



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

En sciences biologiques

Option: Biochimie appliquée

Présenté

Par

Mlle Bentabet Douniazad

Thème

**Effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes
Candida albicans/bactéries Gram négatives isolés des
dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen**

Soutenu le, 15 Juillet 2017

Devant le jury :

Présidente :	Pr Boucherit-Otmani Zahia	Université de Tlemcen
Promoteur :	Pr Boucherit Kebir	Centre Universitaire d'Ain Témouchent
Examineurs :	Dr Kazi Tani Zahira Zakia	Université de Tlemcen
	Dr Rahmoun Mohammed Nadjib	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2016-2017

ملخص

ركزت هذه الدراسة على تأثير الوسط الحيوي ودرجة الحموضة على تشكيل الأغشية الحيوية المختلطة من فطريات *Candida albicans* و بكتيريا سالبة الغرام معزولة من الأجهزة الطبية بالمستشفى الجامعي لتلمسان. وأظهرت النتائج أن الخميرة *Candida albicans* لديها القدرة على تشكيل الأغشية الحيوية المختلطة مع جميع أنواع البكتيرية المعزولة معها. كمية الأغشية الحيوية المختلطة تتغير حسب السلالة و الصنف و تكوين الوسط الحيوي و درجة حموضته.

المصادر الكربونية وسيلة واعدة لتشكيل خيوط من *Candida albicans* مما يؤثر على ارتباطها مع البكتيريا. الكلمات المفتاحية: *Candida albicans*, البكتيريا سالبة الجرام, مختلطة أغشية حيوية , وسط حيوي , درجة الحموضة ,سكر جلوكوز

Résumé

L'objectif de notre travail a porté sur l'effet du milieu de culture ainsi que le pH sur la formation de biofilms mixtes *in vitro* de *Candida albicans*/bactéries Gram négatives isolées des dispositifs médicaux du Centre Hospitalo Universitaire de Tlemcen.

Les résultats obtenus ont montré que les levures *Candida albicans* ont le pouvoir de former des biofilms mixtes avec toutes les espèces bactériennes co-isolées. La quantité des biofilms produit varie en fonction des souches, des espèces, de la composition du milieu de culture et de son pH.

Les sources de carbone favorisent la formation des hyphes de *Candida albicans*, ce qui renforce l'adhésion des bactéries.

Mots-clés: *Candida albicans*, Bactéries Gram négatives, Biofilm mixte, Milieu de culture, pH, Glucose.

Summary

Our work focused on the study of the composition of the culture medium as well as the pH on the formation of mixed biofilms *in vitro* by *Candida albicans* /bacteria Gram negative isolated from the medical devices of the University Hospital of Tlemcen.

The results obtained showed that *Candida albicans* yeasts have the ability to form mixed biofilms with all co-isolated bacterial species. The quantity of biofilms produced varies according to the strains, the species, the composition of the culture medium and its pH.

Carbon sources favor the formation of hyphae of *Candida albicans*, which reinforces the attachment of bacteria.

Keywords: *Candida albicans*, Bacteria Gram negative, Mixed biofilm, Culture medium, pH, Glucose

Dédicaces

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail:

A mes très chers parents et ma grand mère, pour les encouragements, tendresse, amour et soutien durant mes études ; vous trouverez ici le fruit de vos sacrifices et je souhaite que j'ai réalisé l'un de vos rêve par ce modeste travail. Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.

*A mes chères sœurs : Nesrine et chahrazad pour
leur amour et compréhension*

A ma nièce adorée « Hiba » pour tout l'amour qu'elle nous procure.

A toute ma famille ainsi qu'à tous mes amis.

Remerciements

Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux – le Tout Miséricordieux – Que Dieu bénisse le Prophète Mouhammad, Imam des Bien heureux et Sauvegarde des Purifiés – ainsi que sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons- Amin.

Je rends grâce à Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à mon promoteur, Monsieur Boucherit Kebir, Professeur, Directeur au Centre Universitaire d'Ain Témouchent pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Votre grande générosité et votre détermination pour la recherche font de vous un exemple exceptionnel à suivre. Veuillez trouver dans cet ouvrage l'expression de mes plus profonds respects et mon entière reconnaissance.

J'exprime mes plus vifs remerciements, ma reconnaissance toute particulière et ma gratitude, qui ne seront jamais concrètement exprimées à l'égard de Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen, pour l'aide précieuse et chaleureuse qu'elle m'a offert. Votre générosité et votre grande patience m'ont à chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles. Veuillez trouver par ces quelques mots Madame le Professeur, l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.

Mes remerciements vont aussi :

Mme Kazi Tani Zahira Zakia Maître de conférences classe B au département de Biologie, de l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Je lui exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr Rahmoun Nadjib Maître de conférences classe A au département de Biologie, de l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Merci d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

Ce travail n'aurait pu se faire sans le soutien de M^{lle} Touil hidayet, qui m'a aidé durant mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à toute ma famille, Merci pour votre soutien et vos encouragements, Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu en travaillant au sein du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » et je remercie l'ensemble des doctorants ainsi que les techniciennes du laboratoire pour leur aide et leur amitié.

Très cordialement

Table des matières

Première partie :	Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie :	Matériel et Méthodes	05
1.	Matériel	06
1.1.	Les micro-organismes	06
1.2.	Milieus de culture	06
2.	Méthodes	09
2.1.	Préparation de l'inoculum de <i>Candida albicans</i>	09
2.2.	Préparation des inocula bactériens	09
2.3.	Evaluation de la capacité des souches isolées à former des biofilms <i>in vitro</i>	09
2.4.	Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet	09
Troisième partie :	Résultats et discussion	11
1.	Effet de la nature du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes <i>Candida albicans</i> /bactéries Gram négatives	12
2.	Effet de la formation des biofilms mixtes sur le pH du milieu de culture	14
3.	Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes	16
4.	Effet du pH du milieu de culture additionné de glucose sur la formation des biofilms mixtes	18
Quatrième partie :	Conclusion générale	21
Cinquième partie :	Références bibliographiques	23

Liste des figures

- Figure N°1:** Effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes au cours du temps.....13
- Figure N°2:** pH des milieux de culture mesurés après la formation des biofilms mixtes.....15
- Figure N°3:** Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu trypticase soja.....17
- Figure N°4:** Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu BHIB...17
- Figure N°5:** Variation du pH du milieu de culture Trypticase soja en présence et en l'absence du glucose au cours de la formation des biofilms mixtes....19
- Figure N°6:** Variation du pH du milieu de culture BHIB en présence et en l'absence de glucose au cours de la formation des biofilms mixtes.....20

Liste des abréviations

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

BHIBG : Brain Heart Infusion Broth additionné de glucose.

DO : Densité Optique.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute Medium 1640.

Première partie
Synthèse bibliographique

L'utilisation des dispositifs médicaux en milieu hospitalier a connu un essor important ces dernières décennies. Au cours d'une hospitalisation, les patients sont exposés à l'implantation de cathéter vasculaire. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cet acte invasif est associé à un risque infectieux estimé à 60% **(OMS, 2013)**. Les microorganismes responsables d'infections associées aux soins proviennent de la flore cutanée du patient, de l'environnement ou de la microflore exogène transitoire véhiculée par le personnel hospitalier **(De Chalvet De Rochemonteix, 2009)**. C'est le cas des levures opportunistes appartenant au genre *Candida*, notamment *Candida albicans*, l'espèce la plus virulente de ce genre **(Yang, 2003)**. En effet, malgré les mesures de précaution, l'ampleur des candidoses invasives ne cesse d'augmenter, cela est dû d'une part à l'émergence de nouvelles espèces pathogènes. D'autre part à la résistance accrue de certains microorganismes aux traitements habituels **[(Kibber, 2007) ; (Pfaller et coll., 2008)]**.

La physiopathologie des candidoses est étroitement liée à l'utilisation de dispositifs médicaux qui offrent une surface pour l'adhésion des microorganismes et la formation d'un biofilm **(Lebeaux et coll., 2014)**.

Il s'agit d'une communauté polymicrobienne fixée à une surface inerte ou vivante, enchâssée dans une matrice exopolymérique adhésive et protectrice qui peut occuper jusqu'à 75% du volume d'un biofilm mature **(Bueno, 2014)**.

Par ailleurs, les bactéries présentes dans le même milieu que *Candida albicans* peuvent interagir avec elle pour former des biofilms mixtes **(Pruitt et coll., 1998)**.

Les trois espèces bactériennes souvent co-isolées avec cette levure sont *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* et *Staphylococcus aureus* **(Klotz et coll., 2007)**.

Ces biofilms constituent un réservoir infectieux pour un éventail de micro-organismes pathogènes, ce qui nécessite des stratégies complexes de traitements antimicrobiens.

Ces structures poly-microbiennes constituent une barrière physique qui empêchent la pénétration efficace des antimicrobiens, conférant ainsi à ces communautés, une plus grande résistance aux traitements habituels **(Hall-stoodley et coll., 2004)**.

Le biofilm n'est pas un milieu homogène, mais un environnement qui présente souvent une architecture complexe, très variable selon les espèces qui le composent et les conditions environnementales [(Stoodley et coll., 1994) ; (Sutherland, 2001)]. Son développement est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les micro-organismes. Cette dernière est composée essentiellement d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Nous y trouvons également l'ADN, l'ARN et les lipides (Sutherland, 2001).

La structure du biofilm est fortement influencée par plusieurs paramètres, tels que la température et la composition du milieu (Kumamoto, 2002). Ces facteurs affectent plusieurs gènes, qui sont ainsi exprimés différemment lors de la formation du biofilm et de la croissance sous forme planctonique.

Il est important de noter qu'afin de former un biofilm mixte, *Candida albicans* et les bactéries doivent maintenir un équilibre qui bascule de la synergie à l'antagonisme selon les paramètres physico-chimiques du milieu environnant à savoir, la composition et le pH du milieu de culture ainsi que la température.

En effet, en 2010, **Diana et ses collaborateurs**, ont montré que l'adhésion de *Candida albicans* aux surfaces est favorisée par certaines bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli* qui augmente l'adhésion des levures à la muqueuse vésicale dans les infections urinaires, il s'agit d'une relation de synergie.

La synergie peut être également métabolique comme le cas de la capacité des levures à métaboliser le glucose disponible, ce qui module le pH du milieu et le rend favorable à certaines bactéries (Romano et Kolter, 2005). En effet, les bactéries du genre *Streptococcus* excrètent le lactate qui peut être utilisé comme source de carbone par les levures (Holmes et coll., 2006).

La synergie n'est pas la seule forme d'interaction entre les levures et les bactéries. Plusieurs études ont mis en évidence un antagonisme entre *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*, malgré qu'un biofilm mixte formé par ces deux pathogènes comporte toutes les formes morphologiques de *Candida* (Thein et coll., 2009).

En 1985, **Kennedy et Volz**, ont montré que la colonisation par *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* peut être modifiée à différents niveaux. Il s'agit d'une compétition pour les sites d'adhérence sur des fragments de la muqueuse qui sera suivie de la formation d'une couche dense par la flore normale inhibant l'adhésion de *Candida*. De même, en 2014, **Méar et ses collaborateurs** ont montré que la filamentation de *Candida albicans* est réprimée par la pyocyanine, une molécule de quorum sensing produite par *Pseudomonas aeruginosa*.

Par ailleurs, l'étude au microscope électronique à balayage réalisée par **Seghir et ses collaborateurs** en 2015, a montré que les biofilms mixtes formés dans le milieu Brain Heart Infusion Broth (BHIB) sont à majorité bactérienne, alors que ceux formés dans le Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) présentent un équilibre entre les deux microorganismes (levures/bactéries). Etant donné que ces deux milieux présentent la même concentration en glucose, cette différence structurale est probablement due à la richesse du RPMI en ions métalliques qui favorisent l'attachement des levures aux surfaces [(Cutler et coll., 1990) ; (Klotz et coll., 1993)].

Le pH du milieu de culture est un facteur qui doit être également pris en compte lors de la formation des biofilms mixtes, car selon **Wagner et Ottesen, (1982)**, le pH optimal pour l'attachement des espèces de *Candida* doit être compris entre 6 à 7. Tous ces paramètres modulent la formation de biofilms mixtes qui reste fortement dépendante des interactions entre les espèces microbiennes présentes dans le milieu.

Partant de toutes ces données, nous avons entrepris cette étude qui porte sur l'évaluation de l'effet de la composition du milieu de culture sur la formation de biofilms mixtes *in vitro* par *Candida albicans*/bactéries Gram négatives isolées de dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen.

Deuxième partie
Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab)» de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

1. Matériel

1.1. Microorganismes

Pour la formation des biofilms mixtes *Candida albicans*/bactéries Gram négatives, nous avons utilisé une collection de dix (10) souches de *Candida albicans* et douze (12) bactéries dont (03) *Escherichia coli*, (4) *Proteus mirabilis*, (2) *Acinetobacter baumannii*, (2) *Providencia stuartii* et (1) *klebsiella pneumoniae* co-isolées des dispositifs médicaux des services de neurologie médicale, et d'anesthésie-réanimation au CHU de Tlemcen.

Les levures et les bactéries sont entretenues par repiquages réguliers et conservées à + 4°C sur gélose Sabouraud et gélose nutritive respectivement.

1.2. Milieux de culture

Afin de tester l'effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes, quatre milieux de composition et de pH différents sont utilisés dont la composition pour un litre est la suivante:

➤ Trypticase soja

Composants	g/L
Peptone de caséine	17
Peptone de farine	3
D (+) glucose	2,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2,5

➤ Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Composants	g/L
Cerveau de veau	12,5
Coeur de boeuf	5
Peptone	10
Chlorure de sodium	5
D(+) Glucose	2
Phosphate disodique	2,5

➤ Sabouraud liquide

Composants	g/L
Glucose	20
Peptone	10
Extrait de levure	3

➤ Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI)

Composants	g/L
Sels inorganiques	
Nitrate de calcium • 4H ₂ O	0,1
Sulfate de magnésium (anhydre)	0,04884
chlorure de potassium	0,4
Chlorure de sodium	6
Phosphate disodique (anhydre)	0,8
Acides aminés	
L-Arginine	0,2
L-Asparagine (anhydre)	0,05
Acide L-aspartique	0,02
L-cystine • 2HCl	0,0652
Acide L-glutamique	0,02
L-Glutamine	0,3

Glycine	0,01
L-Histidine	0,015
Hydroxy-L-Proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leucine	0,05
L-Lysine • HCl	0,04
L-Méthionine	0,015
L-Phénylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serine	0,03
L-Thréonine	0,02
L-Tryptophane	0,005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0,02883
LL-Valine	0,02
Vitamines	
D-biotine	0,0002
Chlorure de choline	0,003
Acide folique	0,001
Myo-Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
Acide p-aminobenzoïque	0,001
D-acide pantothénique (hémicalcium)	0,00025
Pyridoxine• HCl	0,001
Riboflavine	0,0002
Thiamine• HCl	0,001
Vitamine B12	0,000005
Autres	
D-Glucose	2
Glutathion (réduit)	0,001
Rouge de phénol • Na	0,0053
Suppléments	
Le bicarbonate de sodium	2

Nous avons également utilisé le milieu BHIB et le trypticase de soja additionnés de 2% de glucose.

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'inoculum de *Candida albicans*

Une préculture de 24 heures à 30°C sur milieu Sabouraud est centrifugée à 3000g pendant 5 minutes à +4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé pH7,4, 10mM (PBS) puis ressuspendu dans chaque milieu de culture à une concentration de 10^6 cellules/mL.

2.2. Préparation des inocula bactériens

Une préculture de 24 heures à 30°C sur milieu BHIB est centrifugée à 1000g pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant est écarté et le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé pH 7,4, 10mM (PBS) puis ressuspendu dans chaque milieu de culture à une concentration de 10^7 cellules/mL.

2.3. Evaluation de la capacité des souches isolées à former des biofilms *in vitro* (Ibrra-trujillo et coll., 2012)

Pour la formation des biofilms multi-espèces *Candida albicans*/bactéries Gram négatives, nous avons suivi le protocole d'Ibrra-trujillo et coll., (2012) qui consiste à introduire 50µL de la suspension levurienne et 50µL d'une suspension bactérienne dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits. Cette dernière est ensuite scellée puis placée dans une étuve à 37°C pendant 24, 48 et 72 heures.

2.4. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet (Christensen et coll., 1985)

Après formation de biofilms, le milieu de culture est aspiré et les puits sont lavés trois fois avec du PBS pH 7,4, 10mM. Les microplaques sont laissées pendant 15 minutes à température ambiante puis 100µL d'une solution de crystal violet sont ajoutés dans tous les puits de la microplaque. Après une incubation de 45 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et le crystal violet lié est libéré par addition de 100µL d'un mélange éthanol-acétone (80:20, v/v) (León-Romero et coll., 2015).

La densité optique est lue à 570nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (**BioTek FLx800**). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la biomasse du biofilm formé.

Troisième partie
Résultats et discussion

1. Effet de la nature du milieu de culture sur la cinétique de la formation des biofilms mixtes *Candida albicans*/ bactéries Gram négatives

Les densités optiques relatives aux quantités des biofilms mixtes (*Candida albicans*/bactéries Gram négatives) formés dans les quatre milieux de culture après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 37°C sont représentées sur la **figure N°1**.

Nous remarquons que les densités optiques mesurées après 48 heures d'incubation ((biofilm mature) pour la plupart des biofilms mixtes sont les plus importantes que celles lues après 24 et 72 heures.

Les biofilms formés par les cinq associations testées sur milieu trypticase soja présentent les biomasses les plus importantes. Il est à noter que la biomasse dépend de l'espèce bactérienne associée à *Candida albicans* dans le biofilm. En effet, la densité optique du biofilm mixte formé sur milieu trypticase soja est de 0,63 pour *Candida albicans*(1)/*Providencia stuartii* et de 0,4 pour *Candida albicans*(4)/*Acinetobacter baumannii*.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux antérieurs qui ont montré que dans un biofilm mixte, les bactéries sont capables de modifier l'environnement physico-chimique qui est responsable de la transition entre la forme hyphes et la forme levure de *Candida albicans* et d'inhiber la croissance des levures par la sécrétion de toxines [(Wargo et Hogan, 2006) ; (Buu et Chen, 2014)].

Dans le milieu RPMI, les densités optiques lues à 570nm sont plus importantes pour les biofilms de 24 heures et ceci quel que soit l'association testée. Nous constatons également que les DO des biofilms mixtes de *Candida albicans* associés aux cinq bactéries sont différentes.

Les observations microscopiques que nous avons effectuées ont mis en évidence une dominance de levures. Ceci est probablement lié à la richesse du milieu RPMI en ions métalliques qui conditionnent l'adhésion des levures aux surfaces (Fletcher M, 1988).

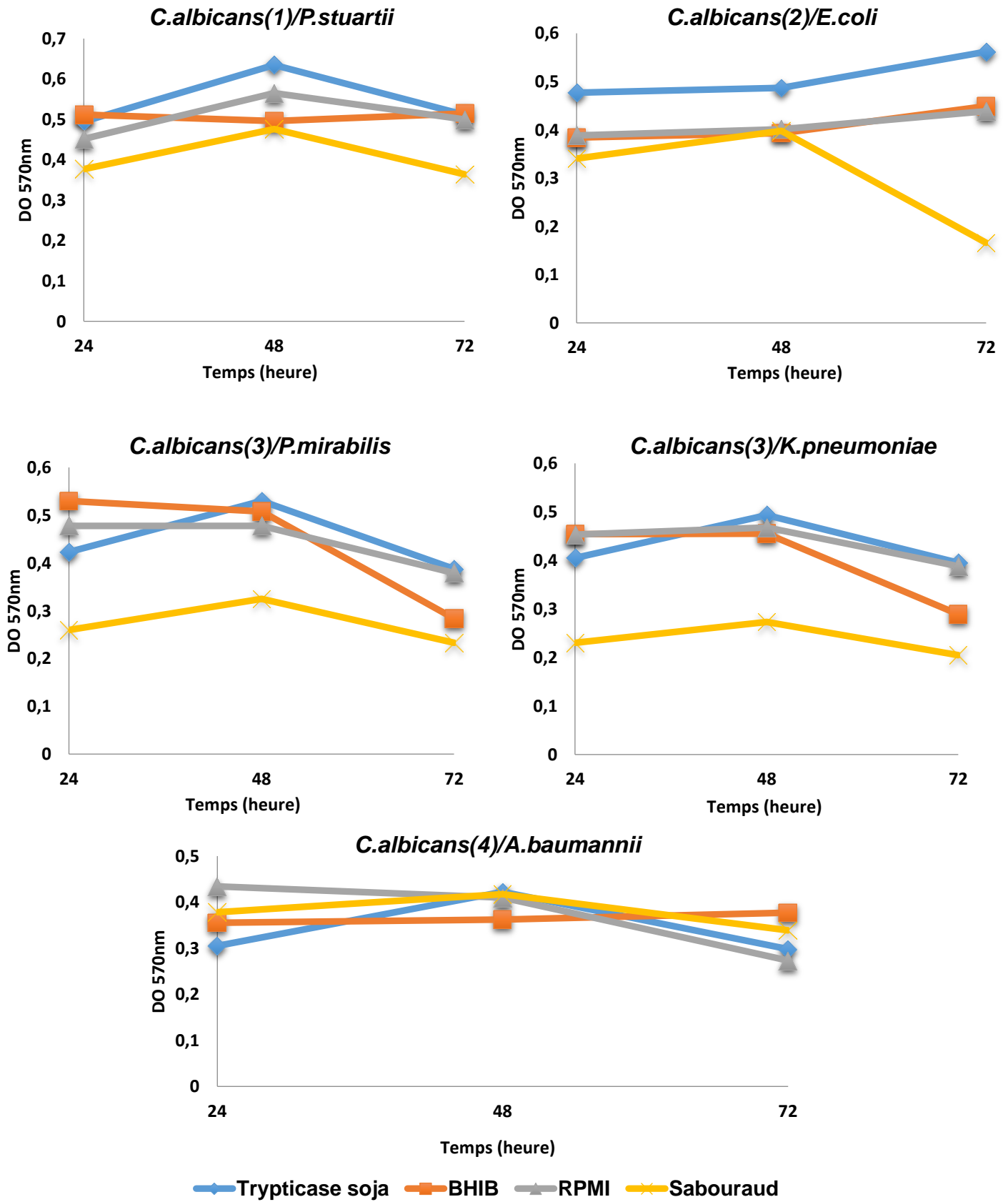


Figure N°1 : Effet du milieu de culture sur la formation des biofilms mixtes au cours du temps.

Les densités optiques lues à 570nm pour le biofilm mixte formé par l'association *Candida albicans*(1)/*E. coli* dans les milieux BHIB et RPMI sont identiques après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 37°C.

Par ailleurs, les biofilms mixtes formés par les associations *Candida albicans*(3)/*Proteus mirabilis* et *Candida albicans*(3)/ *Klebsiella pneumoniae* présentent des densités optiques respectives de 0,53 et 0,45. Ce résultat va dans le même sens que celui de **Lynch et Robertson (2008)** qui ont montré que l'adhérence de *Candida albicans* dépend de l'espèce bactérienne présente dans le milieu et de son interaction avec la levure.

Contrairement aux autres milieux testés, le Sabouraud liquide présente la plus faible quantité en biomasse et ceci pour la plupart des souches étudiées à l'exception de *Candida albicans*(4)/*Acinetobacter baumannii*. Ce résultat est en accord avec celui de **Kuhn et ses collaborateurs (2002)** qui ont montré que la capacité de formation des biofilms varie en fonction du genre des levures et aussi entre les espèces d'un même genre.

2. Effet de la formation des biofilms mixtes sur le pH du milieu de culture

Le pH est un facteur important, qui doit être pris en compte lors de l'étude de l'adhésion des microorganismes pour former les biofilms. Les données de la littérature ont montré que le pH optimal pour l'attachement des espèces de *Candida* varie de 6 à 7 [(**Sobel et coll., 1981**) ; (**Wagner et Ottesen, 1982**)]. De ce fait, il nous a paru nécessaire de mesurer le pH du milieu de culture après la formation des biofilms mixtes.

La **figure N°2** regroupe les résultats des pH des milieux de culture mesurés après la formation des biofilms mixtes.

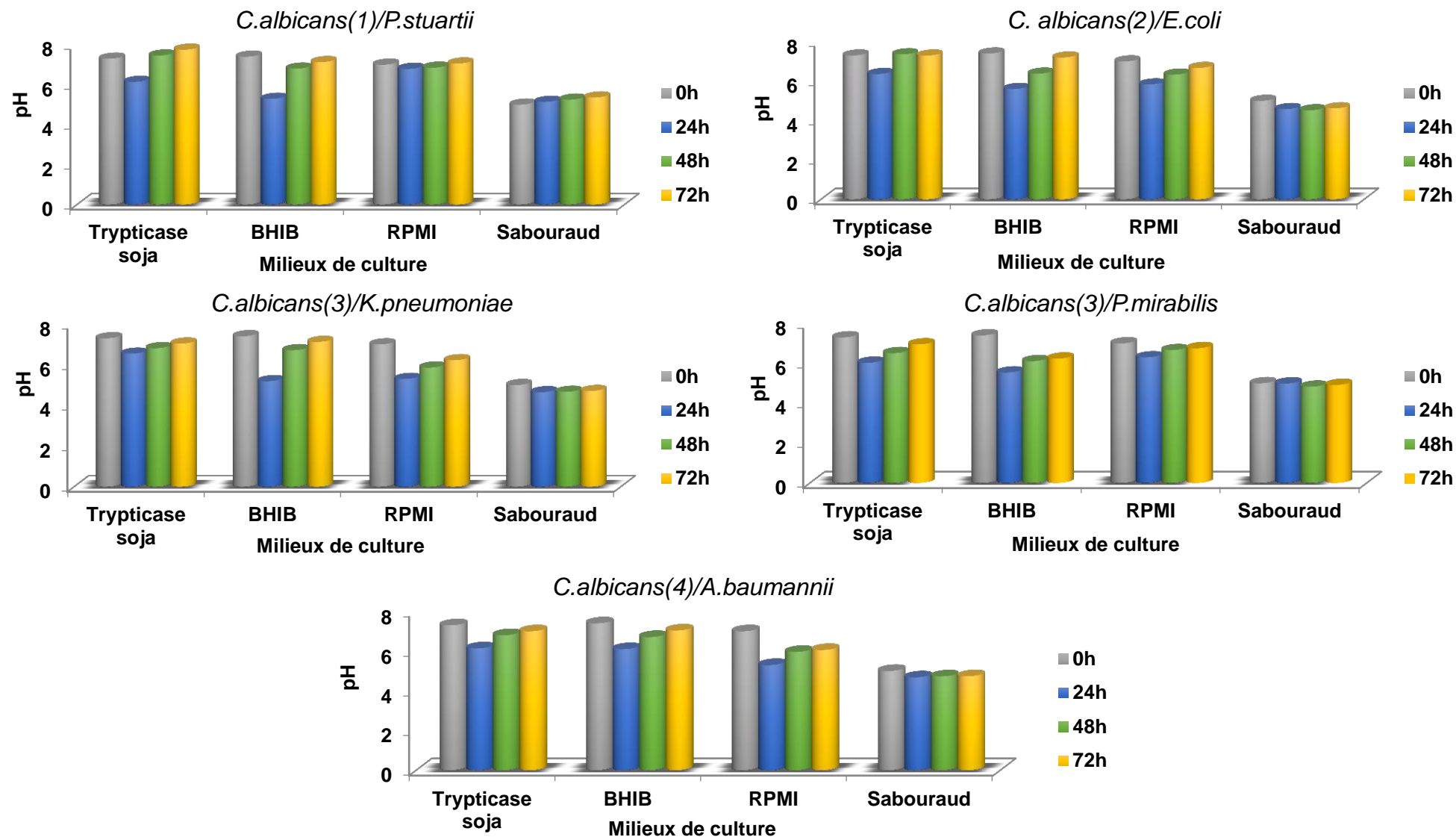


Figure N°2 : pH des milieux de culture mesurés après la formation du biofilm mixtes.

Nous constatons que la formation des biofilms mixtes par les différentes associations est à l'origine d'une légère variation des pH des milieux Trypticase soja, BHIB et RPMI 1640 par rapport au pH témoin ($7 \pm 0,2$) après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 37°C. En revanche, aucune variation du pH n'est observée pour le biofilm *Candida albicans*(1)/*P. stuartii* formé sur milieu RPMI.

Il est important de noter que le pH du milieu Sabouraud reste inchangé ($5,6 \pm 0,2$) pour toutes les associations testées même pour les biofilms de 72 heures. Rappelons que ce milieu est préconisé pour la croissance des levures. Ceci a été confirmé par les observations microscopiques que nous avons réalisé et ont montré une dominance des levures.

Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion [(Hamadi et coll., 2004) ; (Boutaleb, 2007)].

3. Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes

Selon Buu et coll., (2014), la formation des biofilms est fortement influencée par la concentration du glucose du milieu de culture. C'est pourquoi, il nous a paru nécessaire de tester la formation des biofilms mixtes par toutes les associations sur milieux trypticase soja et BHIB additionnés de 2% de glucose.

Les résultats obtenus sont regroupés sur les figures N°3 et 4.

Nous remarquons que l'addition de 2% de glucose au milieu de culture induit une nette augmentation des densités optiques.

En effet, l'addition de 2% de glucose au milieu Trypticase soja entraîne une augmentation des densités optiques qui passent de 0,51 à 0,6 pour l'association *Candida albicans*(1)/*P. stuartii*, de 0,5 à 0,54 pour l'association *Candida albicans*(3)/*K. pneumoniae*, de 0,33 à 0,51 pour l'association *Candida albicans*(3)/*P. mirabilis* et de 0,4 à 0,51 pour l'association *Candida albicans*(4)/*A. baumannii*.

Par ailleurs, pour le milieu BHIB, les densités optiques vont de 0,38 à 0,43 pour l'association *Candida albicans*(1)/*P. stuartii*, de 0,28 à 0,35 pour *Candida albicans*(3)/*K. pneumoniae*, de 0,28 à 0,33 pour l'association *Candida albicans*(3)/*P.*

mirabilis et de 0,3 à 0,34 pour l'association *Candida albicans*(4)/*A. baumannii* lorsqu'il est supplémenté de 2% de glucose.

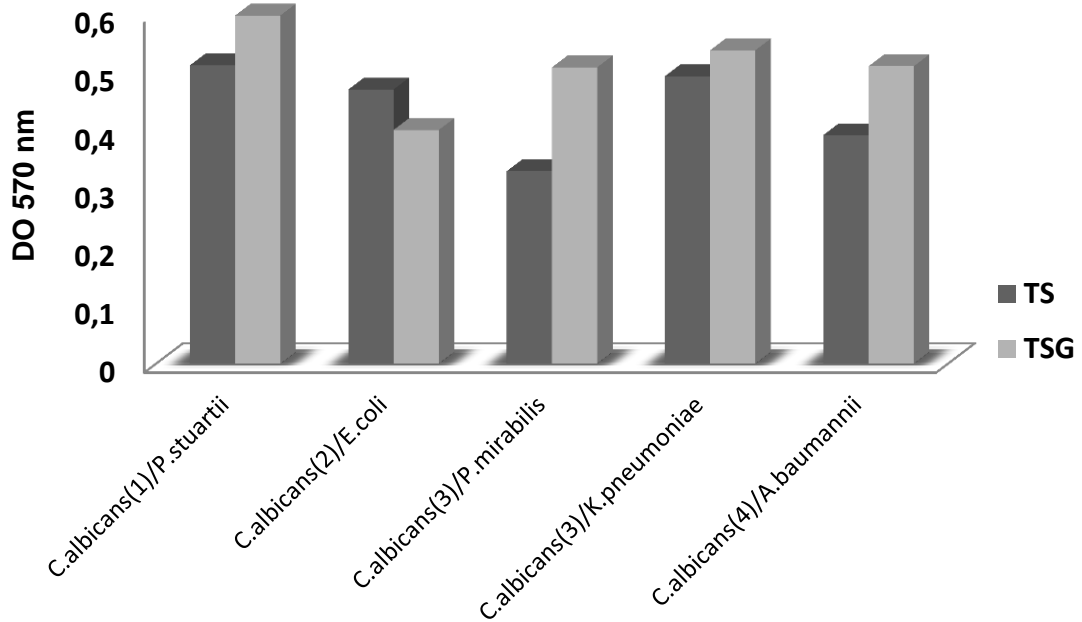


Figure N°3 : Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu trypticase soja.

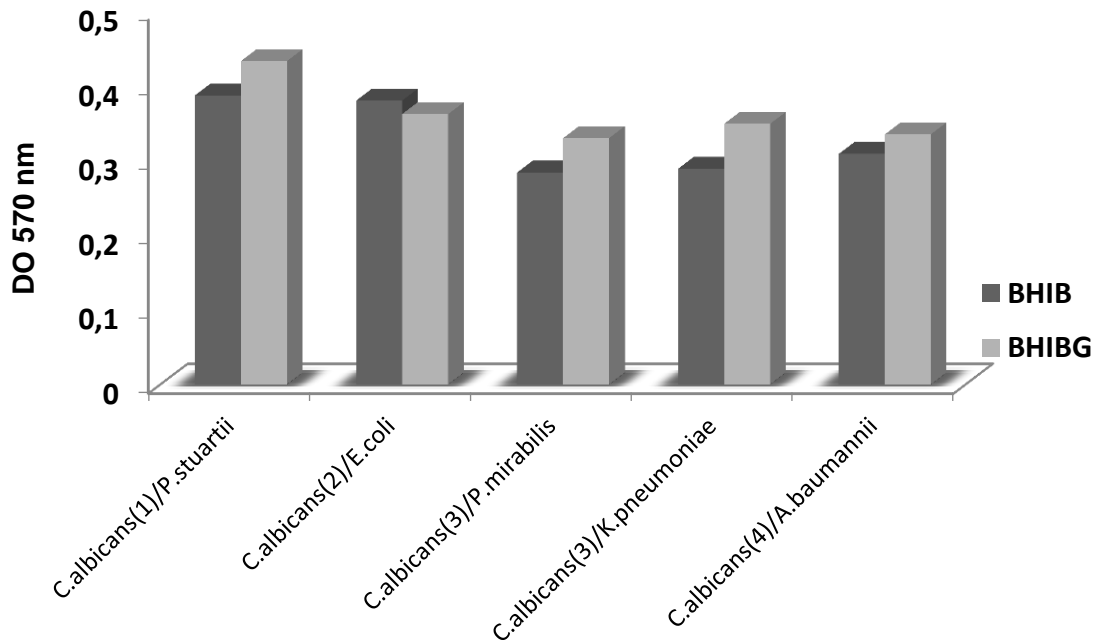


Figure N°4 : Effet du glucose sur la formation des biofilms mixtes sur milieu BHIB

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui ont montré que *Candida albicans* forme plus de biofilms en présence d'une source importante en carbone (**Suma et coll., 2016**).

De plus, **Moryl et ses collaborateurs (2013)** ont démontré que la composition et la quantité de la matrice polysaccharidique d'un biofilm, dépendent d'une source de carbone comme le glucose, mais peuvent également empêcher l'adhésion par l'occupation des sites d'adhésion des levures.

En revanche, pour l'association *Candida albicans* (1)/*Escherichia coli*, l'addition de 2% de glucose aux deux milieux de culture n'induit aucune augmentation de la biomasse du biofilm. Ce résultat corrobore les travaux de **Hancock et ses collaborateurs (2011)** qui ont montré que les souches d'*E. coli* répondent différemment aux changements de conditions de croissance lors de la formation de biofilms.

4. Effet du pH du milieu de culture additionné de glucose sur la formation des biofilms mixtes

Les résultats relatifs à l'effet du pH des milieux de culture additionnés de glucose utilisés pour la formation du biofilms mixtes sont présentés sur les **figures N°5** et **N°6**.

Il ressort de ces figures que la supplémentation du milieu de culture de 2% de glucose, induit une baisse du pH, qui devient favorable pour la croissance des levures. Cette interaction avantageuse peut être expliquée par la capacité de la levure à métaboliser le glucose, et à modifier le pH du milieu (**Romano et Kolter, 2005**). De plus, **Boonyanit et ses collaborateurs en (2011)**, ont montré que les levures du genre *Candida* peuvent produire des acides par fermentation du glucose, ce qui entraîne une acidification des milieux de culture.

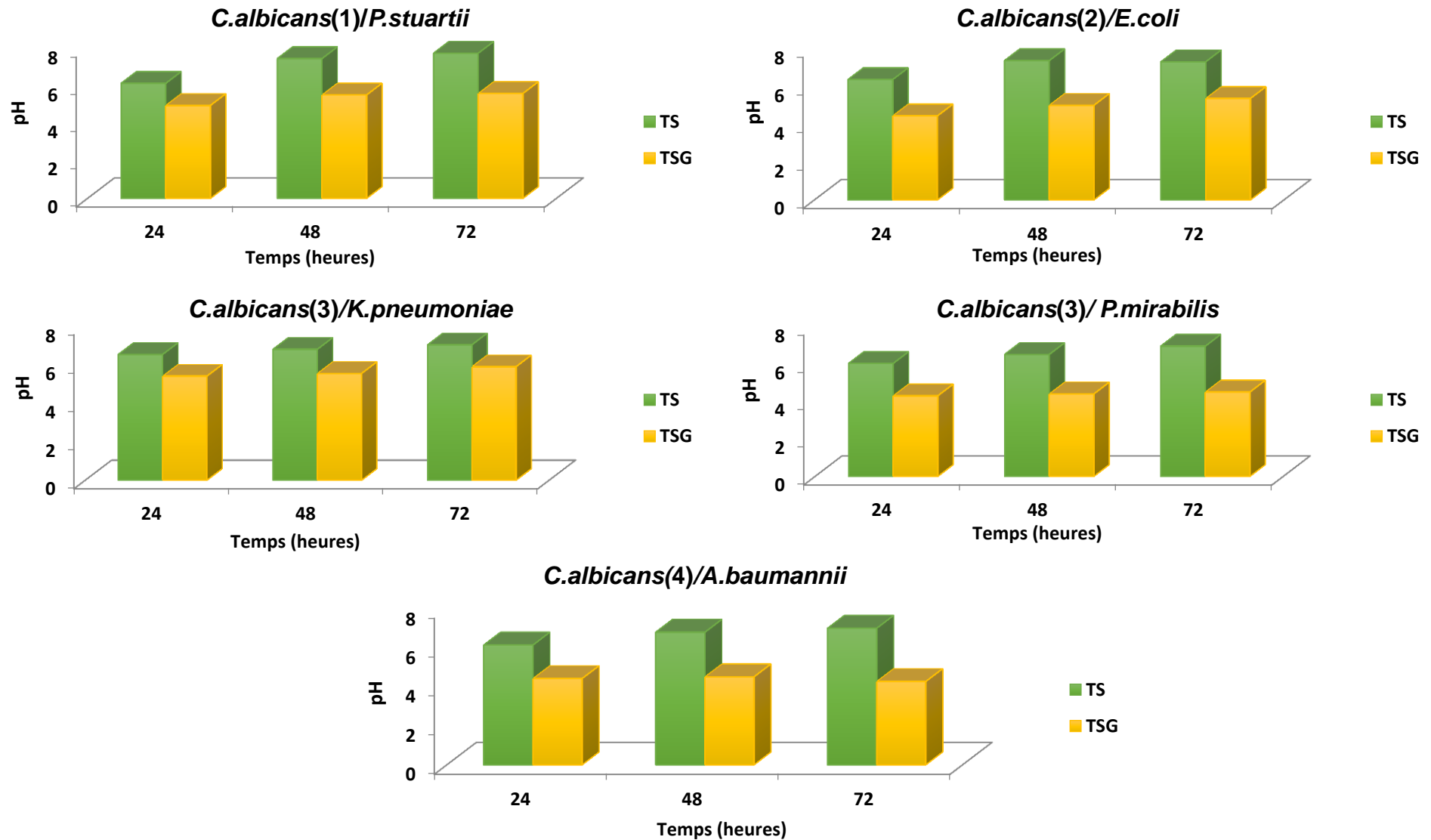


Figure N°5 : Variation du pH du milieu de culture Trypticase soja en présence et en absence de glucose au cours de la formation des biofilms mixtes.

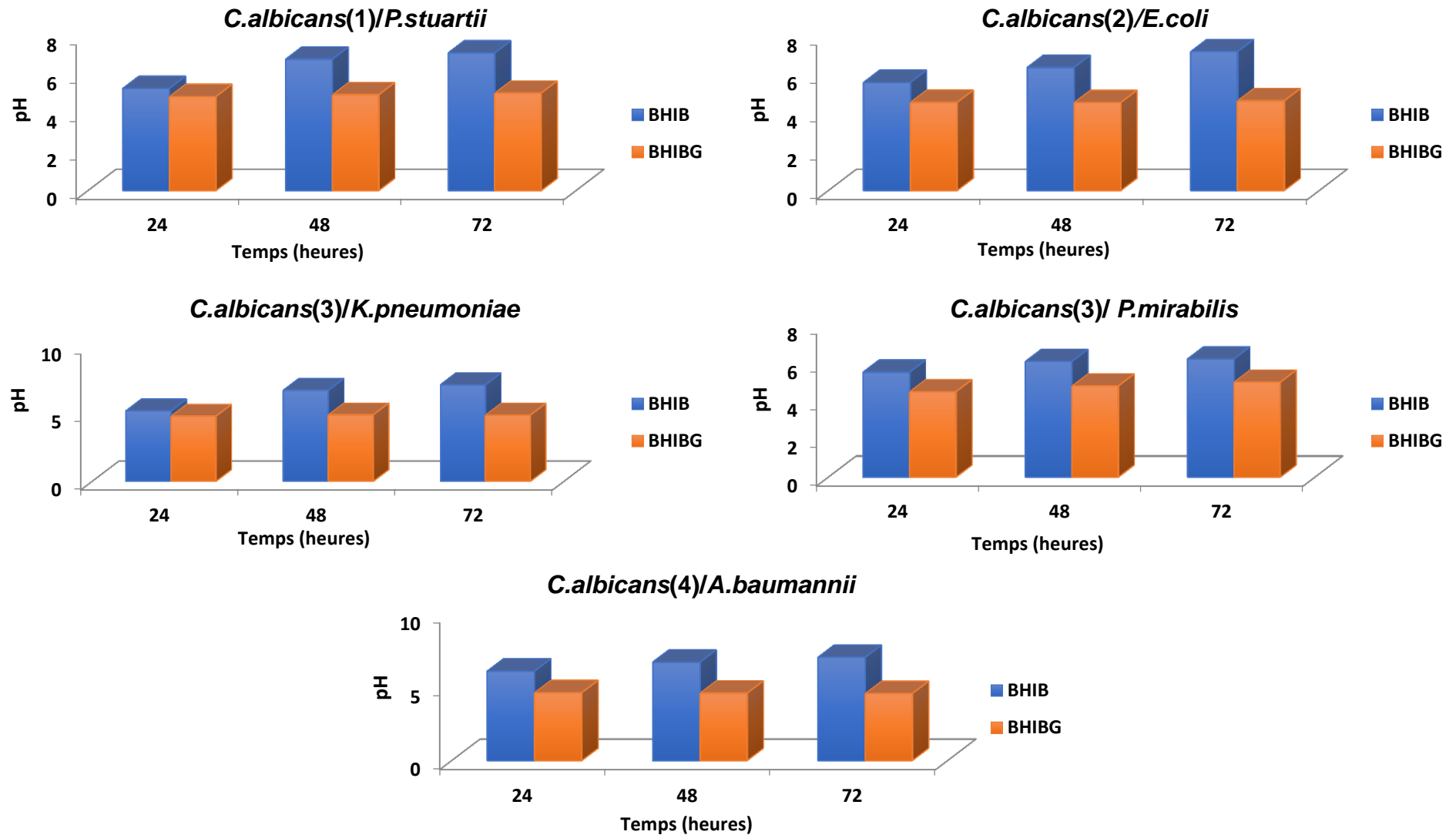


Figure N°6 : Variation du pH de milieu de culture BHIB en présence et en absence de glucose au cours de la formation des biofilms mixtes.

Quatrième partie

Conclusion générale

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'effet du milieu de culture et du pH sur la formation des biofilms mixtes *Candida albicans*/bactéries Gram négatives isolés des dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen.

Il ressort de ce travail que :

- Les isolats de *Candida albicans*, ont le pouvoir de former des biofilms mixtes avec les bactéries. La quantité des biofilms produite varie en fonction des espèces, de la composition du milieu de culture et de son pH.
- Une compétition a été observée entre levures et bactéries formant les biofilms mixtes dont la composition du milieu et le pH jouent un rôle en favorisant la dominance de l'un sur l'autre.
- L'addition de 2% de glucose aux milieux Trypticase soja et BHIB induit une augmentation de la biomasse pour toutes les associations.

Pour compléter cette étude, il serait souhaitable d' :

- Etudier le pouvoir de formation des biofilms mixtes par plusieurs espèces bactériennes et fongiques, dans différentes conditions physico-chimiques.
- Evaluer le potentiel de ces souches à former des biofilms mixtes à différentes forces ioniques du pH du milieu de culture.

Cinquième partie
Références bibliographiques

1. Baillif S., Hartmann D., Freney D. and Kodjikian L. (2006) Intraocular lens and bacterial adhesion: Influence of the environmental factors, the characteristics of the bacteria, and the target material surface. *Journal Français d'Ophtalmologie* Volume 33, n° 3 pages 210-221
2. Boonyanit T., Sroisiri T. and Doan M. (2011) Fermentation of various sugars and sugar substitutes by oral microorganism. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; S258-S260.
3. Boutaleb N. (2007) Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
4. Bueno J. (2014) Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism. *J Microbial Biochem Technol.* S3: 004.
5. Buu L.M. and Chen Y.C. (2014) Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Journal of Biomedical Science*; 21:22.
6. Cavalcanti Y., Morse D., Silva D., Antoninha A., Cury D., Wei X., Wilson M., Milward P., Lewis M., Bradshaw D. and Williams D. (2015) Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research.* Vol.31, No.1, 27 38.
7. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. and Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
8. Clinton K., Duane R., Miriam L., Karon L. and Lynn L. (2006) Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium chromagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* ; 5: 1.
9. Cutler J.E., Brawner D.L., Hazen K.C. and Jutila M.A. (1990) Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. *Infection and immunity*, 58(6), 1902-1908.
10. De Chalvet De Rochemonteix A. (2009) Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.

11. Diana K. and Deborah A. (2010) *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *Us national library of medicine national institutes of health* , V 6(4): e1000886.
12. Fletcher M. (1988) Attachment of *pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, 170: 2027-2030.
13. Florence E., Bernard P. and Brigitte (2010) Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs; *Revue Francophones des laboratoires*:52-57.
14. Hamadi N., Swaminathan S. and Chen X. (2004) Adsorption of paraquat dichloride from aqueous solution by activated carbon derived from used tires. *Journal of hazardous materials*, 112(1--2): 133--141.
15. Hall-Stoodley L., Costerton JW. and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infection diseases. *Nat Rev Microbiol*; 2:95-108.
16. Hancock V., Witso I.L. and Klemm P. (2011) Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol.*;301:570–576.
17. Holmes A.R., Van der Wieien P., Cannon R.D., Ruske D. and Dawes P. (2006) *Candida albicans* binds to saliva proteins selective lyad sorbed to silicone. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 102: 488–494.
18. Ibarra-Trujillo C., Villar-Vidal M., Gaitán-Cepeda L.A., Pozos-Guillen A., Mendoza and Sánchez-Vargas L.O. (2012) Formation and quantification assay of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Mixed Biofilm. *Rev Iberoam Micol* 29 (4), 214-222.
19. Kibber C. (2007) Évolution de l'épidémiologie des candidoses et aspergilloses invasives. *Médecine et maladies infectieuses*, 37:2-4.
20. Klotz S.A., Rutten M.J., Smith R.L., Babcock S.R., et Cunningham M.D. (1993). Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microbial pathogenesis*, 14(2), 133-147.
21. Klotz S.A., Chasin B., Powell B., Gaur N. and Lipke P. (2007) Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(4), 401-406.

22. Kokare CR., Chakraborty S., Khopade AN. And Mahadik K.R. (2009) Biofilm: Importance and applications. *Indian J Biotechnol* 8:159–168.
23. Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*, 70(2), 878-888.
24. Kumamoto C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 608-611.
25. Lebeaux D., Ghigo J. and Beloin C. (2014) Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti infectieux*. 50, 415-318
26. León-Romero A., Domínguez-Manzano J., Garrido-Fernández A., Arroyo-López F. and Jiménez-Díaz R. (2015) Assessment of *in vitro* mixed-species biofilm formation between *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(1), 895-778
27. Lynch A.S. and Robertson G.T. (2008) Bacterial and fungal biofilms infections. *Annual Review of Medicine*, 59, 415-428.
28. Méar Jean-Baptiste (2014) Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II.
29. Moryl M., Torzewska A., Jałmużna P. and Różalski A. (2013) Analysis of *Proteus mirabilis* distribution in multi-species biofilms on urinary catheters and determination of bacteria resistance to antimicrobial agents. *Pol J Microbiol* 62: 377–384
30. Organisation Mondiale de la Santé (2013). *The burden of health care-associated infection worldwide*.
31. Pfaller M., Chaturvedi V., Diekema D., Ghannoum M., Holliday N. and Killian S. (2008) Clinical evaluation of the sensititre yeast one colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandin anidula fungin, caspofungin, and micafungin. *Journal of clinical microbiology*, 46(7), 2155-2159.
32. Pierce C., Uppuluri P., Tristan A., Wormeley F., Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J. (2008) A simple and reproducible 96-Well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*; 3 (9): 1494—1500.

33. Pruitt B.A., McManus A.T., Kim S.H. and Goodwin C.W. (1998) Burwound infections: current status. *World journal of surgery*, 22(2), 135-145.
34. Romano J.D. and Kolter R. (2005) *Pseudomonas–Saccharomyces* interactions: influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *Journal of Bacteriology*, 187: 940–948.
35. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Sari-Belkharroubi L. and Anselme-Bertrand I. (2015) Evaluation of mixed biofilm formation between *Candida albicans* and a variety of bacterial species isolated from peripheral catheters at Tlemcen CHU. *Journal de Mycologie Médicale, Masson*.V25, 2,123-129.
36. Sobel J., Myers P., Kaye D. and Levison M. (1981) Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 143(1), 76-82.
37. Suma C., Pemmaraju., Parul A. and Pruthi R. (2016) Modulation of *Candida albicans* biofilm by different carbon sources. *Mycopathologia* DOI 10.1007/s11046-016-9992-8
38. Sutherland I.W. (2001) The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
39. Thein Z.M., Seneviratne C.J., Samaranayake Y.H. and Samaranayake L.P. (2009) Community life style of *Candida* in mixed biofilms : a mini review. *Mycoses*, 52(6), 467-475.
40. Wagner G. and Ottesen B. (1982) Vaginal physiology during menstruation. *Annals of internal medicine*, 96(6-Part-2), 921-923.
41. Wargo M.J. and Hogan D.A. (2006) Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 359-364.
42. Yang Y.L. (2003) Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 36(4), 223-228.