongique de la molécule s'exerce au niveau du stratum corneum et son activité est maintenue après rinçage du shampooing (97).

- Distribution dans l'organisme

Les concentrations sanguines atteignent leur maximum après une administration orale entre 3 et 8 heures, avec une dose de Piroctone olamine égale à 0,24 mg/kg de poids vif, alors qu'après inhalation, on trouve le maximum après 2h pour disparaître au bout de 48h. De très faibles concentrations ont été détectées dans les tissus. Les concentrations maximales ont été relevées dans le foie 6h après administration (25, 11).

- Métabolisation

Le principe actif n'est pas dénaturé par les réactions métaboliques.

- Elimination

La Piroctone olamine inhalée par des rats, ou injectée, est majoritairement excrétée par voie fécale (65-85% de la dose) et minoritairement urinaire (23).

Il est intéressant de noter que la Piroctone olamine est biodégradable dans l'environnement à 80% (23).

2.6 Toxicité

L'indice thérapeutique (IT) pour l'utilisateur d'un shampooing contenant de la Piroctone olamine à 1% a été estimé à 29400. Si bien que la possibilité d'effets systémiques due à l'absorption cutanée de la Piroctone olamine est écartée (8). De nombreuses études ont montré que la Piroctone olamine présente une faible toxicité, qu'elle soit aiguë ou chronique (69, 97, 113).

a. Toxicité par voie orale

- Toxicité aiguë

Elle a été testée sur des rats, des souris et des chiens. On a obtenu une DL50 de 8100 mg/kg pour les rats, et une DL50 = 4300 mg/kg pour les souris. Des doses jusqu'à 1000 furent tolérées par tous les animaux testés. Chez le chien, on a

trouvé une DL50 supérieure à 4000 mg/kg. Ainsi la Piroctone olamine ne montre pas de toxicité aiguë par voie orale (23).

- Toxicité chronique

Nolen *et al.* ont donné pendant six semaines de la Piroctone olamine par voie orale et ont supplémenté la ration de certains groupes en fer. Les rats qui ont reçu de la Piroctone olamine ont perdu du poids et ont développé une anémie microcytaire et hypochrome. Avec la supplémentation en fer, les autres rats ont grossit de façon constante. Ceci confirme que la piroctone olamine chélate le fer et montre une toxicité chronique par voie orale, chez le rat, non négligeable (90).

Dans une autre étude, des doses allant jusqu'à 800 mg/kg de poids vif ont été administrés à des rats par le biais d'une sonde stomacale pendant 30 à 90 jours. La dose maximale non toxique a été de 100 mg/kg/jour. Aucune lésion organique n'a été observée et ce quelque soit la dose (23).

Aucun signe n'a été relevé chez des chiens ayant jusqu'à 100 mg/kg/jour de piroctone olamine dans la nourriture de chiens, pendant 30 et 90 jours (23).

b. Toxicité par voie cutanée

- Administration cutanée

La toxicité par voie percutanée fut testée à l'aide de patchs appliqués sur des rats pendant 24h, contenant une solution saturée de 1,2-propylène glycol en Piroctone olamine. Des doses de 2000 mg/kg de poids vif (à un pH de 9.3 non ajusté) ainsi que 750 mg/kg de poids vif (à un pH de 7, ajusté) ne montrèrent aucune réaction toxique. La DL50 par voie cutanée (de la substance non diluée) sur des rats est supérieure à 2000mg/kg de poids vif. La piroctone olamine ne montre donc pas de risque significatif concernant la toxicité aiguë transdermique (23).

Pour évaluer la toxicité chronique, un shampooing à base de 0,5% de Piroctone olamine (correspondant à une dose de 0,5 mg par animal) a été appliquée sur 30 lapins, ainsi qu'un topique pour les cheveux avec 0,1% de Piroctone olamine (soit 0,1 mg par animal). Aucune toxicité n'a été mise en évidence, ni au niveau cutané ni au niveau viscéral (23).

- Tolérance cutanée

Des tests d'irritation cutanée ont été menés sur des lapins pendant plus de 24h. La substance test utilisée était une solution de 0,5% de Piroctone olamine et de 5% d'un sel de lauryl polyglycol éther sulphasuccinate. La peau des animaux suite à l'application était en bonne état. Seulement quelques irritations ont été relevées. Une solution à 5% du même tensio-actif sans Piroctone olamine a montré le même degré d'irritation. Ainsi, sur une courte durée, la Piroctone olamine n'accroît pas les irritations cutanées. Par contre en solution dans le 1,2-propylène glycol (pH 7 ajusté), la Piroctone olamine provoque une légère irritation, qui rétrocede au bout de 72h (23).

Une application cutanée quotidienne sur des rats d'une formulation contenant 0,5 à 1% de Piroctone olamine dans du 1,2-propylène glycol, pendant 6 à 12 mois, a

montré des modifications de la peau au niveau du site traité, mais rapidement réversibles. Aucun effet systémique n'a pu être observé (23).

Par ailleurs, 30 personnes avec un état pelliculaire très sévère ont testé un shampooing contenant 0,2 à 1% de Piroctone olamine ; aucune incomptabilité avec cette peau fragilisée n'a été observée après sept applications durant quatre semaines (23).

- Sensibilisation cutanée

Des études sur des cochons d'Inde n'ont pas mis en évidence de sensibilisation à l'administration de Piroctone olamine ni de photosensibilisation (23).

Des études sur des sujets humains, après application d'une solution de Piroctone olamine à 0,5% ne révélèrent pas de lésion d'irritation, ni de sensibilisation, ni de photosensibilisation suite à une exposition à des UV-A et des UV-B (23).

- Compatibilité avec les muqueuses

Elle est testée sur la muqueuse oculaire, à l'aide d'un shampooing dilué dans de l'eau, contenant 15% de lauryl éther sulfate de sodium et 1% de Piroctone olamine (pH 7 ajusté avec de l'acide citrique). Le témoin négatif correspond à la même formulation sans Piroctone olamine. Les deux préparations se révélèrent modérément irritantes.

Lors d'études similaires portant sur des shampooings commerciaux contenant 0,3% ou 0,5% de Piroctone olamine, ou sur des topiques à base d'isopropanol – eau avec 0,2% de Piroctone olamine, la comparaison avec le témoin négatif montre une très faible irritation (23).

c. Embryotoxicité, tératogénèse

La Piroctone olamine n'est ni embryotoxique, ni tératogène d'après des études sur des lapins et des rats. Elle n'a aucune incidence sur la gestation, quelque soit le stade, ni durant la lactation, ni sur la gestation suivante. Aucune des études menées *in vitro* n'ont montré de pouvoir mutagène de la Piroctone olamine (23).

Conclusions toxicologiques

Ces résultats ont permis au SCCNFP (Scientific Committee For Cosmetics And Non-Food Products) d'approuver l'utilisation de la Piroctone olamine dans les cosmétiques. Des limites sont toutefois imposées : la concentration doit être au maximum de 1% pour les produits qui se rincent et de 0,5% pour les autres produits (115).

3. Spectre d'action et Mode d'action

L'action antipelliculaire de la Piroctone olamine est attribuée à ses actions antibactériennes et antifongiques.

3.1 Spectre de la Piroctone olamine

La Piroctone olamine montre un large spectre *in vitro* sur les dermatophytes, les levures et les bactéries (19, 69, 97, 102).

Elle a une action antibactérienne à des CMI indiquées entre parenthèses :

- Bactéries Gram + telles que *Staphylococcus aureus* (31 à 63 µg/ml) ou *Streptococcus pyogenes* (63 µg/ml).
- Bactéries Gram – comme *Escherichia coli* (63 à 152 µg/ml), *Salmonella spp.* (125 à 250 µg/ml), *Klebsiella spp.* (125 à 250 µg/ml), *Enterobacter spp.* (250 à 500 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (63 à 500 µg/ml), *Corynebacterium spp.* (63 µg/ml) ; cette liste n'étant pas exhaustive.

L'action antibactérienne de la Piroctone olamine, exprimée en CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), a été déterminée par une série de dilutions sur milieu de Mueller Hinton à pH 7, avec un solvant à base d'acétone et d'eau (23).

La CMI pour les levures et les champignons a été déterminée suite à des tests en milieu Sabouraud, pH 6.5. La Piroctone olamine était mise en solution dans un mélange éthanol-eau. Les CMI mesurées se sont échelonnées entre 0,5 et 4 µg/ml pour la plupart des espèces de champignons. La Piroctone olamine est antifongique, entre autres, pour *Trichophyton mentagrophytes* (1 à 2 µg/ml), *Microsporum canis* (1 µg/ml), et *Candida albicans* (1 µg/ml) (23).

Pour le genre *Malassezia*, elle se situe entre 16 et 31 µg/ml dans la brochure Clariant (23) et de 16 à 64 µg/ml dans la publication de Schmidt (103). Des travaux ont montré que pour l'espèce *Malassezia furfur*, l'inhibition de son développement était obtenue pour des concentrations entre 62,5 et 125 µg/ml. Une autre étude nuance ces résultats et mentionne que certaines hydroxy-pyridones (le rilopirox en l'occurrence) sont antagonisés par le milieu de culture de Sabouraud (60, 96). A cause de cette interaction, les auteurs redéfinissent la concentration de Piroctone olamine nécessaire à une action antifongique et l'évaluent à 6 µg/ml (60).

3.2 Mode d'action

L'action antifongique de la famille des hydroxy-pyridones a été étudiée à partir du modèle du ciclopirox (ou ciclopiroxolamine). Etant donné que son activité antifongique a été attribuée au groupement hydroxy-pyridone, on peut extrapoler ce mode d'action à toute la famille et donc à la Piroctone olamine (75).

Ce mode d'action est complexe et partiellement compris (106). L'activité antifongique semble résulter de multiples processus métaboliques au sein de la cellule visée. Il faut rappeler que les hydroxy-pyridones ont une haute affinité pour les cations métalliques trivalents comme le fer et l'aluminium (57).

Or ce cofacteur enzymatique est nécessaire aux cytochromes mitochondriaux qui sont impliqués dans le transport des électrons, en particulier au complexe I (NADH-

ubiquinone oxydoreductase) (70). La neutralisation du fer et de l'aluminium inhibe cette réaction métabolique et donc la production d'énergie cellulaire (42, 64, 70, 106). Par ailleurs, le Ciclopirox inhibe l'activité des catalases et des peroxydases intracellulaires chargées de dégrader les peroxydes toxiques pour la cellule (70, 75). Des études antérieures ont montré que le ciclopirox également altère les mécanismes de transport transmembranaire de la levure. La capture des nutriments vers l'intérieur des micro-organismes est donc affectée. Dans les cellules en croissance, la déplétion en acides aminés essentiels et nucléotides conduit à une diminution de la synthèse protéique et des acides nucléiques (42).

La Piroctone olamine présente aussi une action inhibitrice sur la réplication de l'ADN. Cette hydroxy-pyridone n'a pas d'effet direct sur les enzymes de la réplication mais la chute du taux d'ATP rend cette synthèse impossible (64).

Le ciclopirox a également des effets anti-inflammatoires, en inhibant la 5-lipoxygénase et la cyclo-oxygénase (57).

Etant donné la complexité du mode d'action des hydroxy-pyridones, il est peu probable que des phénomènes de résistance apparaissent.

4. Formes galéniques des hydroxy-pyridones

La Piroctone olamine est utilisée en médecine humaine et vétérinaire avec différentes formes et formulations. Elle est incorporée dans des shampooings (42, 44, 98), des lotions (98), des crèmes (23), des déodorants et des vernis (36).

Les concentrations de la Piroctone olamine devraient se situer entre 0,1 et 1%, selon le type de produit et l'utilisation que l'on en fait. La concentration est en effet diminuée si le produit n'est pas rincé. Dans ce dernier cas, une concentration entre 0,05% et 0,1% est suffisante (23).

Les concentrations en Piroctone olamine varient selon les préparations cosmétiques proposées en médecine humaine :

| PREPARATIONS | CONCENTRATION EN PIROCTONE OLAMINE |
|---------------------|------------------------------------|
| Shampooing | 0,5 - 1,0 % |
| Solution capillaire | 0,05 - 0,1 % |
| Après-shampooing | 0,1 - 0,3 % |
| Gel ou lotion | 0,05 - 0,2 % |
| Crème capillaire | 0,1 - 0,3 % |
| Déodorant | 0,1 - 0,3 % |

Tableau 1 : Formes galéniques et concentrations de la Piroctone olamine.

La quantité de Piroctone olamine dans un produit fini peut être déterminée grâce à une méthode colorimétrique. Cela peut servir lors d'une étape de production pour contrôler la bonne marche de la chaîne de fabrication (23).

4.1 Présentations en médecine humaine

a. Produits disponibles sur le marché

Des études en cosmétologie humaine ont montré que les produits contenant de la Piroctone olamine, en particulier shampoings et solutions capillaires ont des propriétés antipelliculaires (23). La Piroctone olamine n'est à l'heure actuelle utilisée que dans des produits cosmétiques, qui ne requièrent donc pas d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). La définition d'un produit cosmétique est donnée par l'article L5131-1 du Code de la Santé Publique. Il s'agit d'une substance ou d'une préparation destinée à mettre en contact avec les diverses parties du corps humain en vue de nettoyer, parfumer modifier l'aspect, protéger, de maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles (101). L'utilisation de la Piroctone olamine en médecine humaine est assez fréquente et on la retrouve dans de nombreux produits d'hygiène, seule ou associée à d'autres agents antimicrobiens. Voici quelques exemples :

- Shampoing dermatologique anti-pelliculaire Dercos® (0,5% de Piroctone olamine et 0,1% d'acide salicylique)
- Shampoing anti-pelliculaire Hegor® (0,3% de Piroctone olamine et 0,75% de zinc pyrithione)
- Shampoing antipelliculaire Neutrogena® T Gel sans goudron (Piroctone olamine)
- Crème correctrice des imperfections locales Effaclar AI chez La Roche Posay (acide salicylique, Piroctone olamine et niacinamide)

On retrouve également les autres composés de la famille des hydroxy-pyridones sous différentes formes :

- gel pour les infections fongiques superficielles (ciclopirox : Loprox®),
- shampoing traitant la dermatite séborrhéique du cuir chevelu avec le ciclopirox (Sébiprox®)
- crème à 1% de ciclopirox (Mycoster®)
- poudre (Mycoster®)
- Solution (Mycoster®)

Mycoster® permet de lutter contre les mycoses cutanées, les onychomycoses à dermatophytes, les dermatites séborrhéiques du visage et les intertrigos des orteils à dermatophytes. Les études menées avec une crème à base d'1% de ciclopirox ont montré une efficacité fongistatique et fongicide du produit et une pénétration rapide dans l'épiderme (20).

Le Sébiprox® et le Mycoster® sont les deux seules présentations contenant une hydroxy-pyridone à avoir une Autorisation de Mise sur le Marché, alors que les autres sont considérés comme des cosmétiques.

b. Influence du temps d'application

Une étude documente le bénéfice de la durée d'application pour traiter les états pelliculaires. Deux shampoings sont testés et comparés, l'un à base de Kétoconazole à 1% et l'autre à base de Piroctone olamine à 1%. Les comparaisons sont réalisées par la méthode de la demi-tête (une demi-tête traitée, une demi-tête témoin) avec deux temps de pose (30 secondes et 5 minutes) et deux produits (kétoconazole et Piroctone olamine) (93). Il en ressort que les deux shampoings ont induit une réduction significative de l'état squameux et de la colonisation par des levures. Les effets bénéfiques sont présents après une seule utilisation du shampoing et persistent pendant 3 jours. L'amélioration est plus importante lorsqu'un délai de 5 minutes est respecté. A temps de contact égal (5 minutes), l'efficacité du shampoing au kétoconazole est supérieure à celui contenant de la piroctone olamine (93).

4.2 Présentations en médecine vétérinaire

Dans le monde vétérinaire, la Piroctone olamine est commercialisée uniquement par le laboratoire Virbac. Les autres composés de la famille des hydroxy-pyridones ne sont pas encore disponibles pour les animaux. Ce laboratoire propose trois présentations à base de cette molécule (32, 35). Ce sont des shampoings qui sont considérés comme produits d'hygiène et ne requièrent donc pas d'Autorisation de Mise sur le Marché (101).

Il est intéressant de préciser qu'il a été prouvé que la longueur des poils (expérience réalisée sur poils longs et poils coupés, avec temps de pose de 5 min puis rinçage) n'a pas d'effet significatif sur l'adsorption cutanée (8).

- Allermyl® shampoing

Ce shampoing est destiné à calmer les irritations et les démangeaisons cutanées dans le cadre d'états allergiques (notamment l'atopie), à contrôler les proliférations microbiennes et à restaurer l'intégrité cutanée (42). C'est un shampoing fluide à haute rinçabilité (32). Il contient des agents anti-irritants et immunomodulateurs (vitamine E, mono-saccharides et oligo-saccharides, base lavante douce), des acides gras essentiels (oméga 6) et des antiseptiques dont la Piroctone olamine (32, 35, 42).

Des études ont été menées pour étudier l'action antifongique d'Allermyl®. La population de *Malassezia pachydermatis* diminue sensiblement après une seule application de shampoing. D'après les résultats de l'étude, les auteurs déduisent que cette activité antifongique n'est pas liée à l'effet mécanique d'Allermyl® (comparaison avec un shampoing sans Piroctone olamine) et précisent que ce shampoing a une activité rémanente sur la peau du chien (13).

Sous le même nom, la lotion Allermyl® ne contient pas de Piroctone olamine (35).

- **Sebomild® shampooing**

Sebomild® P est un produit de soin des troubles dermatologiques associés aux peaux grasses et squameuses (35). L'originalité de ce shampooing repose sur une association complémentaire d'agents kérato-régulateurs et kératolytiques (lactate d'ammonium et Piroctone olamine), antiseptiques et antifongiques (Piroctone olamine) et hydratants (lactate d'ammonium et chitosanide) (35). Ce shampooing est conseillé pour les états kérato-séborrhéiques modérés du chien et du chat. La lotion renferme de la Piroctone olamine et de l'acide salicylique (98).

- **Sebolytic®, shampooing nouvelle formule**

La nouvelle formule contient de l'acide salicylique, de la Piroctone olamine, du gluconate de Zinc, de la vitamine B6, des acides linoléiques et gamma-linoléique, et de l'huile essentielle de *Melaleuca*. Cette association synergique permet de corriger les troubles de la kératinisation, de normaliser les sécrétions sébacées et de contrôler les proliférations microbiennes, l'inflammation associée et l'odeur désagréable (97).

Ce shampooing est conseillé pour les états kérato-séborrhéiques sévères du chien (32).

4.3 Etudes comparatives de la Piroctone olamine avec d'autres antifongiques

- ***In vitro***

L'activité de la Piroctone olamine a été étudiée, *in vitro*, sur *Malassezia furfur* et a été comparée à celle d'autres antifongiques. Il ressort que le climbazole montre la meilleure efficacité, suivi de la pyrithione-zinc. Le sulfure de sélénium et la Piroctone olamine nécessite des CMI beaucoup plus élevées (103).

Rivalland *et al.* comparent l'activité antifongique de la Piroctone olamine et de la pyrithione-zinc à plusieurs concentrations sur *Malassezia furfur*. Il s'avère que la Piroctone olamine manifeste une activité antifongique plus importante que la pyrithione-zinc. Une concentration de Piroctone olamine comprise entre 0,5 et 1% peut être préconisée pour obtenir une bonne efficacité (99).

- ***In vivo***

Futterer E. a étudié les effets des traitements antipelliculaires à base de Piroctone olamine et de pyrithione-zinc sur des sujets (masculins et féminins, âge 22-71 ans) en appliquant les produits (shampooings ou crèmes à rincer) sur la moitié de la tête. Cette technique permet une comparaison directe, sur le même sujet et au même moment en double aveugle (38).

Les résultats ont montré que la Piroctone olamine était plus efficace, dans le cadre d'un traitement antipelliculaire, que la pyrithione-zinc aux mêmes concentrations (38). Un des effets secondaires d'un traitement antipelliculaire est la perception de cheveux gras après l'utilisation de ces produits. Les travaux de Piérard-Franchimont *et al.* ont en effet conclut que les shampooings, notamment ceux à base de sulfure de sélénium augmentait le taux de sécrétion de sébum de 58% après 5 semaines de

traitement. La Piroctone olamine ne modifie pas la séborrhée les 3 premières semaines mais une augmentation de 19% de la sécrétion de sébum est notée après la cinquième semaine (92). Ceci pourrait être expliqué par la perte de lipides au niveau de la peau pendant la desquamation induite par ces traitements (38).

Une étude similaire obtient les mêmes résultats que précédemment. Deux shampooings contenant différents principes actifs sont comparés dans un test bilatéral en double aveugle et au hasard du 19 sujets. Le premier shampooing contient de la Piroctone olamine (0,75%) combinée avec de l'acide salicylique (2%) alors que le deuxième contient de la pyrithione-zinc (1%). Les sujets sont traités deux fois par semaine pendant quatre semaines. L'état pelliculaire est évalué avant chaque traitement. Dans les deux cas, l'aspect du cuir chevelu est amélioré. Cependant, la combinaison piroctone olamine- acide salicylique semble être plus efficace que la pyrithione-zinc (74).

III. ETUDE EXPERIMENTALE

Le but de cette étude est de mettre en place des protocoles expérimentaux afin d'évaluer l'efficacité de la Piroctone olamine *in vitro* sur *Malassezia pachydermatis*. Les résultats des deux premiers protocoles (A et B), qui testaient l'efficacité de la Piroctone olamine sous forme de shampooing, ne sont pas interprétables. Cela a donc conduit à l'élaboration du troisième protocole (C) avec le principe actif seul, sous forme de poudre.

1. Etapes communes à tous les protocoles

1.1 Obtention du principe actif

Au moment où nous avons élaboré ce protocole, il nous a été impossible de nous procurer de la Piroctone olamine pure. Aussi, nous avons travaillé avec le seul shampooing vétérinaire ne contenant que de la Piroctone olamine comme composé antifongique : Allermyl®. C'est donc sous cette forme qu'est testée la Piroctone olamine dans les protocoles A et B.

Le protocole C a été réalisé avec de Piroctone olamine (combinée à un sel, l'aminoéthanol) offerte par le laboratoire CLARIANT GmbH (24). Ses propriétés physiques et chimiques nous sont rappelées dans la fiche technique fournie avec la poudre. Certains paramètres sont précisés pour cet échantillon. La température de fusion s'élève à 134°C, le pH à 9,5 et l'humidité de 0,1%. Cette poudre a été fabriquée le 30/07/02, puis stockée dans son emballage d'origine. La durée de validité de l'échantillon est de 5 ans (24).

1.2 Préparation du milieu de culture et répartition dans les boîtes de Pétri

a. Choix du milieu

Nous avons choisi le milieu Sabouraud-Chloramphénicol (SAB CHL-D) sous forme de gélose (milieu solide), qui convient pour l'isolement puis pour la culture des *Malassezia pachydermatis*. L'utilisation d'un antibiotique dans un milieu de culture est controversée car la croissance fongique peut être inhibée. Cependant, la comparaison avec des témoins nous permet de nous affranchir de ce biais. Par ailleurs, il est important dans cette expérience de ne pas avoir de colonisation bactérienne car cela pourrait gêner la lecture des résultats.

b. Préparation du milieu (6)

45.5 g de poudre sont mises en suspension dans 1 litre d'eau bi-distillée. Le tout est soigneusement mélangé grâce à un agitateur électrique puis chauffé jusqu'à ébullition (doucelement au début pour avoir une solubilisation complète). Le mélange est aliquoté dans des tubes, sachant qu'une boîte de Pétri contient de façon standard 18 ml de gélose.

Le milieu ainsi réparti dans les tubes est ensuite passé à l'autoclave 15 min à 120°C. Les tubes sont refroidis au moins 15 sec à température ambiante avant d'être transférés dans une étuve thermostatée à 50°C. Ils pourront y être stockés quelques heures avant d'être utilisés (pas plus de 24h afin d'éviter la dégradation du milieu de culture du fait de l'application d'une telle chaleur). Le stockage en cuve n'est pas une étape obligatoire, il permet de descendre progressivement de la température de surfusion jusqu'à la température de solidification. Dans cette étude, nous avons laissé refroidir les tubes dans l'autoclave avant de couler le milieu dans les boîtes.

c. Répartition du milieu de culture dans les boîtes de Pétri

Les tubes étant au moins à 50°C, le milieu est toujours liquide et permet de ce fait d'être aisément réparti dans les boîtes de Pétri. La répartition s'effectue sous hotte dont le flux d'air laminaire vertical évite la contamination des boîtes et du milieu, par des agents microbiens. Les boîtes restent encore environ 10 min sous la hotte pour un meilleur séchage, limitant ainsi la condensation sur le couvercle et sur la gélose. Les boîtes sont ensuite stockées, couvercle vers le bas (toujours dans le souci de limiter la condensation) au réfrigérateur à 4°C, au maximum pendant 1 semaine (date limite d'utilisation d'après le fournisseur Biomérieux, 6).

1.3 Obtention des *Malassezia pachydermatis* et mise en culture

Des écouvillonnages d'oreilles de chiens sont réalisés afin de récolter les *Malassezia*. Plusieurs échantillons sur des chiens ont été prélevés avant de réussir à cultiver les levures.

Les écouvillons sont délicatement roulés sur le milieu sélectif Sabouraud-Chloramphénicol. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'étuve à 36.5°C – 37°C pendant 3 jours. Des prélèvements de colonies sont observés entre lame et lamelle au microscope (huile à immersion, objectif 100) pour permettre leur identification. Enfin, les colonies de *Malassezia pachydermatis* sont repiquées sur d'autres boîtes afin d'être purifiées.

C'est à partir de ces souches qu'ont été réalisées les expériences suivantes.

2. PROTOCOLE A : Etude de l'efficacité antifongique du shampooing Allermyl® sur des *Malassezia pachydermatis in vitro*.

Lors de cette étude, nous avons essayé de montrer l'activité antifongique de la Piroctone olamine, en solution dans un shampooing (Allermyl®). Pour évaluer le rôle des excipients, nous avons utilisé un shampooing contenant une base lavante neutre du même laboratoire (Virbac) : le shampooing physiologique aux céramides A2® (tableau 2).

| NOMS DEPOSES | COMPOSITION |
|---|---|
| ALLERMYL® | Micro-émulsion moussante : - base lavante douce - mono et oligo-saccharides - vitamine E - acide linoléique (oméga 6) - PIROCTONE OLAMINE |
| SHAMPOOING PHYSIOLOGIQUE AUX CERAMIDES A2® | - bases lavantes douces - agents nutritifs et restructurants de la peau et du pelage : céramides A2 et AG essentiels - complexe aldéhydique anti-odeurs breveté |

Tableau 2 : Comparaison d'Allermyl® et du shampooing témoin (35).

L'expérience se déroule en plusieurs temps à des moments de croissance différents pour les levures ou les colonies, pour évaluer l'effet préventif et curatif du principe actif :

- Effet curatif : répartition du shampooing testé sur des colonies déjà présentes
- Effet préventif : répartition du shampooing sur la boîte de Pétri puis ensemencement de *Malassezia*.

Les deux shampooings, dans les deux expériences (effet préventif et effet curatif), sont testés en même temps, en parallèle.

2.1 Matériels et méthodes

a. Détermination des quantités de shampooing à appliquer sur la surface d'une boîte de Pétri

Les shampooings font partie des cosmétiques pour lesquels aucun dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) n'est requis. Pour la plupart, la composition en pourcentage n'est pas disponible sur l'étiquette ou dans le Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires (DMV) (35). Nous ne connaissons pas la quantité de Piroctone olamine exacte présente dans un flacon d'Allermyl®, ni la quantité de shampooing à appliquer sur l'animal en fonction du poids. Seuls les shampooings antiparasitaires utilisant des substances dites médicamenteuses ont pour obligation de définir une dose thérapeutique. Dans le DMV, le Scalibor® (shampooing antiparasitaire à base de deltaméthrine) est l'unique shampooing qui indique une quantité de shampooing à répartir sur le chien. On trouve 25 ml pour 9 à 15 kg de chien.

On extrapole la donnée du Scalibor® à l'Allermyl® et on en conclut qu'il faut employer 25 ml de shampooing pour un chien de 9 kg à 15 kg. On choisit 25 ml pour un animal de 9 kg afin de placer le shampooing dans les meilleures conditions d'utilisation et d'efficacité. Or un chien de 9 kg a une surface cutanée de 0,43 m² (89), ce qui donne 58,139 ml de shampooing par m².

Sachant qu'une boîte de Pétri a un diamètre de 8,6 cm, sa surface est de 58 cm² soit $5,8 \cdot 10^{-3}$ m².

→ Il faut donc 0,337 ml de shampooing réparti sur la surface d'une boîte de Pétri pour que l'on ait une concentration de shampooing comparable à celle présente sur la peau d'un chien. On arrondira cette quantité à 0,35 ml.

Le shampooing contenant le principe actif doit être étalé sur la gélose. Or 0,35 ml n'est pas une quantité suffisante pour que la répartition soit homogène sur l'ensemble de la boîte. C'est pourquoi elle est diluée dans de l'eau du robinet (pour rester proche des conditions d'utilisation, mais cela est discutable puisque la composition de l'eau n'est pas standardisée).

→ Nous avons déterminé que 0,7 ml était la quantité optimale de liquide à répartir sur la gélose, de façon uniforme avec les moyens disponibles. Ce volume permet de recouvrir sans trop de difficultés la gélose, évite de noyer les levures et ne les empêche pas d'accéder à leur milieu nutritif.

Cette étude a pour but de définir la quantité suffisante de piroctone olamine, nécessaire au contrôle des *Malassezia*. Le shampooing (Allermyl® ou Shampooing physiologique aux céramides A2 ®) est dilué dans l'eau du robinet selon le protocole suivant. Nous évaluerons ensuite quelle dilution est la plus efficace. Soit x la quantité nécessaire à appliquer sur la boîte de Pétri pour avoir une concentration surfacique comparable à celle du chien (ici 0,35 ml); nous testons les dilutions suivantes :

2x, soit 0,7 ml de shampooing pur à répartir sur une boîte de Pétri.

x, soit 0,35 ml de shampooing et 0,35 ml d'eau du robinet.

- x/2 soit 0,35 ml du mélange précédent et 0,35 ml d'eau.
- x/4 soit 0,35 ml du mélange précédent et 0,35 ml d'eau.
- x/8 soit 0,35 ml du mélange précédent et 0,35 ml d'eau.
- x/16 soit 0,35 ml du mélange précédent et 0,35 ml d'eau.
- x/32 soit 0,35 ml du mélange précédent et 0,35 ml d'eau.

Pour limiter les incertitudes lors de la mesure des différents volumes de liquide, nous avons choisi de réaliser de plus grands volumes, plutôt que de préparer les 0,7 ml nécessaires pour chaque boîte : 35 ml pour la dilution x par exemple, permettant de traiter 50 boîtes de manière identique.

On mélange 35 ml de shampoing pour x, on rajoute 35 ml d'eau. Puis pour réaliser x/2, on prélève 35 ml du mélange auxquels on rajoute 35 ml d'eau etc....

b. Application sur les géloses

- Effet préventif antifongique

La quantité de liquide est répartie de façon homogène sur l'ensemble de la gélose puis séchée pendant 7 minutes à l'étuve, couvercle retiré, gélose sur la grille de l'étuve. Les levures sont ensuite réparties à la surface grâce à une anse de platine selon la technique de l'épuisement.

Entre deuxensemencements de boîte, l'anse de platine est stérilisée à la flamme pour détruire la Piroctone olamine qui pourrait rester sur l'anse et fausser les résultats.

Les boîtes ainsiensemencées sont placées à l'étuve entre 36.5°C et 37°C pendant 3 jours (J0). Les résultats sont lus au bout de 3 jours (J+3). A J+7, on vérifie les résultats avant de jeter les boîtes. Au total, une boîte de l'expérience α est conservée 7 jours.

- Effet curatif antifongique

Dans cette expérience, on répartit le liquide sur des colonies de 3 jours d'âge. Pour cela, à J-3, onensemence les *Malassezia* sur les boîtes de Pétri. A J0, le liquide (shampoing selon les dilutions, ou eau) est répandu sur les colonies. La lecture des résultats s'effectue au bout de 3 jours (J+3). A J+7, un contrôle des résultats est effectué puis les boîtes peuvent être retirées de l'étuve.

- Chronologie de l'essai

Comme nous venons de le voir, l'étude porte sur 7 dilutions de chaque shampoing (Allermyl® et shampoing physiologique Virbac®) et ce, dans le même temps. On teste chaque dilution sur 5 boîtes différentes, pour pouvoir interpréter les résultats, ce qui nous conduit à 5 séries de tests.

Ainsi, lors de la série 1, on pourra comparer les résultats obtenus entre chaque shampoing mais aussi entre chaque dilution. La première série sera réalisée dans un premier temps. Puis les séries 2 et 3 seront menées le même jour, ainsi que les séries 4 et 5. Cela nous permet de comparer aussi deux séries entre elles.

2.2 Résultats du protocole A

Aux vues des premiers résultats, nous nous sommes arrêtés après les deux premières séries. En effet, ces résultats révèlent que le protocole n'est pas adapté à l'objectif de l'étude.

Les résultats obtenus sont rapportés dans un tableau. Les boîtes ont été réparties dans trois rubriques :

- Croissance évidente : ↑
- Croissance intermédiaire : ≈
- Pas de croissance : ≡

a. Résultats de l'étude de l'effet préventif antifongique de la Piroctone olamine

Pour cette expérience, une seule série a été réalisée avant l'annulation de ce protocole, pour la raison que nous avons évoquée précédemment. Rappelons que le liquide a été réparti sur la gélose et que les levures ont étéensemencées juste après.

| | ALLERMYL | SHAMPOOING PHYSIOLOGIQUE |
|-----------|----------|--------------------------|
| SERIE | 1 | 1 |
| DILUTIONS | | |
| 2x | ≡ | ≡ |
| x | ≡ | ≡ |
| x/2 | ≡ | ≡ |
| x/4 | ≡ | ≡ |
| x/8 | ≡ | ≡ |
| x/16 | ≡ | ≡ |
| x/32 | ≈ | ≡ |
| eau | ↑ | ↑ |
| rien | ↑ | ↑ |

Croissance évidente : ↑ ; Croissance intermédiaire : ≈ ; Pas de croissance : ≡

Tableau 3 : Résultats de l'étude de l'effet préventif de la Piroctone olamine sur les levures (protocole A)

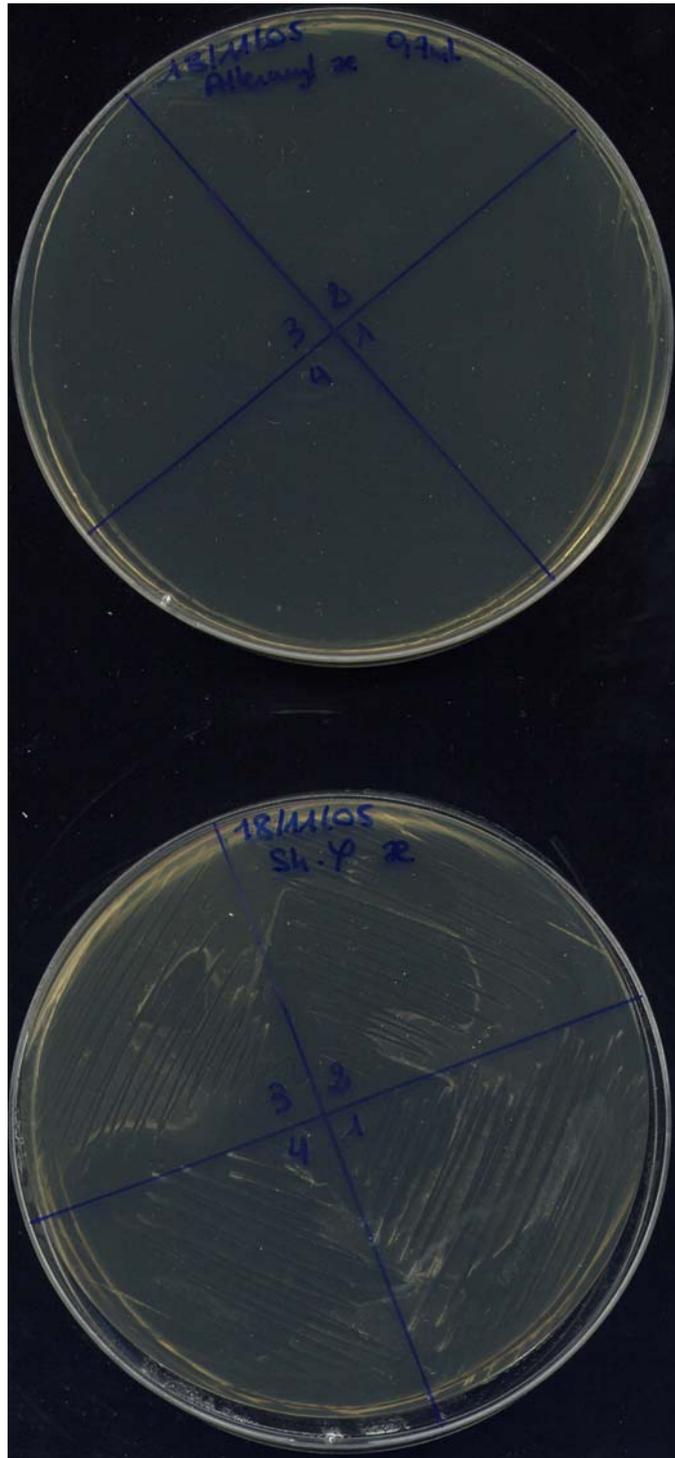


Figure 6 : Concentration x : pas de croissance fongique. Haut : Allermyl®; Bas : Shampooing physiologique.

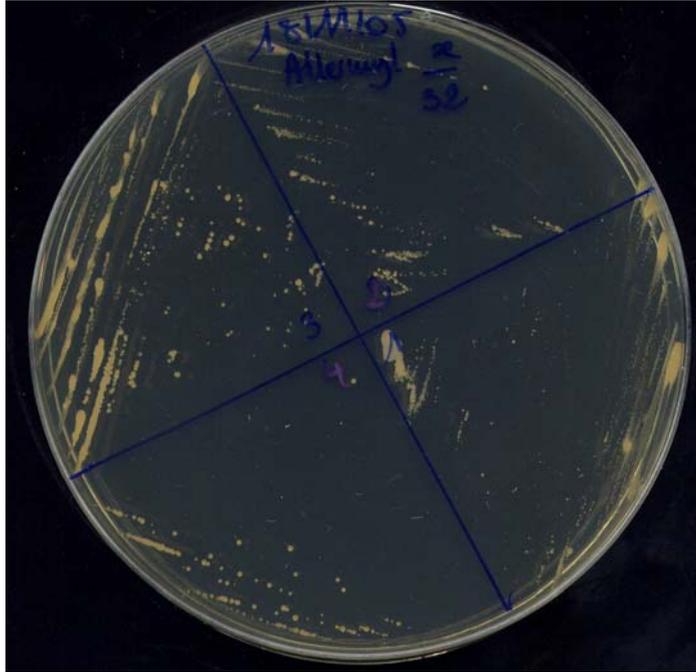


Figure 7 :
Croissance avec une dilution d'Allermyl® de x/32.

C'est à partir de la dilution x/32 du shampooing Allermyl® que l'on a un début de croissance (faible). Toutefois la croissance est moins importante que sur les boîtes témoins. Les autres boîtes ayant reçu des dilutions de shampooing ne montrent pas de croissance, y compris celles avec du shampooing physiologique Virbac, qui lui ne contient pas de Piroctone olamine.

b. Résultats de l'effet curatif antifongique sur des colonies âgées de 3 jours

| SERIE DILUTIONS | ALLERMYL | | | SHAMPOOING PHYSIOLOGIQUE | | |
|--------------------|----------|---|---|--------------------------|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 2x | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ |
| x | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ |
| x/2 | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ |
| x/4 | ≈ | ≡ | ≈ | ≡ | ≡ | ≡ |
| x/8 | ↑ | ≈ | ≈ | ≡ | ≡ | ≡ |
| x/16 | ↑ | ≈ | ≈ | ≡ | ≡ | ≡ |
| x/32 | ↑ | ↑ | ↑ | ≈ | ≈ | ≈ |
| eau | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| rien | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |

Croissance évidente : ↑ ; Croissance intermédiaire : ≈ ; Pas de croissance : ≡

Tableau 4 : Résultats de l'étude de l'effet curatif de la Piroctone olamine sur les levures (protocole A).

Aucune colonie ne croît en présence du shampooing physiologique dans les gammes de concentrations élevées. Ce n'est qu'à la dilution x/32 que certaines colonies peuvent pousser sur les géloses ayant été enduites de shampooing physiologique. Pour Allermyl®, des colonies commencent à se développer à partir de x/4.

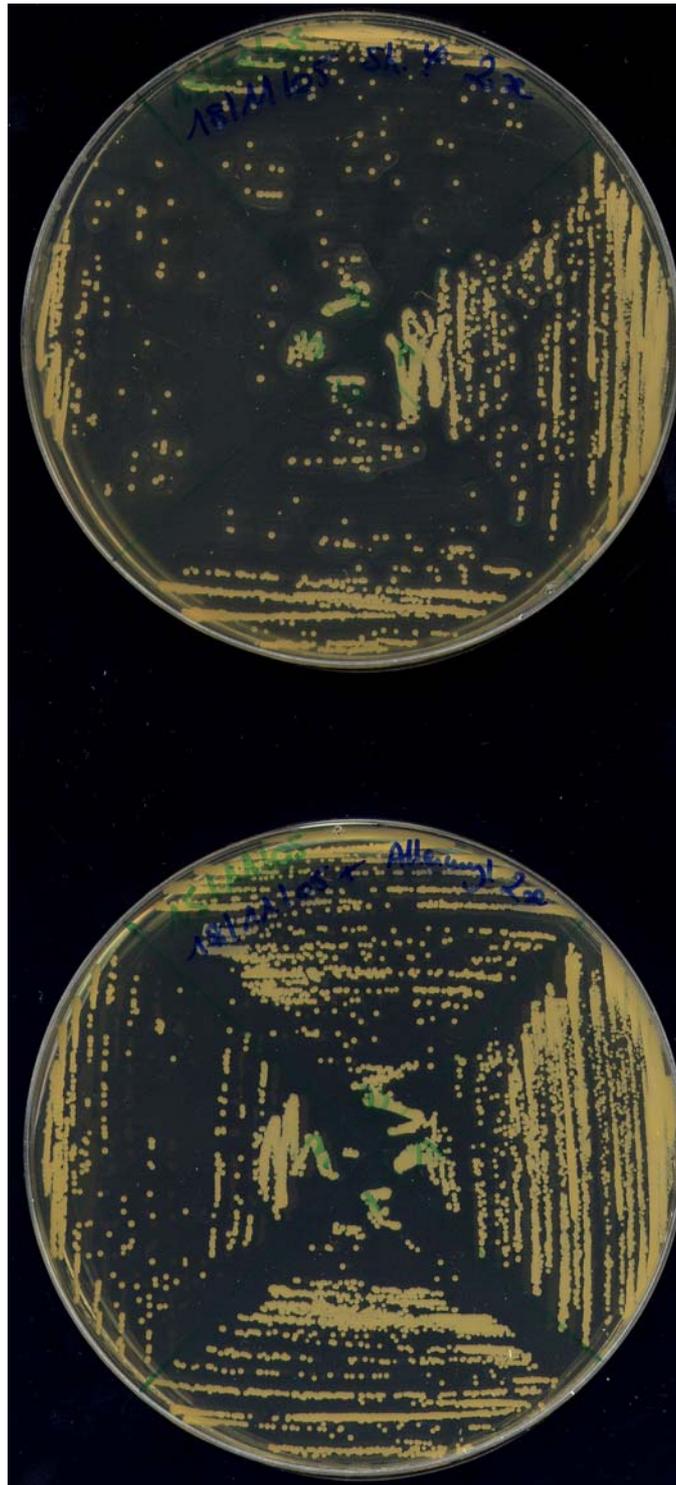


Figure 8 :
Concentration 2x : pas d'augmentation de la
taille des colonies. Haut : Shampooing
physiologique; Bas : Allermyl®.



Figure 9 : Témoin.

c. Conclusion du protocole A

Les deux shampoings, Allermyl® et le shampooing physiologique réputé sans antifongique, montrent une inhibition du développement des levures. Le shampooing physiologique, censé ne pas avoir de propriété antifongique, aurait même une meilleure efficacité que Allermyl®, et ce pratiquement à toutes les dilutions (de 2 à x/32). Il faut noter que le shampooing physiologique est plus épais qu'Allermyl®. L'hypothèse avancée est qu'en étuve le liquide contenant l'excipient ne s'évapore pas, contrairement à l'eau et qu'il formerait un film qui empêcherait les levures de respirer. D'ailleurs, les témoins n'ayant reçu que de l'eau ont montré une croissance normale des colonies.

Ces résultats nous ont permis de conclure que le protocole n'est pas adapté pour tester l'efficacité antifongique de la Piroctone olamine.

Nous avons donc mis au point un protocole (B) qui permet aux levures de respirer correctement sur les géloses.

3. PROTOCOLE B : Application du shampoing sur les *Malassezia* puis élimination du shampoing résiduel

Les premières étapes sont identiques à celles du protocole A, en ce qui concerne la culture des levures du genre *Malassezia*. Les différences résident dans la mise en contact du principe actif contenu dans le shampoing avec les levures. En effet, le temps de contact avec les levures est limité et le shampoing est éliminé pour éviter l'étouffement des levures par un film résiduel à la surface de la gélose. La démarche expérimentale est la suivante :

1. Mise en suspension des *Malassezia* dans 5 ml de liquide physiologique

2. Application du shampoing

Le shampoing à tester est rajouté dans le tube. On fait mousser la solution pendant 5 minutes.

3. Centrifugation pour éliminer le shampoing

Ainsi on récupère le culot, composé de levures, puis on enlève le surnageant composé d'eau et de shampoing (et de quelques levures).

4. Rinçage

On remet en suspension les *Malassezia* dans de l'eau distillée pour les rincer et limiter la viscosité résiduelle du shampoing. Puis on recommence les opérations de centrifugation et de remise en suspension pour éliminer le shampoing.

5. Après le dernier lavage, on récupère le culot que l'on met en suspension puis ensemencement d'un volume défini de la suspension fongique sur une boîte de Pétri.

6. Stockage des boites pendant 3 jours au terme desquels on évalue la croissance des colonies de *Malassezia*.

Cette méthode semblait originale, mais elle s'est révélée difficile à mettre en œuvre. L'idée était de comparer les cultures (étape 6) à la boîte témoin dont on connaît le nombre de levures pour déterminer le nombre de *Malassezia* ayant résisté à l'action antifongique du shampoing Allermyl®.

Il ne nous a pas été possible d'obtenir une suspension homogène de levures, lors de l'étape 5. Malgré toutes les précautions prises, les levures forment des agrégats (ou poissons dans le jargon) ce qui ne permet pas de pipeter, à volume égal, le même nombre de *Malassezia*. L'interprétation des résultats et la comparaison entre boîtes traitées sont alors impossibles puisque mêmes les boîtes témoins ne sont pas comparables entre elles.

Nous avons abandonné cette méthode pour se consacrer à l'élaboration d'un nouveau protocole, expliqué ci-après.

4. PROTOCOLE C : Etude de l'efficacité antifongique de la piroctone olamine en solution sur *Malassezia pachydermatis* en boîte de Pétri.

Ce protocole a pu être envisagé quand nous avons obtenu la Piroctone olamine pure sous forme de poudre. Une fois mise en solution, elle est répartie sur une boîte de Pétri contenant du milieu de Sabouraud - Chloramphénicol. Deux cas de figures se présentent, comme lors du protocole A :

- Etude de l'effet préventif : onensemence les levures après l'application de la solution sur la gélose
- Etude de l'effet curatif : on applique le produit directement sur les colonies de 3 jours d'âge, qui sont situées à la surface de la gélose.

4.1 Matériels et méthodes

La démarche expérimentale est en grande partie similaire à celle du protocole A. L'obtention des *Malassezia* et la réalisation des boîtes sont identiques.

a. Détermination des quantités de Piroctone olamine à appliquer sur les géloses

Selon la galénique des produits trouvés dans le commerce, la concentration en Piroctone olamine varie entre 1% pour les shampoings et 0,5% pour les solutions non rincées. Lors de ces expériences, la solution en contact avec les levures n'est pas éliminée. On choisit donc 0,5% comme concentration de base, comme pour une lotion qu'on ne rincerait pas. Nous étudions l'effet antifongique de la Piroctone olamine sur les *Malassezia* à partir de cette concentration de départ, puis à des concentrations doubles ou moitié.

Du fait de l'évaporation des liquides en étuve, on raisonnera en quantité de piroctone olamine par boîte puis par m² et non plus par concentration.

- Préparation d'une solution à 1% de Piroctone olamine

20 mg de principe actif sont pesés, puis sont introduits dans un tube. Une quantité moindre serait nécessaire pour notre expérience mais en deçà de 10 mg, les imprécisions liées à la pesée sont trop importantes. Ces 20 mg sont ensuite mélangés à un solvant (2 ml) dont nous allons expliquer la composition.

Rappelons que la Piroctone olamine est un composé très peu soluble dans l'eau (seulement 0,05%) mais qu'elle se dissout convenablement dans les mélanges eau-alcool, en particulier lorsqu'on utilise du 1,2-propylène glycol (23). Dans cette étude on utilise du monopropylène glycol et de l'eau distillée.

Les 20 mg de principe actif, sous forme de poudre, sont donc ajoutés à 1 ml d'eau distillée et à 1 ml de propylène glycol. Ainsi on obtient une concentration de 1%.

Le mélange est passé sur un agitateur (vortex) afin d'obtenir une meilleure homogénéisation de la solution eau-alcool ainsi qu'une meilleure dissolution du principe actif. L'utilisation de l'agitateur électrique ne détériore pas les levures (73).

- **Effet préventif**

Plusieurs concentrations sont testées, afin d'encadrer la concentration supposée efficace (c'est-à-dire 1% ; 0,5% et 0,25%). Pour ce faire, nous avons mélangé 1 ml de la solution à 1% avec 0,5 ml d'eau et 0,5 ml de propylène glycol afin d'obtenir la concentration de 0,5%. On agit de même pour arriver à la concentration de 0,25 %.

Sachant que l'on couvre une boîte avec 100 µl de solution, l'effet préventif de la Piroctone olamine sur la croissance des *Malassezia* est évalué en fonction de 1 mg/boîte, 0,5 mg/boîte et 0,25 mg/boîte ; soit 172 mg/m², 86 mg/m² et 43 mg/m² respectivement.

- **Effet curatif**

On teste l'effet curatif de la Piroctone olamine avec des quantités de 2 mg/boîte, 1 mg/boîte, 0,5 mg/boîte et 0,25 mg/boîte, soit 344 mg/m², 172 mg/m², 86 mg/m² et 43 mg/m² respectivement.

b. Protocole expérimental

- **Effet préventif**

A partir de la solution de piroctone olamine à tester, on prélève 100 µl que l'on dépose sur la gélose à l'aide d'une pipette. Cette quantité a été déterminée suite à plusieurs essais et a été définie comme optimale, pour couvrir la gélose avec l'utilisation de billes stériles. Ces billes permettent d'étaler correctement de très petits volumes de liquide sur la gélose. Ainsi le temps de séchage en étuve n'est plus nécessaire et les *Malassezia* peuvent êtreensemencées immédiatement sur le milieu de culture. De plus, cela permet aux levures d'avoir un meilleur accès au milieu nutritif puisqu'on supprime une couche.

Ensuite à l'aide d'une anse de plastique (ou öse), on répartit les *Malassezia* à la surface de la gélose selon la technique de l'épuisement. Cette manipulation est réalisée au jour J0.

A J3, on contrôle la croissance des levures. Soit la croissance est inhibée, soit la croissance n'est pas gênée par la présence de la Piroctone olamine. Les boîtes seront scannées afin de pouvoir mieux les comparer dans le temps.

- **Effet curatif**

L'utilisation des billes n'est pas possible sur des colonies car elles seraient étalées, ce qui ne permettrait pas d'évaluer leur croissance. Une plus grande quantité de liquide est donc nécessaire puisqu'aucun instrument n'est utilisé pour le répartir à la surface de la boîte. Il faut alors incliner cette dernière pour que le principe actif soit au contact de toutes les colonies. Nous avons déposé 500 µl par boîte, en regrettant de ne pouvoir utiliser la même quantité que dans l'expérience précédente. L'augmentation du volume est compensée par une diminution dans les mêmes proportions de la concentration, ce qui permet d'avoir des quantités de principe actif comparables.

Dans les deux expériences, un témoin est utilisé pour contrôler l'innocuité du solvant (eau-propylène glycol) sur les *Malassezia*. Elles doivent croître malgré l'adjonction de cette solution sur le milieu de culture.

Une boîte présentant des colonies de 3 jours d'âge sera conservée, sans ajout de principe actif ou solvant. Ce 2^{ème} témoin servira à vérifier la vitalité des levures et permet aussi de comparer leur croissance avec et sans solvant.

4.2 Résultats du protocole C

L'évaluation de la croissance est également réalisée par quartier de boîte. Puisque nous avons utilisé la technique d'épuisement lors de l'ensemencement des levures, il paraît logique que le premier quartier (Q₁) soit plus riche en *Malassezia* que le dernier (Q₄).

a. Résultats de l'étude de l'effet préventif de la Piroctone olamine

| PIROCTONE OLAMINE BOITE (n°) | 172 mg/m ² | | | | 86 mg/m ² | | | | 43 mg/m ² | | | |
|---------------------------------|-----------------------|----|----|----|----------------------|----|----|----|----------------------|----|----|----|
| | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 |
| 1 | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ↑ | ≡ | ≡ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| 2 | ↑ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| 3 | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| 4 | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ≡ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| 5 | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ | ↑ | ≡ | ≡ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |

Quartiers de la boîte : Q1, Q2, Q3, Q4. Evolution des levures : Croissance évidente : ↑ ; Croissance intermédiaire : ≈ ; Pas de croissance : ≡

Tableau 5 : Résultats de l'étude de l'effet préventif de la Piroctone olamine sur les levures (Protocole C).

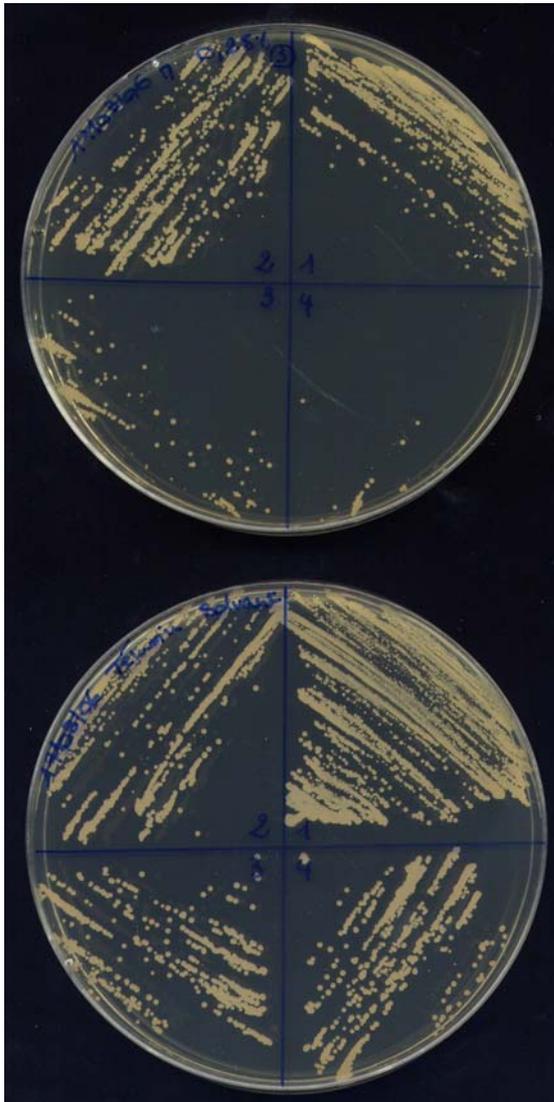


Figure 10 :

Haut : Boîte traitée avec 43 mg/m² de Piroctone olamine; Bas : témoin.

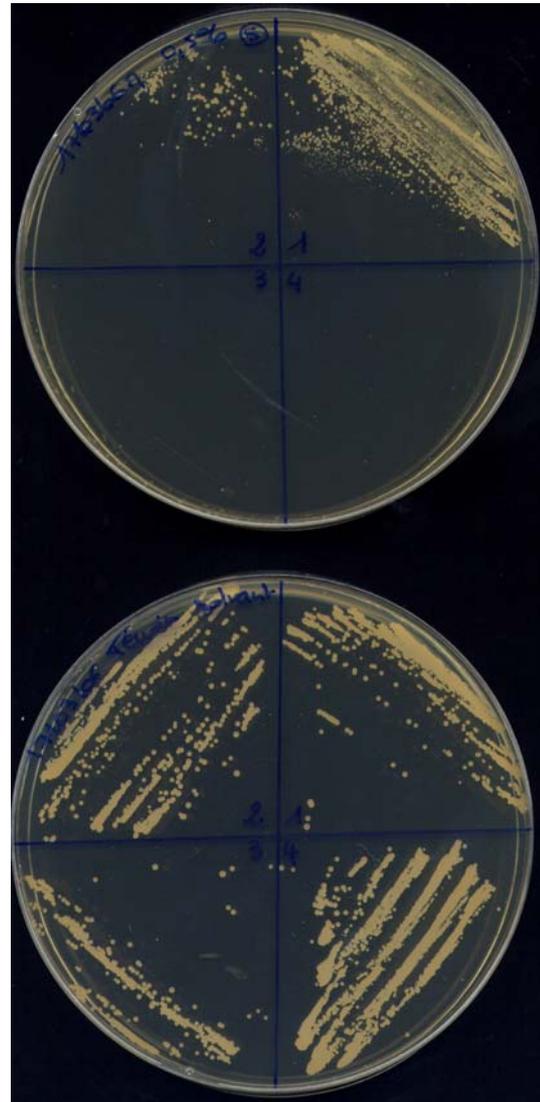


Figure 11 :

Haut : Boîte traitée avec 86 mg/m² de Piroctone olamine ; Bas : témoin.

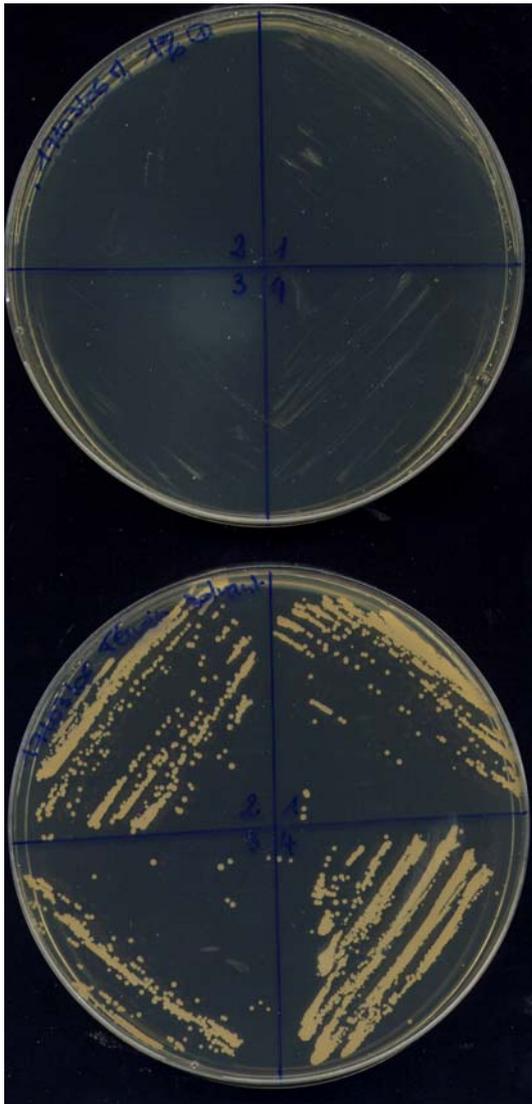


Figure 12 :

Haut : boîte traitée avec 172
mg/m² de Piroctone olamine
Bas : témoin.

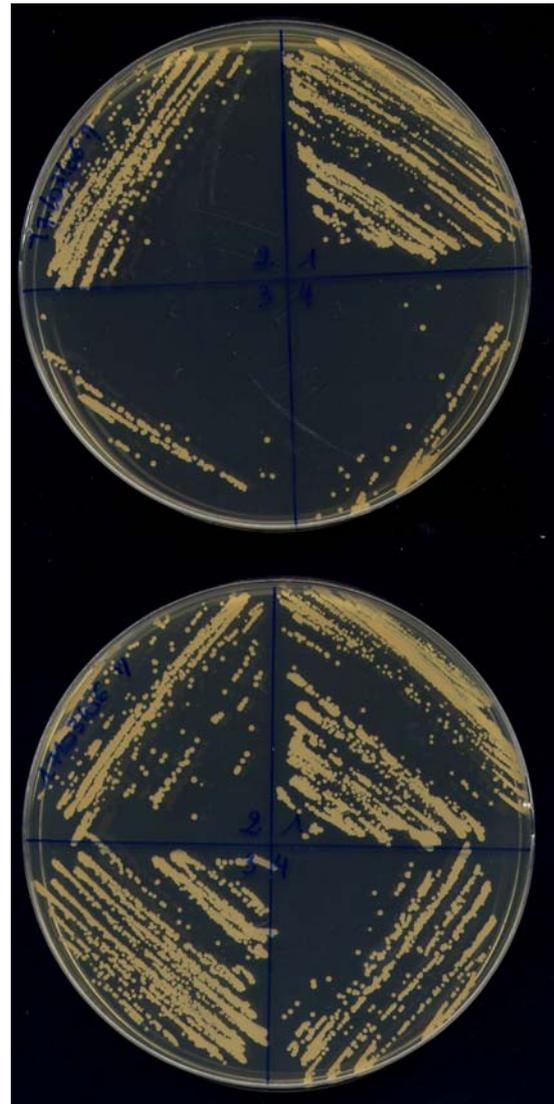


Figure 13 : Témoins.

Haut : Propylène glycol- eau
Bas : levures uniquement

Avec 43 mg/m² de Piroctone olamine, les colonies se développent sans problème. Ces boîtes ont la même allure que celle des témoins.
Avec 86 mg/m², l'efficacité est perceptible essentiellement au niveau des zones les moinsensemencées. On note que les colonies poussent majoritairement dans le premier quartierensemencé (Q₁). Dans 2/5 des cas, le quartier 2 (Q₂) montre aussi une croissance. La technique d'épuisement est censée répartir les levures en quantité décroissante du premier quartier au quatrième. On constate que ce sont les

quartiers riches en levures qui montrent une croissance fongique en présence de Piroctone olamine. Sur la boîte n°4, c'est le troisième quartier (Q₃) qui montre une croissance fongique.

Avec 172 mg/m², seule la boîte n°2 (et uniquement le premier quartier Q₁) présente des colonies. Sur les autres boîtes, aucune colonie n'est relevée.

b. Résultats de l'étude de l'effet curatif de la Piroctone olamine

| PIROCTONE OLAMINE BOITE (n°) | 344 mg/m ² | 172 mg/m ² | 86 mg/m ² | 43 mg/m ² |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ |
| 2 | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ |
| 3 | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ |
| 4 | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ |
| 5 | ≡ | ≡ | ≡ | ↑ |

Croissance évidente : ↑ ; Croissance intermédiaire : ≈ ; Pas de croissance : ≡

Tableau 6 : Résultats de l'étude de l'effet curatif de la Piroctone olamine sur les levures (protocole C)

En étudiant le tableau 6, on constate une inhibition de la croissance des colonies à partir de 86 mg/m². Quand on examine les photos ci –après (figures 14 à 18), on constate que l'on a un effet antifongique qui est concentration (en mg/m²) dépendant.

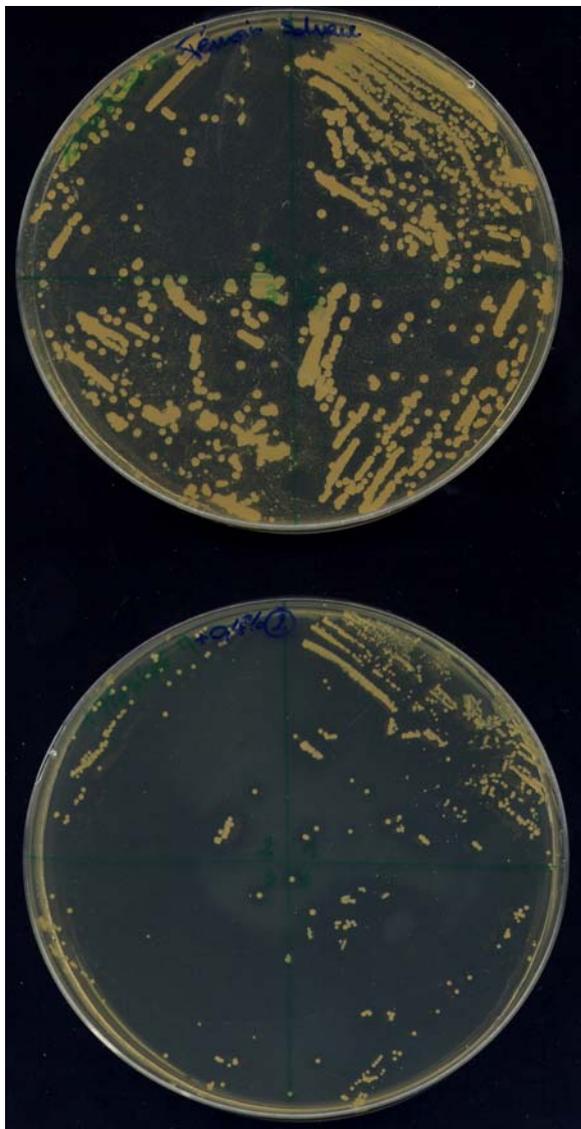


Figure 14 :
Haut : Témoïn
Bas : 344 mg/m² de Piroctone olamine

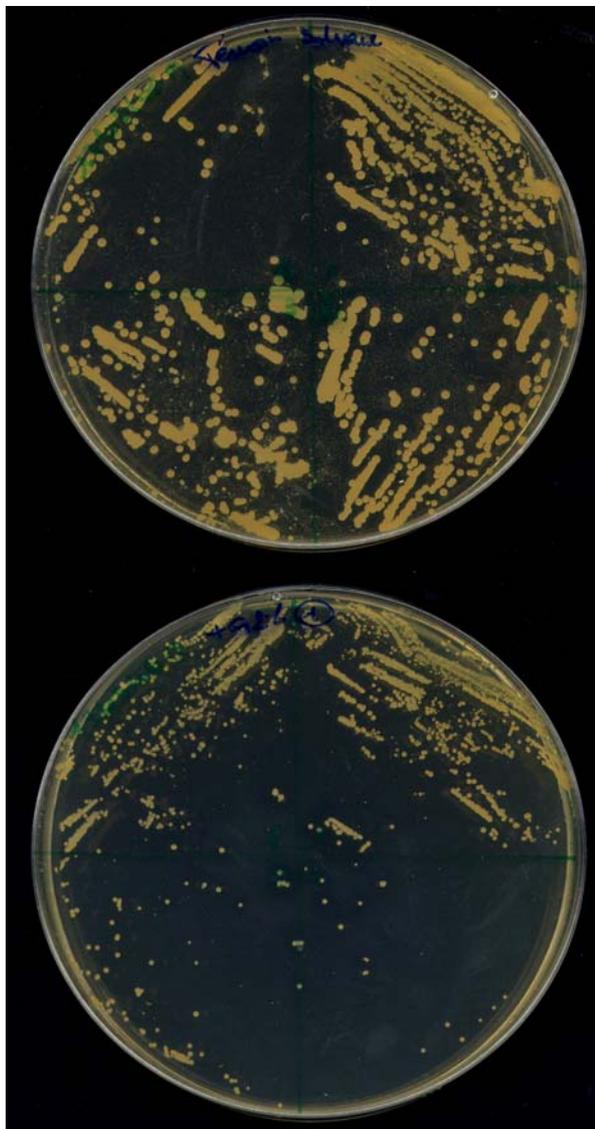


Figure 15 :
Haut : Témoïn
Bas : 172 mg/m² de Piroctone olamine

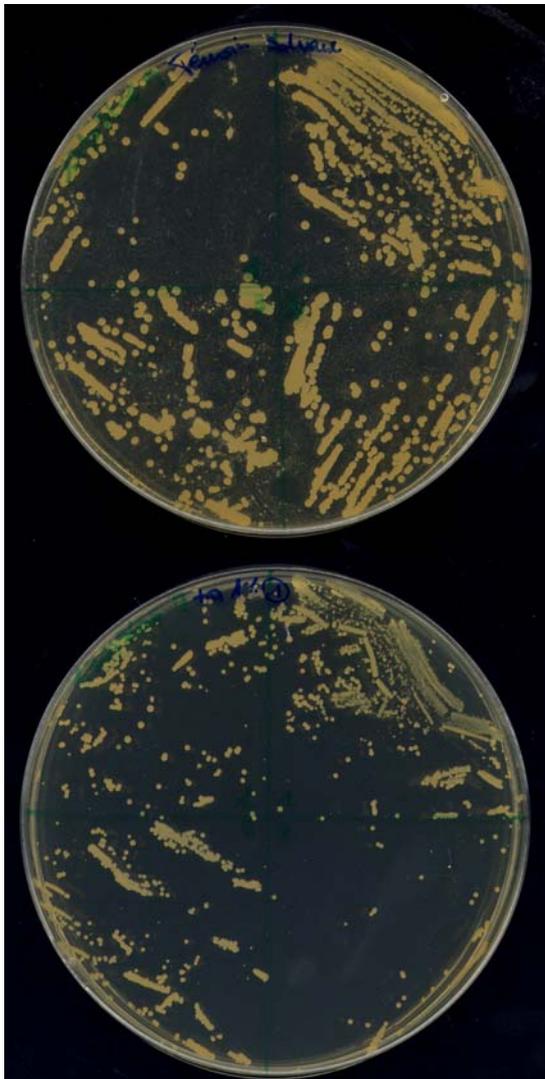


Figure 16 :
Haut : Témoin
Bas : 86 mg/m² de Piroctone olamine



Figure 17 :
Haut : Témoin
Bas : 43 mg/m² de Piroctone olamine

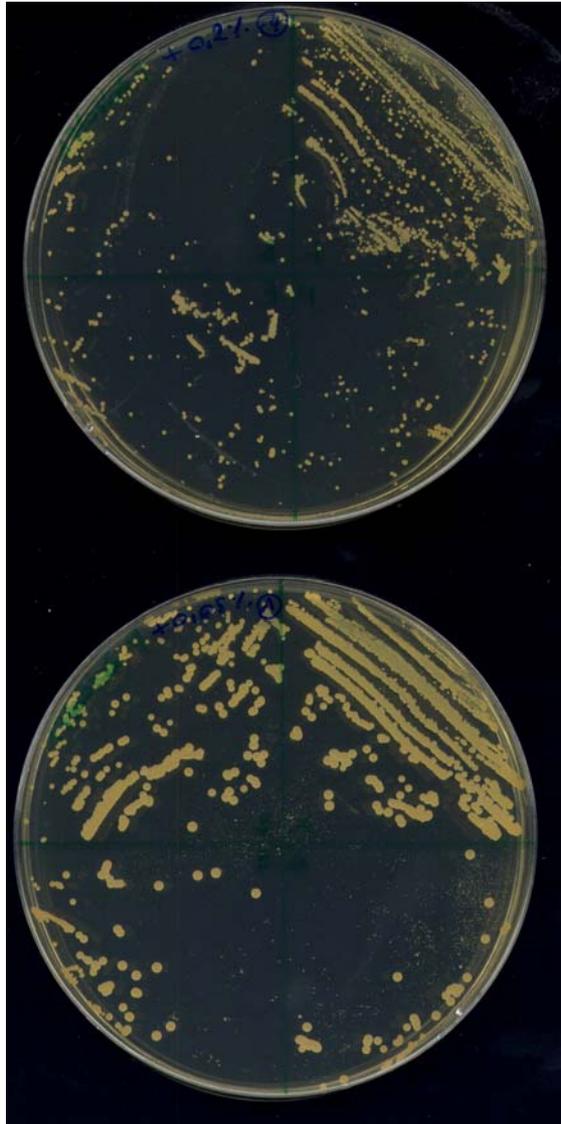


Figure 18 :
Haut : 172 mg/m² et Bas : 43 mg/m²
de Piroctone olamine

IV. DISCUSSION

1. Critique du protocole C

1.1 Choix de la souche de *Malassezia pachydermatis*

Nous avons testé des *Malassezia pachydermatis* prélevées uniquement sur un seul chien, afin de pouvoir comparer les boîtes entre elles. Si un même chien peut-être colonisé par plusieurs souches de *Malassezia pachydermatis* (56), la plupart du temps, une seule est représentée. Ainsi, on suppose que cette étude porte sur une seule souche de *Malassezia pachydermatis*, qui peut ne pas être représentative de l'espèce. Il serait intéressant de refaire l'expérience, en parallèle, avec des prélèvements obtenus de chiens différents et même de chats.

1.2 Nombre de boîtes utilisées par concentration

Nous avons utilisé 5 boîtes par concentration. Les résultats diffèrent peu d'une boîte à l'autre, ce qui permet de conclure que les résultats sont fiables.

1.3 Réalisation des solutions à tester

Pour obtenir la solution à 1% de Piroctone olamine du protocole C, 20 mg de principe actif sont mélangés à 1 ml d'eau distillée et 1 ml de propylène glycol. Pour limiter les incertitudes liées à la mesure des volumes, nous aurions du préparer 20 ml de solution plutôt que 2 ml, même si l'on ne prélève ensuite que 100 µl. Il en va de même pour les dilutions suivantes.

2. Discussion des résultats des protocoles A et C

2.1 Protocole A

Lors de l'étude des effets préventif et curatif, le shampooing témoin inhibe la croissance fongique avec des concentrations moindres que celles d'Allermyl®. Or le shampooing physiologique ne montre *in vivo* aucune activité antifongique ; les excipients ne seraient donc pas la cause de l'inhibition de la pousse. La seule différence entre l'utilisation *in vivo* et *in vitro*, pour le shampooing témoin, est la grande dilution du shampooing lors du bain de l'animal et son élimination du poil lors du rinçage. Sur la boîte de Pétri, le shampooing est appliqué de manière très peu diluée et reste sur les colonies ou sur la gélose.

On peut donc en conclure que ce serait la viscosité du shampooing qui apporterait, dans ces conditions expérimentales, cette action apparemment antifongique. Les *Malassezia*, qui sont micro-aérophiles, seraient étouffées ou seraient privées de l'accès à leur milieu nutritif avec une barrière étanche entre elles et la gélose. La pellicule de shampooing ne serait pas perméable aux gaz.

Allermyl®, de son côté, montrerait des résultats très satisfaisants si on ne comparait pas ses résultats à celui du shampooing témoin. Même si Allermyl® est moins visqueux que le shampooing témoin, on ne peut pas imputer son activité antifongique à la seule présence de la Piroctone olamine ; on doit aussi prendre en compte la présence d'un film résiduel sur les levures. Ainsi on ne peut conclure : Allermyl® dans ces conditions expérimentales est efficace mais la Piroctone olamine est elle à l'origine de cette efficacité, ou la doit-on aux conditions particulières d'utilisation lors de ce protocole ?

Une méthode pour éviter l'étouffement des colonies a été envisagée. On pourrait laisser agir le shampooing sur les levures pendant un temps donné, puis rincer la gélose avec de l'eau pour éliminer la viscosité du shampooing. Cela s'est avéré irréalisable à cause du caractère mobile des colonies de trois jours d'âge. Il faudrait en effet de nombreux rinçages pour éliminer le shampooing de la boîte, ce qui modifie considérablement la répartition et la forme des colonies sur le milieu de culture et rend les résultats difficilement interprétables.

2.2 Protocole C

- **Etude de l'effet préventif antifongique de la Piroctone olamine sur les *Malassezia***

Tout d'abord, après une première analyse des résultats, on peut conclure que la Piroctone olamine est efficace, puisque plusieurs boîtes restent vierges de colonies, alors que les levures des boîtes témoins se développent aisément.

Pour 172 mg/m² de principe actif, on constate que la croissance des levures n'a pas été possible dans 80% des cas. Une seule boîte contient des colonies, et uniquement sur le premier quartier (Q₁). Les résultats sont répétables à 80% et permettent de conclure qu'une quantité de 172 mg/m² de Piroctone olamine empêche la croissance des *Malassezia*.

Pour 86 mg/m², l'interprétation est moins évidente. Dans 80% des cas, la Piroctone olamine est efficace sur les quartiers 3 et 4. On peut donc dire qu'elle a une activité antifongique dans ces conditions (on part du principe que ces quartiers, malgré la technique d'épuisement, contenaient des levures mais qu'elles n'ont pas pu se développer). Avec 43 mg/m², la croissance sous forme de colonies est systématique, pour les cinq boîtes. La Piroctone olamine est donc efficace au moins à partir de 86 mg/m². Avec le double, l'activité antifongique est supérieure sur de plus grandes populations de levures, mais a ses limites.

La quantité de 172 mg/m² soulève des questions pour le quartier 1, et celle de 86 mg/m² pour les quartiers 1 et 2. Les quartiers 1 et 2 sont les plus riches en éléments fongiques. Pourquoi la Piroctone olamine se montre-t-elle moins efficace face à une population de levures très importante ? Une première réponse est que, dans les premiers quartiers, les levures sont tellement nombreuses qu'elles ne seraient pas toutes en contact avec le principe actif, ce qui expliquerait leur survie.

Par ailleurs, il faut définir nos critères d'efficacité. On peut partir du principe que la Piroctone olamine est efficace si elle inhibe la croissance des quartiers 3 et 4. En effet, il se peut que sur un chien la quantité de levure par surface soit comparable à celle des quartiers 3 ou 4. Dans ce cas, la quantité de 86 mg/m² de Piroctone olamine est suffisante.

- **Etude de l'effet curatif antifongique de la Piroctone olamine sur les *Malassezia***

On applique le même raisonnement aux résultats de l'étude de l'effet curatif. On a ici une bonne répétabilité puisque dans 100% des cas, il n'y a pas de croissance fongique à partir de 86 mg/m² de Piroctone olamine. On peut donc en déduire que la piroctone olamine a une bonne efficacité à une concentration de 172 mg/m².

- **Conclusion**

Cette méthode semble la plus adaptée pour évaluer l'activité antifongique *in vitro* de la Piroctone olamine. Elle répond à la problématique posée, à savoir déterminer tout d'abord si la Piroctone olamine a une activité antifongique ou non sur *Malassezia pachydermatis*. Elle permet de plus d'approcher une concentration efficace de principe actif par mg/m². Il ressort également l'intérêt d'avoir les recommandations du laboratoire sur la quantité (rapportée au poids) de shampooing minimale à utiliser. Elle serait calculée en fonction des caractéristiques mécaniques du shampooing (fluidité, capacité à mousser) mais aussi des en fonction des concentrations minimales en principes actifs présentes sur la peau du chien.

3. Comparaison de nos résultats avec les publications concernant l'efficacité antifongique de la Piroctone olamine

Les travaux de Rivalland P. Et al. (99) ont cherché à mettre en évidence, *in vitro*, l'activité antifongique de deux substances : la pyrithione-zinc et la piroctone olamine, à plusieurs concentrations. Des boîtes de Pétri sontensemencées avec une solution de *Malassezia furfur*. Après ensemencement, des puits sont creusés dans la gélose et sont remplis avec les dilutions des antifongiques à tester. Ils comparent alors les diamètres d'inhibition autour des puits entre les principes actifs mais aussi entre les concentrations testées (de 0,5% à 2%). La piroctone olamine manifeste une activité antifongique plus importante que la pyrithione-zinc et dès 0,5%.

Les résultats de la première étude ne sont pas comparables avec les nôtres puisque nous avons travaillé avec des valeurs surfaciques et non en concentrations. Toutefois, les auteurs concluent que la piroctone olamine a une action antifongique sur *Malassezia furfur*.

Bourdeau P. (13) a mené une expérience pour évaluer, *in vivo*, l'activité antifongique de la Piroctone olamine en shampooing, sur *Malassezia pachydermatis*, après une seule application de produit sur la peau et dans le conduit auditif. Des cultures mycologiques sont réalisées sur des Beagles, 7 jours avant le traitement, le jour du traitement (J0), puis à J1, J2 et J4. Les prélèvements sont réalisés sur les conduits auriculaires, la face ventrale et le cou. Ils sont ensemencés sur milieu de Sabouraud modifié. La lecture est réalisée au bout de 7 jours d'incubation à 32°C. A chaque lecture, le nombre d'Unité formant Colonie (UFC) est noté. Le shampooing est appliqué sur la face ventrale du cou et les conduits auditifs sont remplis d'une dilution au 1/5 de shampooing pendant une minute, avant que les chiens ne secouent les oreilles.

Les résultats révèlent que les populations de *Malassezia* restent stables dans le groupe non traité alors qu'elles diminuent régulièrement dans le groupe traité à Piroctone olamine (au moins jusqu'au quatrième jour). La densité de population était particulièrement élevée dans les oreilles et a nettement chuté après le traitement. Ce modèle permet de démontrer l'effet antifongique durable et progressif d'un shampooing à base de piroctone olamine sur *Malassezia pachydermatis*.

Nos résultats sont donc en accord avec ces deux travaux, qui semblent être les seules à avoir étudié l'activité antifongique de la piroctone olamine sur les levures du genre *Malassezia* (et à avoir fait l'objet d'une publication). Il faut nuancer cette conclusion car les conditions expérimentales sont différents : action *in vitro* antifongique sur *Malassezia furfur* pour la première étude et expérience *in vivo* sur *Malassezia pachydermatis* pour la deuxième.

4. Perspectives

Ces résultats pourraient servir de base à l'établissement d'une lotion ou d'un shampooing en utilisant ces quantités par m². Cette posologie peut servir de base pour les essais cliniques des lotions ou des shampooings. Il resterait encore à confirmer l'efficacité *in vivo* avec ces valeurs.

Ils pourraient être également comparés aux compositions des produits à base de Piroctone olamine. Si l'on considère que l'on a un nombre de levure comparable, sur le chien et sur une boîte de Pétri, pour une même surface, on peut déduire la quantité minimale de Piroctone olamine que l'on doit déposer sur un chien pour avoir une action antifongique satisfaisante, soit 172 mg/m². Ainsi, on peut déduire la quantité minimale de lotion de piroctone olamine à appliquer sur le chien pour inhiber le développement de *Malassezia pachydermatis*, à condition de connaître la concentration de celui-ci en principe actif.

Une lotion antifongique à base de Piroctone olamine est censée renfermer 0,5% de principe actif, soit 0,5 mg dans 1 ml. 35 ml de lotion à 0,5% contiennent 172 mg de Piroctone olamine ; ce qui correspond à 35 ml/m². Or un chien de 9 kg a une surface corporelle de 0,43 m² (cf. protocole A) (89). Pour avoir une concentration égale à 172 mg de Piroctone olamine par m² de surface cutanée, il faut appliquer 15 ml de

lotion sur l'animal (on considère ici que la présence de poils n'est pas gênante pour la répartition de la lotion à la surface de la peau).

Le calcul de la concentration minimale inhibitrice aurait été intéressant et aurait pu être confronté aux données de la littérature. Cela aurait été possible dans cette expérience si on avait cultivé les levures milieu liquide (bouillon). On aurait en effet des comparaisons de concentrations en $\mu\text{g/ml}$. Dans notre étude, l'utilisation de boîtes de Pétri ne nous permet pas ce calcul.

On aurait pu également, une fois la concentration efficace déterminée, calculer le temps minimal d'exposition des levures à la piroctone olamine pour avoir une action antifongique. Cela aurait pu être utilisé pour savoir quel temps de pose utiliser pour les shampooings. Mais encore une fois, on négligerait la rémanence du principe actif *in vivo*, puisqu'on sait que la piroctone olamine se fixe bien aux kératinocytes.

L'étude de l'activité fongicide ou fongistatique de la piroctone olamine aurait pu être entreprise. Après l'étude de l'effet curatif, il aurait fallu repiquer les levures des boîtes sur de nouvelles boîtes, afin de voir si la pousse reprend ou non. Si oui, il s'agira d'un effet fongistatique. Si non, ce sera un effet fongicide. Chaque boîte ne montrant pas de croissance des colonies serait ainsi étudiée. Lors de la technique d'épuisement, la boîte est divisée en quartiers.

CONCLUSION

Les levures du genre *Malassezia* sont considérées comme faisant partie de la flore commensale de la peau. Lors de déséquilibres cutanés sous-jacents (atopie, état kérato-séborrhéique...), les levures prolifèrent et contribuent à l'aggravation des signes dermatologiques. Il est donc nécessaire lors de l'examen clinique de vérifier leur densité et si nécessaire de mettre en place un traitement antifongique local voire systémique.

La Piroctone olamine est une molécule intéressante pour ses propriétés antifongiques et sa faible toxicité. Elle est utilisée en cosmétologie humaine et vétérinaire pour son action sur les levures du genre *Malassezia*. Notre travail montre que l'efficacité de la Piroctone olamine est intéressante à une concentration surfacique de 172 mg/m² sur *Malassezia pachydermatis*.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle TANE Elisabeth, Christiane, Régine

a été admis(e) sur concours en : 2000

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 15/09/2005

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, M. FRANC, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Melle TANE Elisabeth, Christiane, Régine

intitulée :

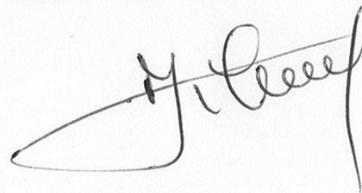
Etude in vitro de l'efficacité antifongique de la Piroctone olamine sur Malassezia pachydermatis

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Michel FRANC**

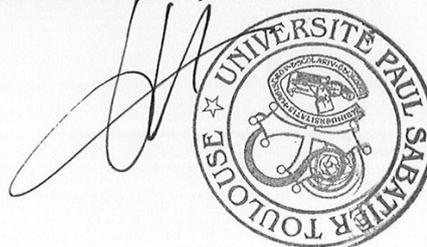
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Pierre SEGUELA**



**Vu le : 24 NOV. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



BIBLIOGRAPHIE

1. ASHBEE H.R, EVANS E.G
Immunology of diseases associated with *Malassezia* species.
Clin. Microbiol. Rev., Jan 20002, **15**, 1, 21-57
2. BAZIN S.
Dermatites à *Malassezia* chez les animaux : synthèse bibliographique.
Th. : Med. Vet. : Alfort : 1999- ALF 49, 68p.
3. BENSIGNOR E.
Dermatites à *Malassezia* chez le chien.
Action vétérinaire, 1994, **1293**, 35-36.
4. BENSIGNOR E., CARLOTTI D.-N., PIN D.
Comparaison de quatre techniques cytologiques pour la mise en évidence de *Malassezia pachydermatis* sur la peau du chien.
Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 1999, **34**, 33-41.
5. BENSIGNOR E., JANKOWSKI F., SEEWALD W.
Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of Basset Hounds.
Veterinary Dermatology, 2002, **13**, 237-241.
6. BIOMERIEUX
Fiche technique de la gélose de Sabouraud
Biomérieux sa, 69580 Marcy l'étoile
7. BLANCO J.L., GUEDEJA-MARRON J., BLANCO I., GARCIA M.E.
Optimum incubation for the isolation of yeasts from canine otitis externa.
J. Vet. Med. B., 2000, **47**, 599-605.
8. BLACK J.G, KAMAT V.B.
Percutaneous absorption of Octopirox.
Fd. Chem. Toxic., 1988, **26**, 53-58.
9. BOND R., LLOYD D.H.
Comparison of media and conditions of incubation for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin.
Res. Vet. Sci., 1996, **61**, 273-274.
10. BOND R., LLOYD D.H., PLUMMER J.M.
Evaluative of a detergent scrub technique for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin.
Res. Vet. Sci., Mars 1995, **58**, 2, 133-137.

11. BOND R., PATTERSON-KANE J.C., LLOYD D.H.
Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*.
Med. Mycol., Avril 2004, **42**, 2, 165-175.
12. BOND R., ROSE J.F., ELLIS J.W., LLOYD D.H.
Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis* associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds.
Journal of Small Animal Practice, 1995, **36**, 99-104.
13. BOURDEAU P. *et al.*
Antifungal activity of a piroctone olamine shampoo against *Malassezia* populations after a single treatment in the dog.
Proceedings 16th ESVD-ECVD Congress, Helsinki, Finland, 155 p.
14. BREIEROVA E., KOCKOVA- KRATOCHVILOVA A., SAJBIDOR J., LADZIANSKA K.
Malassezia pachydermatis : properties and storage.
Mycoses, Juillet-Aout 1991, **34**, 7-8, 349-352.
15. CAFARCHIA C., OTRANTO D.
Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions.
J. Clin. Microbiol., Oct 2004, **42**, 10, 4868-4869.
16. CAFARCHIA C., GALLO S., CAPELLI G. *et al.*
Occurrence and population size of *Malassezia spp.* in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis.
Mycopathologia, Sept 2005, **160**, 2, 143-149.
17. CAFARCHIA C., GALLO S., ROMITO D. *et al.*
Frequency, body distribution and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2005, **17**, 4, 316-322.
18. CARLOTTI D.-N., LAFFORT-DASSOT C.
Dermatite à *Malassezia* chez le chien : étude bibliographique et rétrospective de 12 cas généralisés traités par des dérivés azolés.
Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 1996, **31**, 297-307.
19. CARLOTTI D.-N.
The art of the shampoos in veterinary dermatology : treatment and prevention strategies (en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.dermavet.net/modules.php?name=section&op=viewarticle&artid=6369>.
20. CESCHIN-ROQUES C.G., HANEL H., PRUJA-BOUGARET S.M. *et al.*
Ciclopiroxolamine cream 1%: *in vitro* and *in vivo* penetration into the stratum corneum.

- Skin Pharmacol.*, 1991, **4**, 2, 95-99.
21. CHABASSE D., GUIGEN C.I., CONTET-AUDONNEAU N.
Mycologie médicale
Paris : Masson, 1999.
22. CHERMETTE R., BUSSIERAS J.
Parasitologie Vétérinaire- Mycologie.
Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort: Service de Parasitologie, 1993.
23. CLARIANT
Taking care of your customers' hair. Antidandruff active ingredient Octopirox®.
[en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
[http://surfactants.clariant.com/fun/e2wtools.nsf/vwLookupDownloads/Taking_care_of_your_customers_hair_Octopirox_2005.pdf/\\$FILE/Taking_care_of_your_customers_hair_Octopirox_2005.pdf](http://surfactants.clariant.com/fun/e2wtools.nsf/vwLookupDownloads/Taking_care_of_your_customers_hair_Octopirox_2005.pdf/$FILE/Taking_care_of_your_customers_hair_Octopirox_2005.pdf)
24. CLARIANT
Notice de l'échantillon de Piroctone olamine offert par le laboratoire Clariant.
Clariant GmbH, Division Functional Chemicals, RQA, Höschst, D562.
25. COIFFARD C., COIFFARD L., DE ROECK-HOLTZHAUER Y.
Comparaison of the thermostability of natural (sulfoprolamine and sodium usnate) and synthetic (climbazole and piroctone olamine) antidandruff agents.
Ann. Pharm. Fr., Sept. 1999, **57**, 5, 392-396.
26. COUTINHO S.D., PAULA C.R.
Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*.
Med. Mycol., Fev. 2000, **38**, 1, 73-76.
27. CRESPO M.J., ABARCA M.L., CABANES F.J.
Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats.
J. Clin. Microbiol., Juin 2000, **38**, 3, 1263-1266.
28. CRESPO J., ABARCA L., CABANES J.
Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa.
J. Clin. Microbiol., Juin 2000, **38**, 6, 2383-2385.
29. CRESPO J., ABARCA L., CABANES J.
Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp.
J. Clin. Microbiol., Oct 2000, **38**, 10, 3872-3875.
30. CRESPO M.J., ABARCA M.L., CABANES F.J.
Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa.
Med. Mycol., Avril 2002, **40**, 2, 115-121.
31. CRESPO M.J., ABARCA M.L., CABANES F.J.
Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestics ruminants.

- Mycoses*, Oct 2002, **45**, 8, 333-337.
32. DERMAVET
Gamme thérapeutique.
Communiqué de presse [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.dermavet.net/modules.php?name=News&file=article&sid>
33. DERMAVET
Journée spécialisée du 16 Mai 2002 sur les *Malasseziae*. [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.dermavet.net/modules.php?name=section&op=viewarticle&artid=4431>.
Egalement paru dans *La Squame*, 2002, **2**, 1.
34. DESORMEAUX M.
La dermatite à *Malassezia* chez le chien : synthèse bibliographique et étude rétrospective de 61 cas.
Th : Med.vet. : Lyon: 2002-LYON 206,109 p.
35. Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires (DMV), 12^{ème} édition.
Maison-Alfort: Editions du point vétérinaire, 2003. 1760 p.
36. DUBINI F., BELLOTTI M.G., FRANGI A., MONTI D., SACCOMANI L.
In vitro antimittotic activity and nail permeation models of a piroctone olamine (octopirox) containing transungual water soluble technology.
Arzneimittelforschung., 2005, **55**, 8, 478-483.
37. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
Product information : Antidandruff agent. Octopirox. [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/oct04/101904/04n-0050-rpt0001-E-47-Product-Documentation-Octopirox-1976-vol8.pdf>
38. FUTTERER E.
Evaluation of efficacy of antidandruff agents.
J. Soc. Cosmet. Chem., November 1981, **32**, 327-338.
39. FUTTERER E.
Antidandruff hair tonic containing piroctone olamine.
Cosmet. Toiletries, Feb. 1998, **103**, p49-52.
40. FUTTERER E.
Report on tests for the determination of the substantivity of Octopirox® on the scalp. [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/oct04/101904/04n-0050-rpt0001-E-10-Futterer-vol7.pdf>

41. GARAU M., DEL PALACIO A., GARCIA J.
Prevalence of *Malassezia spp.* in healthy pigs.
Mycoses, Jan 2005, **48**, 1, 17-20.
42. GATTO H., REME C.A.
Designing a new range of topical products : the Allermyl® story [en ligne]
(page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.dermavet.net/modules.php?name=section&op=viewarticle&artid=6369>.
43. GEMMER C.M., DeANGELIS Y.M., THEELEN B. *et al.*
Fast, non invasive method for molecular detection and differentiation of
Malassezia yeasts species on human skin and application of the method to
dandruff microbiology.
J. Clin. Microbiol., Sept. 2002, **40**, 9, 3350-3357.
44. GEORGALAS A.
Enhanced delivery of anti-dandruff active in a shampoo vehicle.
J. Cosmet. Sci., 2004, **55 Suppl.**, 207-214.
45. GHAFHAROKHI M.S., ABYANEH M.R.
Rapid identification of *Malassezia furfur* from other *Malassezia* species : a
major causative agent of Pityriasis versicolor.
IJMS, Mars 2004, **29**, 1, 36-39.
46. GIRAO M.D., DO PRADO M.R., BRILHANTE R.S., CORDEIRO R.A.,
MONTEIRO A.J., SIDRIM J.J., ROCHA M.F.
Variability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage
mediums.
Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Mai-Juin 2004, **37**, 3, 229-233.
47. GROUX D., HERIPRET D.
Dermatite à *Malassezia* chez un chien : à propos d'un cas.
Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 1995, **30**, 403-408.
48. GRUSON-VESCOVALI F.
Malassezia pachydermatis dans les oreilles des chiens et des chats. Etude de
la prévalence dans un effectif de 250 chiens et 250 chats.
Th. : Med. Vet : Toulouse : 2002- TOU 4047, 121 p.
49. GUAGUERE E., PRELAUD P.
Etude rétrospective de 54 cas de dermatite à *Malassezia pachydermatis* chez
le chien : résultats épidémiologiques, cliniques, cytologiques et
histopathologiques.
Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 1996, **31**, 309-323.
50. GUEHO E., MIDGLEY G., GUILLOT J.
The genus *Malassezia* with description of four new species.
Antonie Van Leeuwenhoek, Mai 1996, **69**, 4, 337-355.

51. GUILLOT J.
Importance du genre *Malassezia* chez les carnivores domestiques
Th. : Med vet : Alfort : 1993-ALF 106, 101 p.
52. GUILLOT J., BENSIGNOR E., JANKOWSKI F. *et al.*
Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of Basset Hounds.
Veterinary Dermatology, 2003, **14**, 153-157.
53. GUILLOT J., BOND R.
Malassezia pachydermatis : a review.
Med.Mycol., Oct 1999, **37**, 5, 295-306.
54. GUILLOT J., BREUGNOT C., DE BARROS M., CHERMETTE R.
Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin.
J. Vet. Diagn. Invest., 1998, **10**, 384-386.
55. GUILLOT J., GUEHO E., CHERMETTE R.
Confirmation of the nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*.
Antonie Van Leeuwenhoek, 1995, **67**, 2, 173-176.
56. GUILLOT J., GUEHO E., CHEVRIER G., CHERMETTE R.
Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA.
Res. Vet. Sci., 1997, **62**, 22-25.
57. GUPTA A.K., BLUHM R.
Ciclopirox (Loprox®) gel for superficial fungal infections.
Skin Therapy Lett, 2004, **9**, 7, 4-6, 9.
58. GUPTA A.K., KOHLI Y., SUMMERBELL R.C.
Molecular differentiation of seven *Malassezia* species.
J. Clin. Microbiol., Mai 2000, **38**, 5, 1869-1875.
59. HAMMER K.A., CARSON C.F, RILEY T.V.
In vitro activity of Ketoconazole, Econazole, Miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species.
Antimicrobial agents and chemotherapy, Fev. 2000, **44**, 2, 467-469.
60. HANEL H.
Testing of Octopirox against pityrosporum ovale (orbiculare) *in vitro* [en ligne]
(page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/oct04/101904/04n-0050-rpt0001-E-09-Hanel-vol7.pdf>
61. HARVEY R.G., Mc KEEVER P.J.
Manuel de Dermatologie Canine et Féline.
Paris : Masson, 2000.240p.

62. HIRAI A., KANO R., MAKIMURA K. *et al.*
Malassezia nana sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Mars 2004, **54**, 623-627.
63. HUANG H.P., LITTLE C.J., FIXTER L.M.
 Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa.
Res. Vet. Sci., Juillet 1993, **55**, 1, 119-123.
64. HUNTING D., GOWANS B.
 The mechanism of cell growth inhibition by octopirox [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
 Adresse URL :
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/oct04/101904/04n-0050-rpt0002-Tab-15-vol10.pdf>
65. KANEKO T., MAKIMURA K., SUGITA T. *et al.*
 Tween 40-based precipitate production observed on modified chromogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species.
Med. Mycol., Mai 2006, **44**, 3, 227-231.
66. KELLNER, ECKERT.
 Pharmacokinetic studies of Octopirox-¹⁴C after dermal, oral and intravenous administration to rats. [en ligne] (page consultée le 10/10/06).
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/oct04/101904/04n-0050-rpt0001-R-45-HOECHST-vol6.pdf>
67. KINDO A.J., SOPHIA S.K., ANANDAN S.
 Identification of *Malassezia* species.
Indian J Med Microbiol [serial online] 2004 [cited 2005 Oct 6] ; 22 :179-181.
 Adresse URL: <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2004;volume=22;issue=3;spage=179;epage=181;auiast=Kindo>.
68. KISS G., RADVANYI S., SZIGETI G.
 Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa.
Mycoses, Juillet-Aout 1996, **39**, 7-8, 313-321.
69. KORTING H.C., GRUNDMANN-KOLLMANN M.
 The hydroxypyridones : a class of antimycotics of its own.
Mycoses, Nov. 1997, **40**, 7-8, 243-247.
70. KRUSE R., HENGSTENBERG W., HANEL H., RAETHER W.
 Studies for the elucidation of the mode of action of the antimycotic hydroxypyridone compound, rilopirox.
Pharmacol., 1991, **43**, 5, 247-255.

71. LE MINH T., COIFFARD L.J., PEIGNE F., DE ROECK-HOLTZHAUER Y.
Photodegradation of piroctone olamine in aqueous diluted solutions : effect of the presence of anionic surfactants.
S.T.P. Pharma Sci., 1996, **6**, 6, 455-458.
72. LEE J.H., LEE H.S., EUN H.C., CHO K.H.
Successful treatment of dandruff with 1.5% of ciclopirox olamine shampoo in Korea.
Journal of dermatological Treatment, December 2003, **14**, 4, 212-215.
73. LEEMING J.P., NOTMAN F.H.
Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin.
J. Clin. Microbiol., Oct. 1987, **25**, 10, 2017-2019.
74. LODEN M., WESSMAN C.
The antidandruff efficacy of a shampoo containing piroctone olamine and salicylic acid in comparison to that of pyrithione shampoo.
International Journal of Cosmetic Science, August 2000, **22**, 4, 285-289.
75. MARKUS A.
Hydroxy-pyridones : des propriétés biologiques originales.
In : SHUSTER S.
Hydroxy-pyridones as antifungal agents with special emphasis on onychomycosis.
Springer Verlag, Berlin, 1999, chapitre 1.
76. MAROUTEIX L.
La flore fongique cutanée du chien séborrhéique. Rôle des levures du genre *Malassezia* et essai de traitement par l'énilconazole.
Th. : Med. Vet. : Nantes : 1994-NAN 091, 112 p.
77. MATOUSEK J.L., CAMPBELL K.L., KAKOMA I. *et al.*
Evaluation of the effect of pH on *in vitro* growth of *Malassezia pachydermatis*.
Can. J. Vet. Res., Jan 2003, **67**, 1, 56-59.
78. MAYSER P., GRUNDER K.
Growth inhibition of *Malassezia* species by pharmacological concentrations of polidocanol.
Mycoses, Jan-Fev 1995, **38**, 1-2, 23-27.
79. MAYSER P., HAZE P., PAPAVALASSILIS C. *et al.*
Differentiation of *Malassezia* species : selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*
Br. J. Dermatol., Aout 1997, **137**, 2, 208.
80. MAYSER P., HAZE P., PICKEL M.
Polidocanol sensitivity : a possible tool in the differentiation of *Malassezia spp.*
Mycoses, dec 1997, **40**, 9-10, 391-395.

81. MAYSER P., TOWS A., KRAMER H.J. *et al.*
Further characterisation of pigment-producing *Malassezia* strains.
Mycoses, Feb 2004, **47**, 1-2, 34-39.
Mycoses, Nov-Dec 1994, **37**, 11-12, 393-399.
82. MITTAG H.
Fine structural investigation of *Malassezia furfur* : II. The envelope of the yeast cells.
Mycoses, Jan-Fev 1995, **38**, 1-2, 13-21.
83. MORRIS D.O., O'SHEA K., SHOFER F.S., RANKIN S.
Malassezia pachydermatis carriage in dog owners
Emerging infectious diseases, Jan 2005.
84. MOULINIER C.
Parasitologie et Mycologie médicales-éléments de morphologie et de biologie.
Lavoisier, Editions médicales internationales, 2003.
85. MURAI T., NAKAMURA Y., KANO R. *et al.*
Susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* using the urea broth microdilution method.
Mycoses, Avril 2002, **45**, 3-4, 84-87.
86. MURAI T., NAKAMURA Y., KANO R. *et al.*
Differentiation of *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis* by glycine utilization.
Mycoses, Juin 2002, **45**, 5-6, 180-183.
87. NARDONI S., MANCIANTI F., CORAZZA M., RUM A.
Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs.
Mycopathologia, Mai 2004, **157**, 4, 383-388.
88. NARDONI S., MANCIANTI F., RUM A., CORAZZA M.
Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis.
J. Feline Med. Surg., Juin 2005, **7**, 3, 141-145.
89. NELSON R.W., COUTO C.G.
Small Animal Internal medicine, 3^{ème} édition.
St Louis : Mosby, 2003.1362 p.
90. NOLEN G.A, BAINES D., POYNTER J.I. *et al.*
The effects of dietary iron supplementation on the toxicity of piroctone olamine in the growing rat.
Drug and chemical toxicology, Juin 1989, **12**, 2, 111-121.
91. PIERARD G.E., ARRESE J.E., PIERARD-FRANCHIMONT C.
Itraconazole corneofungimetry bioassay on *Malassezia* species.
Mycoses, Oct 2004, **47**, 9-10, 418-421.

92. PIERARD-FRANCHIMONT C., PIERARD G.E.
Subjects using anti-dandruff shampoos.
Journal of the European Dermatology and Venereology, October 1995, **5**,
1001, p153.
93. PIERARD-FRANCHIMONT C., UHODA E., LOSSOUARN G.
Effect of residence time on the efficacy of dandruff shampoos.
International Journal of Cosmetic Science, 2003, **25**, 267-271.
94. PRADO M.R., BRITO E.H., GIRAO M.D et al.
Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with
corneal ulcer than in healthy dogs.
Vet. Microb., Mai 2004, **100**, 1-2, 115-120.
95. RAABE P., MAYSER P., WEISS R.
Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M.*
pachydermatis in veterinary specimens.
Mycoses, Dec 1998, **41**, 11-12, 493-500.
96. RAETHER W., HANEL H.
Rilopirox : a new hydroxypyridone antifungal with fungicidal properties.
Mycoses, Avril 1990, **33**, 4, 191-202.
97. REME C.
Dossier technique Sebolytic®, shampooing nouvelle formule.
Virbac.
98. REME C., CADOT P., HOLZAPFEL G., JASMIN P.
Efficacy of combined topical therapy with keratoregulating shampoo and lotion
in the management of keratoseborroic disorders associated with the
malassezia proliferation in dogs.
In : Proceedings 18th ESVD-ECVD Annual Congress.
Nice, France, September 26-28 2002.
99. RIVALLAND P., COIFFARD L., LELAURE M., DE ROECK-HOLTZHAUER Y.
Evaluation de l'activité antifongique de deux dérivés et test d'innocuité *in vivo*
de shampooings à visée antipelliculaire ainsi formulés.
International Journal of cosmetic Science, 1994, **16**, 77-83.
100. ROSALES M.S., MARSELLA R., KUNKLE G. *et al.*
Comparison of the clinical efficacy of oral terbinafine and ketoconazole
combined with cephalixin in the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs- a
pilot study.
Veterinary Dermatology, 2005, **16**, 3, 171-176.
101. ROSER P.M.
Réalisation d'un dossier de cosmétique destiné à des chiens : exemple d'un
shampooing.
Th. : Med. Vet. : Alfort : 2002-ALF 98, 116 p.

102. SCHMIDT A.
Malassezia furfur : a fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders.
Cutis, 1997, **59**, 1, 21-24.
103. SCHMIDT A., RÜHL-HORSTER B.
In vitro susceptibility of *Malassezia furfur* against azole compounds.
Mycoses, Juillet-Aout 1996, **39**, 7-8, 309-312.
104. SCIENTIFIC COMMITTEE FOR COSMETICS AND NON-FOOD PRODUCTS (SCCNFP).
Evaluation and opinion on : Piroctone Olamine and its monoethanolamine salt [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adopted by the SCCNFP during its 19th plenary meeting of 27 February 2002.
Adresse URL : http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/sccp/out162_en.pdf
105. SENCZEK D., SIESENOP U., BOHM K.M.
Characterisation of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).
Mycoses, 1999, **42**, 5-6, 409-414.
106. SIGLE H.C., SCHAFFER-KORTING M., KORTING H.C., HUBE B., NIEWERTH M.
In vitro investigations on the mode of action of the hydroxypyridone antimetotics rilopirox and piroctone on *Candida albicans*.
Mycoses, Mai 2006, **49**, 3, 159-168.
107. SUGITA T., TAJIMA M., TAKASHIMA M. *et al.*
A new yeast, *Malassezia Yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects.
Microbiol. Immunol., 2004, **48**, 8, 579-583.
108. SUGITA T., TAKASHIMA M., KODAMA M. *et al.*
Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects.
J. Clin. Microbiol., Oct. 2003, **41**, 10, 4695-4699.
109. SUGITA T., TAKASHIMA M., SHINODA T. *et al.*
New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis.
J. Clin. Microbiol., Avr. 2002, **40**, 4, 1363-1367.
110. TARAZOOIE B., KORDBACHEH P., ZAZINI F.
Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran.
BCM Dermatology, 2004, **4**.

111. VIRBAC EUROPEAN SYMPOSIUM
Skin biology and innovations in dermatology.
Antibes Juan Les Pins, France, 22 Mars 2003.
112. VIDAL Le Dictionnaire, 74^{ème} édition.
Paris : Editions du Vidal, 1998. 2080 p.
113. VOGEL H.G., ALPERMANN M.
General pharmacology of Octopirox. [en ligne] (page consultée le 10/06/06).
Adresse URL :
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/oct04/101904/04n-0050-rpt0001-R-48-HOECHST-vol6.pdf>
114. WEISS R., RAABE P., MAYSER P.
Yeasts of the genus *Malassezia* : taxonomic classification and significance in veterinary and clinical medicine.
Mycoses, 2000, **43 Suppl. 1**, 69-72.
115. WHITE S.D., VANDENABEELE S.I., DRAZENOVICH N.L., FOLEY J.E.
Malassezia species isolated from the intermammary and preputial fossa areas of horses.
J. Vet. Intern. Med., Mars-Avril 2006, **20**, 2, 395-398.

Toulouse, 2006

NOM : TANE

PRENOM : ELISABETH

TITRE :

Etude *in vitro* de l'efficacité antifongique de la Piroctone olamine sur *Malassezia pachydermatis*.

RESUME :

Le but de cette étude est d'évaluer l'action antifongique de la Piroctone olamine sur *Malassezia pachydermatis in vitro*. De la Piroctone olamine en poudre, à différentes concentrations allant de 43 à 344 mg/m², est solubilisée puis déposée sur des boîtes de Pétri. Dans un premier temps, l'auteur étudie l'effet préventif antifongique de la Piroctone olamine en répartissant le principe actif sur la gélose de Sabouraud, avant d'ensemencer les levures. Dans un deuxième temps, il applique la Piroctone olamine sur les colonies, ce qui lui permet d'évaluer son effet curatif. Il ressort que la Piroctone olamine a une activité antifongique satisfaisante sur *Malassezia pachydermatis* à la concentration de 172 mg/m².

MOTS-CLES : PIROCTONE OLAMINE, MALASSEZIA, PACHYDERMATIS, EFFICACITE, ANTIFONGIQUE.

ENGLISH TITLE :

***In vitro* study of the antifungal effectiveness of Piroctone olamine on *Malassezia pachydermatis*.**

ABSTRACT:

The aim of this study is to evaluate *in vitro* the antifungal effectiveness of Piroctone olamine. Powder of Piroctone olamine, at various concentrations from 43 mg/m² at 344 mg/m², is made soluble and put on Petri dishes. First, the author studies the preventive antifungal effect of Piroctone olamine spreading the active principle over the Sabouraud medium before seeding the yeasts. Second, he puts the Piroctone olamine on the colonies, which allows to evaluate the curative antifungal effect. He concludes that Piroctone olamine has a satisfactory antifungal activity on *Malassezia pachydermatis* at a concentration of 172 mg/m².

KEY WORDS: PIROCTONE OLAMINE, MALASSEZIA, PACHYDERMATIS, EFFECTIVENESS, ANTIFUNGAL.