

*Je remercie Allah le tout puissant pour la patience qu'il m'a
donné pour effectuer ce travail et atteindre mon objectif*

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes très chers parents,

A mes très chères sœurs Ikram et Ismahene

A mon épouse Mohammed qui m'a beaucoup soutenu pendant ces années d'étude,

A mes enfants Rassim et Razane,

A mes nièces Lytia et Ghizlane

A mon grand-père pour ses prières,

A mes beaux-parents, mes beaux-frères et mes belles-sœurs,

A mes cousins et cousines, A mes amis.....

Mes remerciements vont également à Monsieur Seghir Abdelfettah Maître de conférences A à l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen pour son aide très précieuse, son soutien et sa disponibilité .je le remercie aussi pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie particulièrement Monsieur Sameh Solimen, Professeur à l'université de Sharjah de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci de toute l'aide que vous avez apportée à la thèse, de votre disponibilité et gentillesse et de vos conseils pertinents.

Mes remerciements s'adressent également à madame Kazi Tani-Baba Ahmed Zakia Zahira, Maître de conférences A au département de biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, Directrice du laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologiques », pour son aide précieuse lors de l'identification des bactéries, pour sa sympathie et ses conseils très précieux. Qu'elle soit assurée de ma sincère et profonde reconnaissance.

Merci à tous les doctorants, les techniciens et les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé mon quotidien pour leur soutien à toute épreuve. Merci pour l'amitié, les moments agréables que nous avons passé et surtout l'encouragement que vous m'avez apporté durant les moments difficiles de la thèse.

Je remercie également les chefs des services d'anesthésie-réanimation, de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale ainsi que l'ensemble du personnel pour leur aide et leur collaboration.

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie: Démarche expérimentale	13
Chapitre 1 : Recherche des altérations mixtes <i>Candida albicans</i>/bactéries dans les dispositifs médicaux aux services d'anesthésie-réanimation, de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale du CHU de Tlemcen	14
1. Collecte des dispositifs médicaux	14
2. Etude de l'infectivité des dispositifs médicaux	14
3. Isolement, purification et identification des microorganismes	15
4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des souches de <i>Candida albicans</i> en mode planctonique	15
5. Antibiogramme des bactéries co-isolées avec <i>Candida albicans</i>	16
Chapitre 2 : Evaluation du potentiel de <i>Candida albicans</i> et des bactéries co-isolées d'un même dispositif médical à former des biofilms mono-et multi-espèces	17
1. Détermination des CMI de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	17
1.1. Préparation de l'inoculum	17
1.2. Préparation du XTT et de la ménadionne	17
1.3. Formation des biofilms	18
1.4. Test de réduction du tétrazolium	18
2. Evaluation de l'activité métabolique de <i>Candida albicans</i> co-isolée avec les bactéries.....	18
3. Formation <i>in vitro</i> des biofilms multi-espèces (<i>Candida albicans</i> /bactéries).....	19
Chapitre 3 : Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces	19
1. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono-espèces formés par <i>Candida albicans</i> par des combinaisons d'antifongiques	19
2. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces formés par des terpénoïdes exogènes et endogènes seuls et combinés.....	20
2.1. Terpénoïdes seuls.....	21
2.2. Terpénoïdes combinés.....	21
3. Étude statistique	21
Troisième partie : Résultats et discussion	22
Chapitre 1 : Etude des différents types d'infectivités des dispositifs médicaux et identification des microorganismes co-isolés	24

1. Altération des dispositifs médicaux.....	24
2. Détermination des différents types d'infectivités des dispositifs médicaux	26
2.1. Infectivité et nature du dispositif médical.....	29
2.2. Infectivité et durée du cathétérisme.....	30
2.3. Infectivité et antibiothérapie	31
2.4. Infectivité et âge des patients	32
3. Identification des microorganismes.....	32
3.1. Identification des levures	33
3.2. Identification des bactéries	33
3.3. Identification et infectivités des associations <i>Candida albicans</i> /bactéries	34
4. Etude du profil de résistance des souches de <i>Candida albicans</i> et des bactéries co-isolées d'un même dispositif médical	38
4.1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques de <i>Candida albicans</i>	38
4.2. Antibiogramme des bactéries co-isolées avec <i>Candida albicans</i>	39
Chapitre2 : Formation des biofilms mono-et multi-espèces par <i>Candida albicans</i> et les bactéries co-isolées d'un même dispositif médical	43
1. Formation des biofilms fongiques mono-espèces de <i>Candida albicans</i>	43
1.1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	43
1.2. Activité métabolique des biofilms mono-espèces	45
2. Activité métabolique des biofilms multi-espèces (<i>Candida albicans</i> /bactéries)	46
Chapitre3 : Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces	49
1. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono-espèces formés par <i>Candida albicans</i> par des combinaisons d'antifongiques	49
1.1. Amphotéricine B/Caspofungine	49
1.2. Amphotéricine B/Voriconazole.....	50
2. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces par des terpénoïdes endogènes et exogènes	51
2.1. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces par des terpénoïdes seuls.....	52
2.1.1. Terpénoïde endogène	52
a. Farnésol	52
2.1.2. Terpénoïdes exogènes	55

a. Carvacrol	55
b. Cuminaldéhyde	58
2.2. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces par les associations de terpénoïdes	61
2.2.1. Farnésol/Carvacrol.....	61
2.2.2. Farnésol/Cuminaldéhyde.....	63
2.2.3. Carvacrol/cuminaldéhyde	65
Quatrième partie : Conclusion générale.....	67
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	72
Annexes.....	85

Liste des figures

Figure n°1 : Représentation schématique des différentes formes de <i>C. albicans</i> (Arnaud et coll., 2009)	3
Figure n°2 : Etapes de formation d'un biofilm de <i>C. albicans</i> (Gulati et Nobile 2016) ..	4
Figure n°3 : Effet des molécules du quorum sensing sur la transition dimorphique chez <i>Candida albicans</i> (Rodrigues et Cernáková, 2020)	7
Figure n°4 : Vue générale de la résistance des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> aux différentes classes d'antifongiques (Lohse, 2017)	8
Figure n°5 : Différents types d'infectivités des dispositifs médicaux prélevés du CHU de Tlemcen selon l'origine de l'altération.....	28
Figure n°6 : Répartition des types d'infectivités en fonction de la durée de pose.....	30
Figure n°7 : Effet de l'antibiothérapie sur les différents types d'infectivités	31
Figure n°8 : Répartition des différents types d'infectivités en fonction de l'âge des patients.....	32
Figure n°9 : Identification des bactéries co-isolées avec <i>Candida albicans</i> d'un même dispositif médical.	34
Figure n°10 : Répartition des associations <i>Candida albicans</i> /bactéries par service du CHU de Tlemcen	35
Figure n°11 : Répartition des associations <i>Candida albicans</i> /bactéries selon le type d'infectivité au service d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen	36
Figure n°12 : Infectivités à <i>Candida albicans</i> /bactéries et nature des dispositifs médicaux au service d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen	37
Figure n°13 : CMI de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	44
Figure n°14 : Activité métabolique des souches de <i>Candida albicans</i> obtenue par réduction du XTT après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C.	45
Figure n°15 : Activités métaboliques des différentes associations de <i>Candida albicans</i> /bactéries obtenus par réduction du XTT après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C	47
Figure n°16 : Taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le farnésol au cours des trois phases de leur développement.....	53
Figure n°17 : Taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le carvacrol au cours des trois phases de leur formation.....	56

Figure n°18 : Taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le cuminaldéhyde au cours des trois phases de leur développement..... 59

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Répartition des prélèvements par service et par type de dispositif médical.....	24
Tableau n°2 : Répartition des prélèvements positifs par service selon l'origine de l'altération.....	25
Tableau n°3 : Différents types d'infectivités des dispositifs médicaux par service	26
Tableau n°4 : Répartition des différents types d'infectivités en fonction de la nature des dispositifs médicaux.....	29
Tableau n°5 : CMI de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des souches de <i>Candida albicans</i> co-isolées avec les bactéries (CLSI, 2008). ..	38
Tableau n°6 : Antibiogramme des bactéries à Gram négatif co-isolées avec <i>Candida albicans</i>	40
Tableau n°7 : Antibiogramme des bactéries à Gram positif co-isolées avec <i>Candida albicans</i>	42
Tableau n°8 : CMI et FICI de l'amphotéricine B associée à la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	49
Tableau n°9 : CMI et FICI de l'amphotéricine B associée au voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	51
Tableau n°10 : CMI et FICI du farnésol associé au carvacrol vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	61
Tableau n°11 : CMI et FICI du farnésol associé au carvacrol vis-à-vis des biofilms mixtes de <i>Candida albicans</i> /bactéries	63
Tableau n°12 : CMI et FICI de l'association farnésol/cuminaldéhyde vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	64
Tableau n°13 : CMI et FICI du farnésol associé au cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes de <i>Candida albicans</i> /bactéries	64
Tableau n°14 : CMI et FICI du carvacrol associé au cuminaldéhyde vis-à-vis des cellules sessiles de <i>Candida albicans</i>	65
Tableau n°15 : CMI et FICI du carvacrol associé au cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes de <i>Candida albicans</i> /bactéries	66

Liste des photos

- Photo n°01 : Biofilm de *Candida albicans* formé sur la surface interne d'un cathéter veineux central. Grossissement : (A) × 450 ; (B) × 1100 ; (C) × 4500 (**Seddiki et coll., 2013**).....5
- Photo n°02 : Effet inhibiteur du farnésol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 5. (A) Biofilm non traité (contrôle). (B) Biofilm traité avec 6mM de farnésol.....54
- Photo n°03 : Effet inhibiteur du carvacrol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 5. (A) Biofilm non traité (contrôle). (B) Biofilm traité avec le carvacrol à 2xCMI.....58
- Photo n°04 : Effet inhibiteur du cuminaldéhyde sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 6. (A) Biofilm non traité (contrôle). (B) Biofilm traité avec le cuminaldéhyde à 2xCMI.....60
- Photo n°05 : Effet inhibiteur de l'association farnésol/carvacrol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 10. (A) Biofilm non traité (contrôle). (B) Biofilm traité avec 1,5mM/1,7mM de la combinaison farnésol/carvacrol.....62

Liste des abréviations

AmB : Amphotéricine B

ANOVA : Analysis of variance

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

CASFM : Comité d'Antibiogramme- Société Française de Microbiologie

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CSP : Caspofungine

CVC : Cathéters veineux centraux

CVP : Cathéters veineux périphériques

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

FICI : Indices des Concentrations Inhibitrices Fractionnaires

MO : Matériels d'ostéosynthèse

PBS : *Phosphate-buffered saline*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SCMI : Concentration Minimale Inhibitrice Sessile

SV : Sonde vésicale

VOR : Voriconazole

XTT : 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5 [(phenylamino) carbonyl]-2-tetrazolium hydroxid

Première partie

Synthèse bibliographique

Dans un environnement naturel, les microorganismes se développent sous deux formes, une forme libre ou planctonique et une forme sessile ou en biofilm attachés à un support. La forme planctonique ne serait qu'une étape transitoire avant la colonisation des surfaces. En effet, en se fixant sur une surface de façon irréversible, les microorganismes peuvent adopter une forme de vie sessile ou en biofilm. Ce mode de vie universel ubiquitaire confère aux micro-organismes de nombreux avantages, notamment la colonisation et la survie **(Rodrigues et Cernáková 2020)**.

Selon **Donlan et Costerton (2002)**, un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules adhérentes de manière irréversible à un substrat, une interface ou entre elles, enrobées d'une matrice de substances polymériques extracellulaires auto secrétée.

En raison de leur nature ubiquitaire, les biofilms sont difficiles à éradiquer. De plus, l'augmentation de l'usage des implants médicaux tels que les prothèses, les tubes endo-trachéaux, les pacemakers, ou encore les cathéters sont autant de supports pour la colonisation et la formation de biofilms ce qui constitue un sérieux problème de santé publique. Selon l'institut national de la santé (NIH) américain, les biofilms sont impliqués dans 80% dans les infections associées aux soins **[(Gulati et coll., 2016) ; (Iohse et coll., 2018) ; (Cepas et coll., 2019)]**.

Une fois attachés entre eux et/ou à une interface, les microorganismes se développent et produisent des polymères extracellulaires, formant une matrice à forte teneur en eau, en protéines, en polysaccharides et en lipides. La proximité entre microorganismes au sein de la matrice leur permet de réaliser des échanges de signaux et de nutriments. Cet ensemble complexe forme le biofilm et confère aux microorganismes une protection contre un certain nombre de stress environnementaux tels que la dessiccation ou l'action d'agents antimicrobiens **(Cepas et coll., 2019)**.

Les levures associées à ce type d'infections appartiennent au genre *Candida*. Elles sont responsables de 80% d'infections fongiques ou candidoses invasives chez l'homme **(Revankar S.G. 2021)**.

Les candidoses invasives qui englobent les candidémies et les affections viscérales profondes résultant d'une dissémination hématogène ou de l'inoculation directe d'un *Candida sp.* dans un site stérile, représentent la première cause des infections fongiques invasives **(Kullberg et Arendrup, 2015)**.

Actuellement, les candidoses invasives constituent un problème majeur de santé publique de par le monde. Elles représentent jusqu'à 5,6-10% des septicémies nosocomiales et sont associées à un taux de mortalité de 40%, une augmentation de la durée du séjour et du coût d'hospitalisation **(Revankar S.G. 2021)**.

Parmi le genre *Candida*, 54,3% des infections sont dues à l'espèce *albicans*, 16,4% à l'espèce *glabrata*, 14,9% à l'espèce *parapsilosis*, 8,2% à l'espèce *tropicalis*, et 1,6% à l'espèce *krusei*. En effet, *Candida albicans* reste l'espèce la plus rencontrée dans les isolats cliniques et la plus fréquemment isolée des dispositifs médicaux, notamment des cathéters veineux centraux et urinaires, des stimulateurs cardiaques, des lentilles de contact et des prothèses articulaires **(Jung et coll., 2020)**. Elle est incriminée dans 40% de septicémie en milieu hospitalier avec un taux de mortalité allant de 40 à 50% **[(Gunsalus et coll., 2016) ; (Íñigo et coll., 2018)]**.

Candida albicans fait partie de la microflore endogène vaginale et oro-gastrointestinale de l'humain et de nombreuses espèces animales **(Odds, 1988)**. Elle est détectée chez au moins 70% de la population humaine saine **(Pappas et coll., 2018)**.

Il s'agit d'une levure polymorphe opportuniste, qui possède des mécanismes d'adaptation complexes, lui permettant de survivre dans diverses conditions environnantes et de causer une grande variété d'infections : superficielles (candidoses mucocutanées) ou profondes (candidoses systémiques, souvent mortelles) **(Alvarez-Rueda et coll., 2020)**.

Normalement, un équilibre existe entre l'hôte et la microflore endogène, favorisant l'état commensal de *Candida albicans*. Cependant, certains facteurs exogènes (pression de sélection par les antibiotiques et les antifongiques, immunosuppression pathologique ou thérapeutique ...) ou la rupture des barrières cutané-muqueuses (brûlure, cathéters, ...) contribuent à dévoiler son caractère pathogène opportuniste.

Une caractéristique importante de cette levure est sa capacité à croître sous plusieurs formes morphologiques, levure (blastospore), filamenteuse (hyphe et pseudohyphe).

Cette diversité morphologique est considérée comme étant une stratégie de survie, permettant sa croissance et sa dissémination dans l'hôte (**Desai 2018**) (**Figure n°01**).

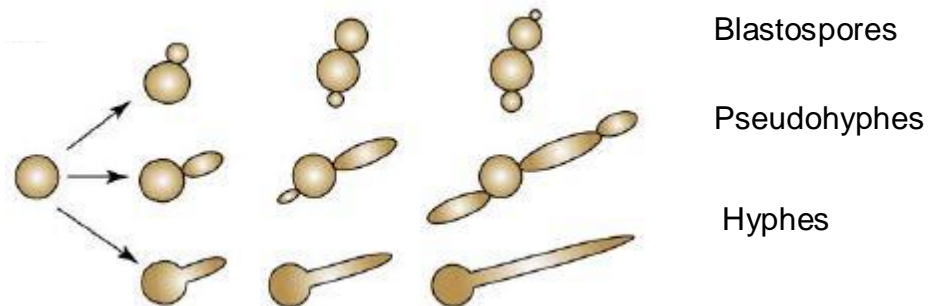


Figure n°01 : Représentation schématique des différentes formes de *C. albicans* (**Arnaud et coll., 2009**)

Les blastospores, les hyphes et les pseudohyphes sont les formes les plus fréquemment rencontrées. Elles coexistent souvent dans les cultures végétatives et dans les foyers infectieux (**Sudbery et coll., 2004**). De plus, en réponse aux signaux externes, ce pathogène est capable de commuter rapidement et de manière réversible entre la forme blastospore, hyphe et pseudohyphe (**Whiteway et Bachewich, 2007**).

La conversion morphogénétique de *Candida albicans* ou sa capacité à pouvoir switcher de la forme levure à la forme filament est un élément pivot dans le processus de formation des biofilms (**Hawser et Douglas, 1994**).

Le biofilm de *Candida albicans* présente la particularité d'être composé d'un mélange des formes morphologiques dans les microcolonies. Son développement dure environ 24 à 48 heures et suit les étapes classiques illustrées dans la **figure n°02**.

Tout d'abord, une phase d'adhésion initialement réversible où les levures adhèrent à un substrat. Cette étape est influencée par les conditions environnementales du milieu (pH, température, force ionique, vitesse d'écoulement du milieu) et aussi par la rugosité de la surface ou encore l'hydrophobicité des microorganismes. Cette étape est suivie par une adhésion irréversible qui va permettre aux blastospores de se fixer au substrat et former une couche basale. Cette étape fait intervenir des interactions

de type ligands/récepteurs qui impliquent notamment les adhésines de surface. Le contact avec la surface conduit à une phase de maturation du biofilm (après 3 à 6 heures suivant l'attachement). Au cours de cette phase, la production de la matrice exopolymérique est initiée et la morphogénèse est déclenchée induisant ainsi la formation d'une deuxième couche, constituée principalement d'hyphes et de pseudohyphes. Des canaux se développent au sein de la matrice exopolymérique permettant l'approvisionnement en oxygène et en nutriments des microorganismes. Enfin, vient l'étape de dispersion du biofilm où les levures sont libérées, entraînant la colonisation de nouveaux sites et le renouvellement du cycle (**Blackman et coll., 2021**).

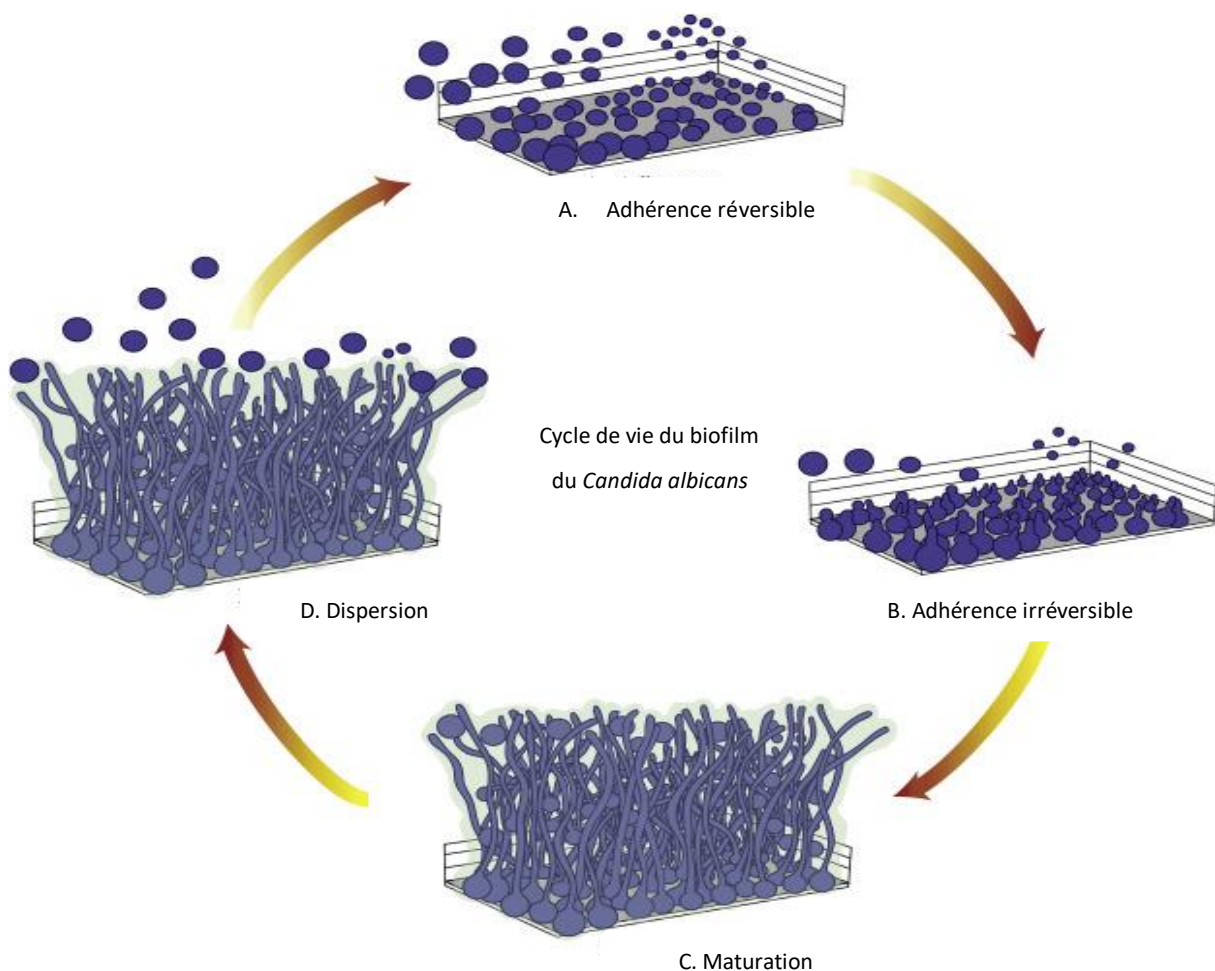


Figure n°02 : Etapes de formation d'un biofilm de *C. albicans* (**Gulati et Nobile 2016**).

Les biofilms matures de *Candida albicans* présentent une structure tridimensionnelle hétérogène, bi-phasique formée d'une couche basale de blastospores épaisse, recouverte d'une couche d'épaisseur variable constituée essentiellement de formes filamenteuses et d'une matrice extracellulaire traversée par des canaux d'eau entourant les microcolonies (**Photo n°01**).

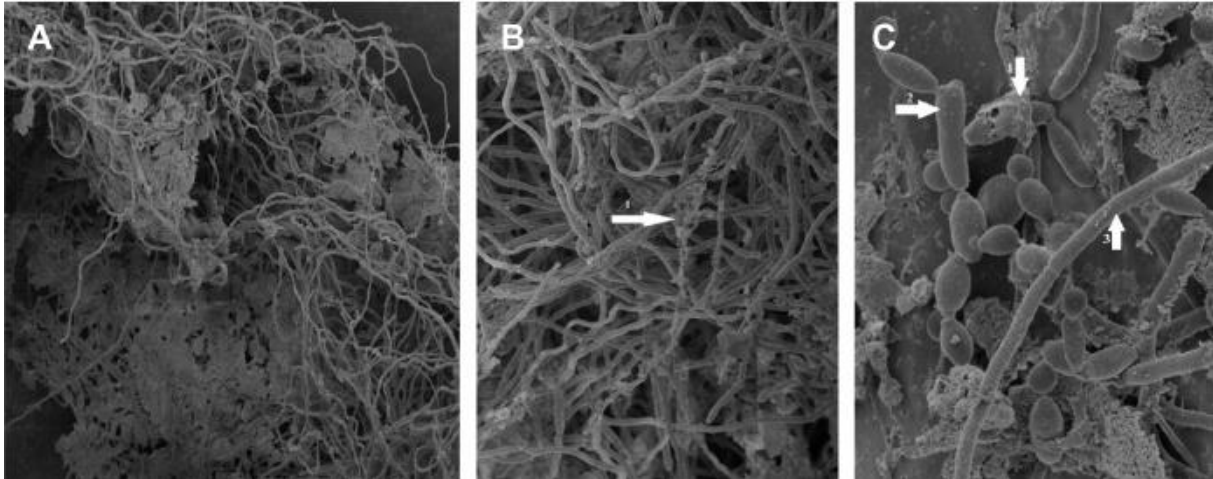


Photo n°01 : Biofilm de *Candida albicans* formé sur la surface interne d'un cathéter veineux central. Grossissement : (A) $\times 450$; (B) $\times 1100$; (C) $\times 4500$.

Flèches 1 = matrice extracellulaire ; 2 = pseudohyphe ; 3 = hyphe (**Seddiki et coll., 2013**).

La proportion des blastospores et des formes filamenteuses dans les microcolonies est très adaptative et varie en fonction de la composition du milieu, de la souche, de la température et de la nature du substrat. Néanmoins, la présence des hyphes est nécessaire pour le développement normal du biofilm de *Candida albicans* (**Fernandes et coll., 2016**).

La quantité de matrice exopolymérique produite est également influencée par les conditions de culture. Les biofilms incubés sans agitation ont une matrice peu élaborée, tandis que ceux incubés avec agitation produisent des quantités importantes de matrice (**Weber et coll., 2008**).

La matrice extracellulaire des biofilms de *Candida albicans* est constituée essentiellement de (glyco) protéines (55%), de (mono / poly) saccharides (25%), de (glyco) lipides (15%), d'acides nucléiques (5%), d'eau et de minéraux. Elle assure une stabilité mécanique au biofilm et protège les cellules sessiles des dommages physiques. Elle constitue une source de nutriments et sert de barrière contre la

reconnaissance des pathogènes par le système immunitaire de l'hôte [(Mitchell et coll., 2016) ; (Pierce et coll., 2017)].

La matrice exopolymérique offre également une niche écologique protégée, contribuant à la survie des microorganismes et aux échanges moléculaires (Santos et coll., 2018).

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing, matérialisés par des signaux entre les cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes dans le biofilm. On parle de mécanismes de perception de densité cellulaire qui sont basés sur le principe de masse critique (Tomlin et coll. 2005).

Le quorum sensing est impliqué aussi dans la régulation des différentes étapes du développement du biofilm. Cette stratégie de communication empêche la surpopulation inutile et contrôle la compétition pour les nutriments en plus des implications dans le processus infectieux, en particulier pour la diffusion et la création de nouveaux sites d'infection (Hornby et coll., 2001).

Le quorum sensing a été principalement étudié chez les procaryotes, toutefois, certaines données existent chez *Candida albicans* qui reste le modèle d'étude eucaryote.

Deux molécules du quorum sensing sont principalement impliquées dans le développement et la dispersion du biofilm de *Candida albicans*, le farnésol et le tyrosol [(Alem et coll., 2006) ; (Ghosh et coll., 2008)].

Le farnésol (3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatriène-1-ol), qui inhibe la formation des hyphes et par conséquent celle du biofilm dans ses premières étapes d'adhérence mais ne peut pas interrompre l'élongation d'hyphes préexistants. Le farnésol s'accumule dans le surnageant des biofilms matures favorisant ainsi le développement des blastospores et la dispersion du biofilm (Polke et coll., 2018).

Il est à noter que certaines souches de *Candida albicans* produisent aussi un analogue du farnésol moins actif, l'acide farnesoïque (Riekhof et Nickerson, 2017).

Le tyrosol (2-[4-hydroxyphényl] éthanol) a une action opposée à celle du farnésol et accélère donc le processus de filamentation dans des conditions environnementales prohyphes. Durant les premières heures de la formation du biofilm, l'activité du tyrosol est supérieure à celle du farnésol, puis la situation s'inverse après 24 heures, de façon

à favoriser la formation puis la dispersion du biofilm (**Ramage et coll., 2002**) (**Figure n°03**).

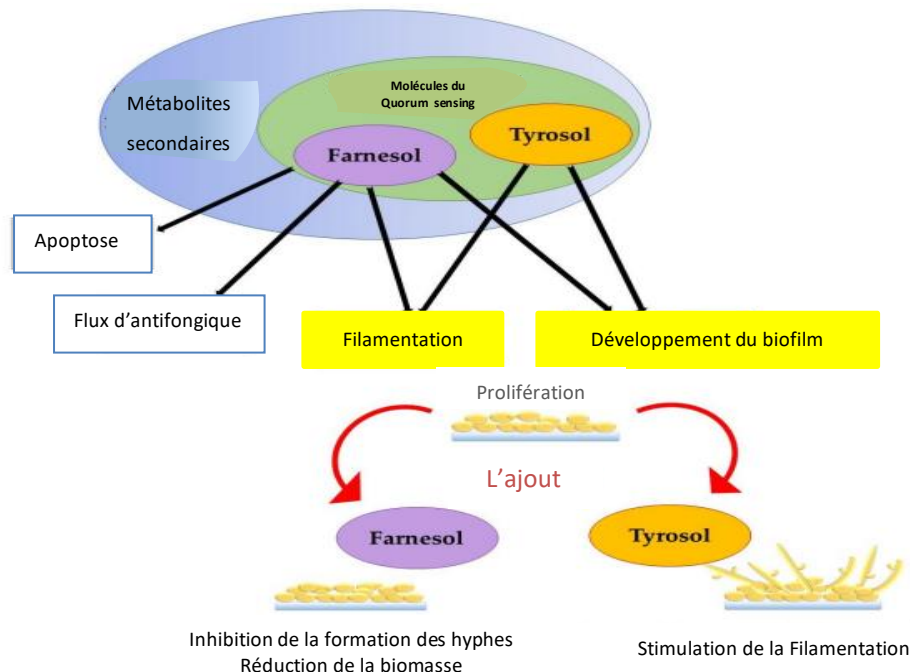


Figure n°03 : Effet des molécules du quorum sensing sur la transition dimorphique chez *Candida albicans* (**Rodrigues et Cernáková, 2020**).

Le tyrosol possède également une activité antioxydante qui protège la levure *Candida albicans* de la phagocytose par les neutrophiles.

D'autres petites molécules comme l'alcool phényléthylique, le dodécanol et le nérolidol, ont été détectées dans le surnageant du biofilm mature de *C. albicans*. Elles seraient impliquées également dans l'inhibition de la filamentation et donc favoriseraient la dispersion du biofilm (**Finkel et Mitchell, 2011**).

Une fois formés, les biofilms posent un problème majeur puisque la dose d'antifongique requise pour les éradiquer peut-être supérieure aux concentrations thérapeutiques administrables les plus élevées (**Ramage et coll., 2009**). En effet, les cellules sessiles de *Candida albicans* sont 30 à 2000 fois plus résistantes aux traitements antifongiques comparativement à leurs homologues planctoniques (**Douglas, 2003**).

Il est important de rappeler que la prise en charge des candidoses invasives repose sur l'utilisation d'antifongiques systémiques. Les levures étant des micro-organismes eucaryotes, les cibles des antifongiques doivent être spécifiques des champignons et

sont donc limitées. Même si l'arsenal antifongique s'est enrichi, il ne comprend que quatre classes d'antifongiques agissant sur trois cibles cellulaires dont les :

- **Azols** : essentiellement les triazolés qui possèdent un effet fongistatique, ils bloquent la synthèse de l'ergostérol en ciblant l'enzyme lanostérol 14 α -déméthylase (liée au gène ERG11) ce qui conduit à une accumulation d'intermédiaires de la voie des stérols toxiques.

- **Polyènes** : ils présentent un effet fongicide. Leur représentant majeur étant l'amphotéricine B. Ils s'intercalent dans des membranes contenant de l'ergostérol, engendrant un déséquilibre osmotique, ce qui entraîne la lyse cellulaire.

- **Fluoropyrimidines** : Inhibent la réplication de l'ADN et la synthèse des protéines fongiques.

- **Echinocandines** : sont des inhibiteurs non-compétitifs de la β -(1,3)-D-glucane synthase, responsable de la synthèse du β -1,3-D-glucane, composant majeur de la paroi fongique (**Silva et coll., 2017**).

La résistance des cellules au sein des biofilms est le résultat de phénomènes multifactoriels complexes ou plusieurs mécanismes ont été identifiés chez *Candida albicans* (**figure n°04**).

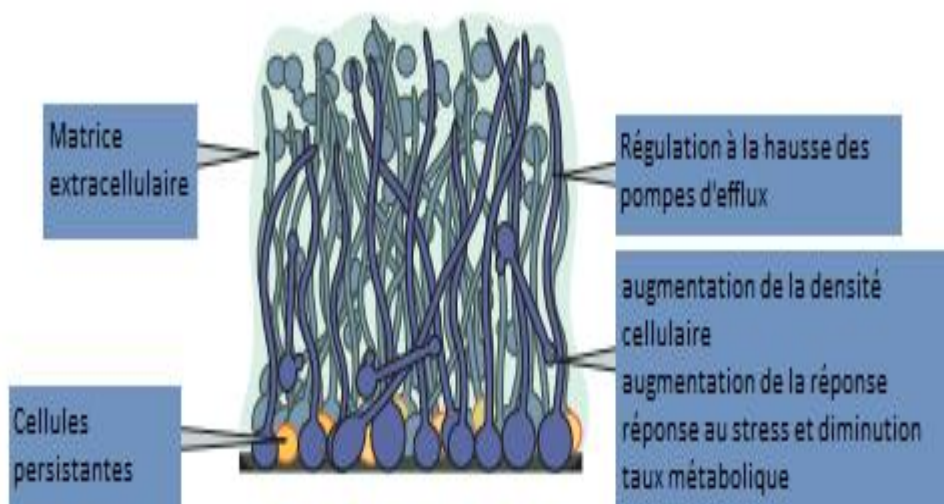


Figure n°04 : Vue générale de la résistance des cellules sessiles de *C. albicans* aux différentes classes d'antifongiques (**Lohse, 2017**)

-Matrice extracellulaire : Elle constitue une barrière diffusive pour les antifongiques ce qui augmenterait la résistance des biofilms (**Al-Fattani et Douglas, 2006**). Selon **Hall-Stoodley et coll., (2004)**, la présence de la matrice extracellulaire induit une dilution des antifongiques dont la concentration ne serait plus létale et leur action sur les cellules serait ainsi retardée.

-Surexpression des pompes à efflux : La surexpression des pompes à efflux permet l'expulsion des antifongiques en dehors de la cellule ce qui les empêche d'atteindre leurs cibles, par conséquent, la sensibilité des levures des biofilms aux antifongiques est réduite (**Ramage et coll., 2012**).

-Densité cellulaire : La densité cellulaire des biofilms matures peut agir comme une barrière physique qui protège la masse cellulaire des biofilms des agressions environnementales (**Ramage et coll., 2012**).

L'augmentation de la densité cellulaire provoque une limitation en nutriments et un ralentissement de la vitesse de croissance des cellules dans le biofilm. Les cellules sessiles affichent un taux de croissance très lent ce qui réduit leur sensibilité aux antifongiques (**Mah et O'toole, 2001**).

-Cellules persistantes : il s'agit de variant phénotypique du type sauvage et non de mutants qui favorisent le phénomène de résistance (**LaFleur et coll., 2006**). Les cellules persistantes sont métaboliquement en dormance ou quiescentes qui tolèrent des concentrations élevées en antifongiques (**Lewis, 2010**). Il faut noter que ces cellules peuvent reformer un biofilm après l'élimination de l'agent antifongique (**Ramage et coll., 2012**).

Il en résulte de cette organisation la création au sein d'un biofilm de microenvironnements variés permettant la cohabitation de plusieurs espèces microbiennes aux propriétés métaboliques différentes. Ainsi, plusieurs espèces aux exigences nutritionnelles et métaboliques différentes peuvent cohabiter permettant un métabolisme de groupe et certaines substances toxiques pour des microorganismes peuvent éventuellement être métabolisées par d'autres espèces microbiennes constitutives du biofilm (**Hamzah et coll., 2022**).

En effet, en **2014**, **Fox et ses collaborateurs**, ont montré que les biofilms formés par *Candida albicans* créent un microenvironnement hypoxique qui permet le développement des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides fragilis* et

Clostridium perfringens. Ces biofilms fournissent aux bactéries un environnement anaérobie favorable pour leur développement. En retour, la bactérie augmente la formation de « mini biofilms » de *C. albicans* qui peuvent facilement flotter et se développer dans des conditions de toxicité [(Gulati and Nobile, 2016) ; (Alim et coll., 2018) ; (Atriwal et coll., 2021)].

De plus, *Candida albicans* cohabite avec d'autres souches bactériennes pour former des biofilms polymicrobiens telles que *Streptococcus mutans* et *Fusobacterium sp.*, et celles appartenant au groupe ESKAPE, à savoir *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sp* [(Pathirana et coll., 2019) ; (Rodrigues et coll., 2020)].

Candida albicans a également la capacité de former des biofilms mixtes avec d'autres espèces du genre *Candida* telles que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* et *C. guilliermondii* (Nobile et Johnson 2015).

Dans un biofilm mixte ou multi-espèces, les microorganismes développent soit des relations de synergie pour faciliter la cohabitation soit des relations d'antagonisme de type compétitif dans le cas de co-colonisation [(Filleron et Jumas-Bilak, 2015) ; (Lohse et coll., 2017)]. Ces multiples interactions renforcent la virulence des biofilms et compliquent le diagnostic et le traitement des infections polymicrobiennes.

En 2020, Lohse et ses collaborateurs ont montré que la résistance de *Candida albicans* à l'amphotéricine B et au fluconazole et de *Staphylococcus epidermidis* à la vancomycine dans un biofilm mixte est plus importante que celle observée dans des biofilms formés par ces deux espèces séparément.

La prise en charge des biofilms polymicrobiens constitue, par conséquent, un réel déficit en raison de la diversité et de la résistance accrue des microorganismes qui les composent aux traitements habituels et de la nature du dispositif médical sur lequel se forment ces structures.

Pour pallier à ce problème, plusieurs chercheurs se sont orientés vers le développement de nouvelles approches thérapeutiques parmi lesquelles nous pouvons citer la combinaison entre les agents antimicrobiens en vue d'optimiser leurs efficacités et l'utilisation de produits naturels.

Les premiers travaux qui ont mis l'accent sur l'efficacité de l'association d'antifongiques vis-à-vis de cellules sessiles de *Candida albicans* ont été menés en **2002**, par **Khun et ses collaborateurs** en utilisant l'amphotéricine B liposomale combinée à la caspofungine et la micafungine.

De plus, une interaction synergique a été rapportée entre les associations amphotéricine B/posaconazole et amphotéricine B/ caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de *Candida albicans* (**Tobudic et coll., 2009**) et micafungine/voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida auris* (**Fakhim et coll., 2017**).

Par ailleurs, **Cordeiro et coll., (2013)** et **Katragkou et coll., (2014)** ont associé l'amphotéricine B, l'antifongique polyénique le plus utilisé en milieu clinique avec le farnésol, molécule du quorum sensing nécessaire à la maturation du biofilm de *Candida albicans*. Ces travaux ont mis en évidence un effet synergique de cette association vis-à-vis de cellules planctoniques et sessiles de *Candida albicans*. En revanche, **Xia et coll., (2017)** ont révélé que l'association amphotéricine B/farnésol présente un effet indifférent vis-à-vis de souches sensibles et multi-résistantes de *C. albicans*.

Rappelons que le farnésol est un terpénoïde endogène produit par *Candida albicans* qui inhibe la formation des pseudofilaments nécessaires à l'adhésion de cette levure sur différents supports, ce qui a orienté les chercheurs vers une nouvelle voie dans la prise en charge des biofilms, basée sur l'utilisation de terpénoïdes exogènes qui sont des constituants des huiles essentielles. La faible toxicité et le faible coût de revient de ces molécules constituent leurs atouts majeurs (**Dantas-Medeiros et coll., 2021**).

En effet, en **2008**, **Dalleau et ses collaborateurs**, ont mis en évidence une activité anti-biofilm de 10 dérivés terpéniques naturellement présents dans les huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques. C'est ainsi que le carvacrol, le géraniol et le thymol ont présenté le meilleur taux d'inhibition des biofilms de *C. glabrata* et *C. parapsilosis*.

L'efficacité du carvacrol et celle du cuminaldéhyde, constituant majeur de l'huile essentielle du cumin vis-à-vis de biofilms de *Candida albicans* a été également rapportée par **Kamble (2015)** et **Scaffaro et coll., (2018)**.

La majorité des études réalisées sur l'efficacité des associations d'antimicrobiens et de produits naturels sur les biofilms formés *in vitro* ont porté sur les biofilms fongiques mono-espèces laissant dans l'ombre les biofilms mixtes ou multi-espèces. C'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude dans laquelle nous nous proposons de :

- Rechercher les altérations mixtes (*Candida albicans*/bactéries) sur différents dispositifs médicaux prélevés des services d'anesthésie-réanimation, de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale du CHU de Tlemcen.
- Déterminer la sensibilité des souches isolées aux agents antimicrobiens.
- Etudier *in vitro* la capacité de *Candida albicans* et des bactéries co-isolées d'un même dispositif médical à former de biofilms mixtes.
- Evaluer l'effet inhibiteur des terpénoïdes exogènes (carvacrol et cuminaldéhyde) et endogènes (farnésol) seuls et associés vis-à-vis des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro*.

Deuxième partie

Démarche expérimentale

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

Chapitre 1 : Recherche des altérations mixtes *Candida albicans*/bactéries dans les dispositifs médicaux aux services d'anesthésie-réanimation, de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale du CHU de Tlemcen

1. Collecte des dispositifs médicaux

Durant la période allant de novembre 2014 à décembre 2015, différents dispositifs médicaux (cathéters veineux périphériques et centraux, sondes vésicales et matériels d'ostéosynthèse) sont récupérés des services d'anesthésie-réanimation, de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale du CHU de Tlemcen (Algérie).

Selon les recommandations de **Quinet 2006**, seuls les dispositifs médicaux implantés depuis 48 heures et plus sont inclus dans cette étude.

Après leur ablation, les cathéters veineux périphériques, centraux et les sondes vésicales, sont coupés aseptiquement puis placés dans des tubes secs stériles et acheminés au laboratoire. Alors que pour les matériels d'ostéosynthèse, des prélèvements par écouvillonnage sont effectués sur leurs surfaces.

Les dispositifs médicaux récupérés et les écouvillons sont placés dans 1mL d'eau physiologique stérile, puis agités au vortex pendant 2 minutes (**Brun Buisson et coll., 1987**).

200µL de chaque échantillon sont prélevés et répartis à volume égal dans deux tubes différents, l'un destiné à la recherche des levures auquel 900µL du milieu Sabouraud sont ajoutés et l'autre à la recherche des bactéries auquel 900µL de bouillon nutritif sont additionnés. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures voire 72 heures.

2. Etude de l'infectivité des dispositifs médicaux

La recherche des différents types d'infectivités des dispositifs médicaux est réalisée par dénombrement des levures viables sur cellule de Thoma (**Seddiki et coll., 2013**) et par une mise en culture de 10µL de chaque échantillon sur gélose Mueller Hinton à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries (**Brun-Buisson et coll., 1987**).

Selon les critères de **Brun-Buisson et coll., (1987)**, 3 types d'infectivités sont définis :

- **Contamination** : culture positive non significative ($<10^3$ UFC/mL) en l'absence de signes d'infection locaux ou généraux.
- **Colonisation** : culture positive significative ($\geq 10^3$ UFC/mL) en l'absence de signes d'infection locaux ou généraux.
- **Infection** : culture positive significative ($\geq 10^3$ UFC/mL) en présence de signes d'infection locaux ou généraux.

L'eau physiologique restante est remplacée par 1mL du milieu Sabouraud et le tube est placé dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures pour rechercher les levures non détachées par agitation au vortex (**Boucherit-Atmani et coll., 2011**).

3. Isolement, purification et identification des microorganismes

À partir d'échantillons présentant un trouble, des boîtes de Pétri contenant la gélose Sabouraud dextrose destinées à l'isolement des levures et la gélose Mac conkey et Chapman pour l'isolement des bactéries, sontensemencées par stries, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Une colonie est ensuite prélevée, repiquée dans le milieu liquide stérile et incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Les souches isolées sont purifiées par passages successifs sur les mêmes milieux de culture. Chaque souche pure estensemencée sur gélose inclinée en tube puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures et conservée à +4 °C.

L'identification des souches isolées est réalisée par CHROM-Agar™ *Candida* (Sigma), galeries Api® *Candida* (Biomérieux) pour les levures et galeries Api 20E®, Api 20NE® et Api® Staph (Biomérieux) pour les bactéries.

Il est important de signaler que seules les levures de l'espèce *Candida albicans* et les bactéries qui cohabitent avec elles sur un même dispositif médical sont retenues pour cette étude.

4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida albicans* en mode planctonique

Le test de sensibilité des levures isolées aux différents antifongiques est réalisé par la technique de micro-dilution sur microplaque selon le protocole standard de *Clinical and Laboratory Standards Institute* publié en 2008 dans le document M27-A3 (**CLSI-M27-A3, 2008**).

100µL d'un inoculum à une concentration de $1,5 \cdot 10^3$ cellules/mL sont introduits dans les puits d'une microplaque (96 puits), auxquels 100µL des solutions antifongiques sont ajoutés. Les concentrations finales en antifongique dans chaque puits sont comprises entre 0,03 et 16µg/mL pour l'amphotéricine B et le voriconazole et entre 0,015 et 8µg/mL pour la caspofungine.

Les microplaques sont ensuite scellées puis incubées à 35°C pendant 24h voire 48h. Les CMI sont déterminées à l'oeil nu pour l'amphotéricine B et par dénombrement des cellules viables sur cellule de Thoma pour le voriconazole et la caspofungine. *Candida albicans* ATCC 10231 est utilisée comme contrôle interne.

5. Antibiogramme des bactéries co-isolées avec *Candida albicans*

L'antibiogramme est réalisé par la technique de diffusion sur gélose selon les normes préconisées par le *Comité d'Antibiogramme Société Française de Microbiologie (CASFM, 2015)*.

Des disques avec des concentrations déterminées d'antibiotiques sont déposés sur la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose Müller-Hinton préalablementensemencée par un inoculum de 10^6 UFC/mL de la souche à tester. L'inoculum provient d'une préculture de 24h, réalisée dans le BHIB ajusté à 10^8 UFC/mL par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625nm. Cette dernière doit être comprise entre 0,08-0,1.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition aux valeurs critiques permet de classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

Les disques d'antibiotiques utilisés sont :

Bactéries à Gram Négatif : Pipéracilline (PIP), Ceftazidime (CAZ), Imipénème (IPM), Céfoxitine (FOX), Gentamicine (GN), Tobramycine (TOB), Amikacine (AK), Ciprofloxacine (CIP), Acide Nalidixique (AN).

Bactéries à Gram Positif : Pénicilline (P), Gentamicine (GN), Erythromycine (E), Clindamycine (DA), Ciprofloxacine (CIP), Oxacilline (OX), Tobramycine (TOB), Tétracycline (TE), Céfoxitine (FOX), fosfomycine (FOS).

Chapitre 2 : Evaluation du potentiel de *Candida albicans* et des bactéries co-isolées d'un même dispositif médical à former des biofilms mono-et multi-espèces

1. Détermination des CMI de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

Les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles (SCMI) sont évaluées selon le protocole de **Pierce et ses collaborateurs (2008)** basé sur la réduction du XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) en formazan.

L'activité métabolique des microorganismes au sein du biofilm est proportionnelle à l'intensité de la couleur de ce composé mesurée à une longueur d'onde de 490nm (**Kuhn et coll., 2003**).

1.1. Préparation de l'inoculum

Une préculture de 16 heures à 30°C dans le milieu Sabouraud est centrifugée à 3000g pendant 5 min à +4°C. Le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé (PBS) (pH 7,4 ; 10mM) puis ressuspendu dans le milieu RPMI-1640. La concentration finale de l'inoculum est fixée à 10⁶ cellules/mL.

1.2. Préparation du XTT et de la ménadionne

Le tétrazolium "XTT" (2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium 5-carboxanilide) provenant des laboratoires (SIGMA) est un indicateur de viabilité cellulaire utilisé pour l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles.

Le XTT est solubilisé dans le PBS (pH 7,4 ; 10mM,) à une concentration de 0,5g/L. Après stérilisation par filtration à travers un filtre millipore d'une porosité de 0,22µm, il est stocké à -20°C à l'abri de la lumière.

La ménadione (2-méthyl-1,4-naphthoquinone) ou vitamine K3 (SIGMA) est utilisée comme accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. La solution mère de ménadione (10mM) est préparée en extemporané dans l'acétone à une concentration de 0,17mg/mL puis stérilisée par filtration.

1µL de la solution de ménadione est mélangée avec 10mL de la solution XTT puis stérilisée par filtration en extemporané à travers un filtre millipore de porosité 0,22µm.

1.3. Formation des biofilms

100µL de l'inoculum sont introduits dans tous les puits d'une microplaque. Après une incubation à 37°C pendant 48 heures, le surnageant est aspiré et les puits sont lavés deux fois avec le PBS (pH 7,4 ;10mM) stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes aux surfaces des puits.

100µL de milieu RPMI 1640 sont ajoutés dans les puits de la microplaque. Ensuite, 100µL de la solution antifongique à une concentration de 64µg/mL pour l'amphotéricine B et la caspofungine et de 256µg/mL pour le voriconazole sont ajoutés au premier puits. Après homogénéisation, une série de dilution au ½ de puits en puits est effectuée jusqu'au dernier puits. Les microplaques sont scellées puis incubées pendant 24h à 37°C.

1.4. Test de réduction du tétrazolium

Après un lavage de la microplaque avec du PBS (pH 7,4 ;10mM) stérile, 100µL du mélange XTT/ménadione sont ajoutés dans tous les puits. Après une incubation à 37°C pendant 3 à 4 heures, 75µL du contenu de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque stérile et l'absorbance est lue à 490nm dans un lecteur de microplaques spectrophotométriques (**Biotek, ELx800**).

Les SCMI sont évaluées à 50% d'inhibition selon la formule suivante :

$$SCMI = 100 \left[1 - \frac{\text{Moyenne des } DO_{490nm} \text{ puits avec antifongique}}{\text{Moyenne des } DO_{490nm} \text{ puits sans antifongique}} \right]$$

2. Evaluation de l'activité métabolique de *Candida albicans* co-isolée avec les bactéries

Pour mesurer l'activité métabolique au sein des biofilms formés par les souches de *Candida albicans* isolées, nous avons suivi le protocole de **Villar-Vidal et coll., (2011)**, basé sur la réduction du XTT en formazan, un composé orange dont la concentration est déterminée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 490nm dans le milieu extracellulaire.

Les souches de *Candida albicans* sont considérées comme formatrices de biofilms lorsque la densité optique mesurée est supérieure ou égale à 0,200. En fonction de la valeur de cette dernière, les levures sont regroupées en 6 catégories :

- Catégorie +6 (DO > 1,30), +5 (DO = 1 à 1,29) : levures hautement productrices de biofilms
- Catégorie +4 (DO = 0,70 à 0,99), +3 (DO = 0,40 à 0,69) : levures modérément productrices de biofilms
- Catégorie + 2 (DO = 0,20 à 0,39) : levures faiblement productrices de biofilms
- Catégorie +1 (A < 0,20) : levures non-productrices de biofilms

3. Formation *in vitro* des biofilms multi-espèces (*Candida albicans*/bactéries)

La formation *in vitro* des biofilms multi-espèces par *Candida albicans* et les bactéries co-isolées d'un même dispositif médical est réalisée selon le protocole de **Ibarra-Trujillo et coll., (2012)**.

Les levures et les bactéries sont inoculées dans des tubes coniques contenant 10mL de milieu Sabouraud, et le milieu trypticase soja respectivement. Après 16 heures d'incubation, les suspensions sont centrifugées et les culots sont lavés trois fois avec du PBS (pH 7,4 ;10mM) puis ressuspendus dans le milieu RPMI 1640. La concentration cellulaire est fixée à $3 \cdot 10^6$ cellules/mL pour les levures et 10^8 cellules/mL pour les bactéries. Dans les puits d'une microplaque 96 puits, 75µL de la suspension levurienne sont mélangés avec 75µL d'une suspension bactérienne, les microplaques sont scellées puis placées dans une étuve à 37°C pendant 24 voire 48 heures.

Après la formation des biofilms, le milieu est aspiré et les puits sont lavés 3 fois avec du PBS stérile (pH 7,4 ;10mM). 150µL du mélange XTT/ménadione sont ajoutés à chaque puits et les microplaques sont incubées à l'abri de la lumière pendant 3 à 4h à 37°C. La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde de 492nm.

Chapitre 3 : Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces

1. Inhibition *in vitro* des biofilms mono-espèces formés par *Candida albicans* par des combinaisons d'antifongiques

Deux combinaisons de trois antifongiques systémiques, amphotéricine B/voriconazole et amphotéricine B/caspofungine sont testées.

Pour évaluer l'effet inhibiteur *in vitro* des associations d'antifongiques vis-à-vis des biofilms formés par les souches de *Candida albicans* isolées, nous avons suivi la technique du carré-échiquier-damier ci-dessous (**Tobudic et coll., 2009**).

Cette dernière permet de tester l'activité de deux ou plusieurs antibiotiques en combinaison vis-à-vis de nombreuses souches.

Voriconazole ou caspofungine

		1/4CMI	1/2CMI	1CMI	2CMI
Amphotéricine B	1/4CMI				
	1/2CMI				
	1CMI				
	2CMI				

L'interaction des différentes combinaisons d'antifongiques est classée en fonction de l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FICI), calculé selon la formule suivante :

$$FICI = \frac{Ac}{Aa} + \frac{Bc}{Ba}$$

Ac et Bc : CMI des antifongiques en association

Aa et Ba : CMI des antifongiques A et B seuls

Les interactions sont regroupées en 3 types en fonction de FICI :

- Synergie si le $FICI \leq 0,5$,
- Indifférence si le $0,5 > FICI \leq 4$
- Antagonisme si le $FICI > 4$

Dans les puits d'une microplaque contenant 100µL de l'inoculum, deux antifongiques sont additionnés à volume égale de 50µL. La microplaque est placée dans une étuve à 37°C pendant 48 heures.

Les SCMI sont déterminées selon le protocole de **Pierce et coll., (2008)** décrit précédemment.

2. Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces par des terpénoïdes exogènes et endogènes seuls et combinés

Cette partie est réalisée au laboratoire de pharmacologie à l'Institut de recherche médicale, Université de Sharjah, Émirats Arabes Unis.

Trois terpénoïdes dont un endogène (le farnésol) et deux exogènes (le carvacrol et le cuminaldéhyde) provenant des laboratoires SIGMA sont testés seuls et combinés.

2.1. Terpénoïdes seuls

Les biofilms mono-espèces et multi-espèces sont formés *in vitro* selon les protocoles de **Pierce et coll., (2008)** et de **Ibarra-Trujillo et coll., (2012)** respectivement.

Les terpénoïdes sont ajoutés aux puits des microplaques au cours de la formation des biofilms à savoir, après 4 heures d'incubation (fin de la phase d'adhésion), après 24 heures (phase de prolifération) et après 48 heures (phase de maturation).

L'effet inhibiteur des terpénoïdes est évalué par mesure de l'activité métabolique selon le protocole de **Pierce et coll., (2008)** et des photos sont prises par microscope inversé Olympus.

2.2. Terpénoïdes combinés

Les associations testées sont farnésol/carvacrol, farnésol/cuminaldéhyde, carvacrol/cuminaldéhyde.

Dans un premier temps, les concentrations minimales inhibitrices des trois terpénoïdes (farnésol, carvacrol et cuminaldéhyde) sont déterminées selon le protocole du **CLSI (2006)** décrit précédemment.

L'effet inhibiteur *in vitro* des différentes associations vis-à-vis des biofilms formés par les souches de *Candida albicans* seules et avec les bactéries co-isolées est évalué par la technique du carré échiquier-damier (**Tobudic et coll., 2007**). Les interactions entre les trois terpénoïdes sont classées en synergiques, indifférentes ou antagonistes selon la valeur du FICI.

3. Étude statistique

Les résultats obtenus sont traités par ANOVA 1 et 2, le test de Tukey pour la comparaison multiple.

Le logiciel GraphPadPrism Version 5.0 (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, Californie, USA*) est également utilisé.

Les valeurs sont significatives si les variances (*P*) sont inférieures à 0,05.

Troisième partie

Résultats et discussion

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » de l'université de Tlemcen et a porté sur la :

- Recherche des altérations mixtes (*Candida albicans*/bactéries) sur différents dispositifs médicaux prélevés des services d'anesthésie-réanimation, de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale du CHU de Tlemcen.
- Détermination de la sensibilité des souches isolées à différents antimicrobiens.
- Mise en évidence du potentiel de formation des biofilms mixtes par les levures de *Candida albicans* et les bactéries co-isolées d'un même dispositif médical, *in vitro*.
- Evaluation de l'effet inhibiteur de terpénoïdes exogènes (carvacrol et cuminaldéhyde) et endogène (farnésol) seuls et associés vis-à-vis des biofilms mono et multi-espèces.

Chapitre 1 : Etude des différents types d'infectivités des dispositifs médicaux et identification des microorganismes co-isolés

1. Altération des dispositifs médicaux

340 dispositifs médicaux comprenant des cathéters veineux périphériques (CVP), des cathéters veineux centraux (CVC), des sondes vésicales (SV) et des matériels d'ostéosynthèse (MO) sont prélevés des services d'anesthésie-réanimation, de neurologie médicale et de chirurgie ortho-traumatologie du CHU de Tlemcen.

La répartition des prélèvements par service et selon les types des dispositifs médicaux est représentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°1 : Répartition des prélèvements par service et par type de dispositif médical

Services	Types de dispositif médical				Total
	CVP	CVC	SV	MO	
Anesthésie-réanimation	02	19	79	/	100
Neurologie médicale	96	/	12	/	108
Chirurgie ortho-traumatologie	96	01	13	22	132
Total	194	20	104	22	340

CVP : cathéters veineux périphériques, **CVC** : cathéters veineux centraux, **SV** : sonde vésicale, **MO** : matériels d'ostéosynthèse.

Quatre types de dispositifs médicaux sont utilisés au service de chirurgie ortho-traumatologie, trois en anesthésie-réanimation et deux en neurologie médicale.

Les cathéters veineux périphériques sont les dispositifs médicaux les plus utilisés aux services de chirurgie ortho-traumatologie et de neurologie médicale, alors qu'au service d'anesthésie-réanimation, ce sont les cathéters veineux centraux et les sondes vésicales. Les matériels d'ostéosynthèse ne sont utilisés qu'au service de chirurgie ortho-traumatologie.

Sur les 340 dispositifs prélevés, 128 ont présenté une culture positive ce qui correspond à un taux d'altération globale de 37,6%. Ce taux est inférieur à celui retrouvé en **2015** par **Seghir et ses collaborateurs** aux services de cardiologie et de chirurgie A et B du CHU de Tlemcen et qui était de 42%.

La répartition des prélèvements positifs par service et par type d'altération, bactérienne, fongique ou mixte (fongique/bactérienne) est représentée sur le **tableau n°2**.

Tableau n°2 : Répartition des prélèvements positifs par service selon l'origine de l'altération

Altérations	Levures/Bactéries	Levures	Bactéries
Services			
Anesthésie - réanimation n=89 (89%)	42 (47,2%)	08 (9%)	39 (43,8%)
Neurologie médicale n=23 (21,3%)	04 (17,4%)	10 (43,5%)	09 (39,1%)
Chirurgie ortho- traumatologie n=16 (12,12%)	04 (25%)	00	12 (75%)
Total n=128	50 (39%)	18 (14%)	60 (47%)

Le calcul des taux d'altérations par service a montré que l'anesthésie-réanimation occupe la première place avec un taux de 89% suivi de la neurologie médicale et de la chirurgie ortho-traumatologie avec des taux respectifs de 21,3% et 12%.

Le taux d'altération élevé retrouvé en anesthésie-réanimation est probablement dû au fait que ce service est pourvoyeur d'infections associées aux soins. De plus, les patients qui y sont hospitalisés présentent généralement des pathologies lourdes ce qui nécessite l'utilisation fréquente de dispositifs invasifs qui peuvent être laissés en place jusqu'à 21 jours. Ce résultat est en accord avec celui de **Oubih et Zoubir, (2015)** et de **Kaur et coll., (2016)**.

Les altérations mixtes (levures/bactéries) et bactériennes (bactéries seules) sont retrouvées au service d'anesthésie-réanimation, avec des taux comparatifs de 47,26% et 43,8% respectivement, alors que le taux des altérations fongiques est de 9%. En revanche, au service de neurologie médicale, les altérations causées par les levures seules occupent la première place avec un taux de 43,5% suivies des altérations bactériennes avec un taux de 39,1%. Les altérations mixtes représentent 17,4%. Au

service de chirurgie ortho-traumatologie, seules les altérations mixtes et bactériennes sont rencontrées avec des taux respectifs de 25% et de 75%. Aucune altération par les levures seules n'est retrouvée dans ce service.

2. Détermination des différents types d'infectivités des dispositifs médicaux

Le tableau n°3 regroupe les résultats relatifs aux différents types d'infectivités des dispositifs médicaux prélevés des services d'anesthésie-réanimation, de neurologie médicale et de chirurgie ortho-traumatologie du CHU de Tlemcen.

Tableau n°3 : Différents types d'infectivités des dispositifs médicaux par service

Services	Contamination	Colonisation	Infection
Anesthésie-réanimation (n=89)	1 (1%)	24 (27%)	64 (72%)
Neurologie médicale (n=23)	7 (30,4%)	10 (43,4%)	6 (26%)
Chirurgie Ortho-traumatologie(n=16)	3 (18,75%)	4 (25%)	9 (56,2%)

Les trois types d'infectivités à savoir les contaminations, les colonisations et les infections sont présents dans les trois services. En effet, 72% des dispositifs sont infectés au service d'anesthésie-réanimation contre 56,2% en chirurgie ortho-traumatologie et 26% en neurologie médicale.

En ce qui concerne les colonisations, elles sont majoritaires en neurologie médicale avec un taux de 43,4% suivies des services d'anesthésie-réanimation et de chirurgie ortho-traumatologie avec 27% et 25% respectivement.

Pour les contaminations, elles sont retrouvées essentiellement aux services de neurologie médicale et de chirurgie ortho-traumatologie avec des taux respectifs de 30,4% et 18,75%, alors qu'elles ne représentent que 1% au service d'anesthésie-réanimation.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Seddiki et ses collaborateurs (2013)** qui ont montré que les infections étaient majoritaires au service d'anesthésie-réanimation du CHU de Sidi Bel Abbès.

Il est important de signaler qu'une souche colonisante est dans 20% des cas une souche infectante et que les contaminations et les colonisations peuvent être des

étapes qui précèdent l'infection (**Stephan et coll., 2002**). Aussi, selon **Quinet (2006)**, la colonisation des cathéters aboutit à une infection dans 20% des cas chez l'adulte et 8% des cas chez l'enfant.

Nous avons ensuite déterminé la répartition des différents types d'infectivités selon l'origine de l'altération, bactérienne, fongique ou mixte (levures/bactéries). Les résultats obtenus sont représentés sur **la figure n°5**.

Nous constatons qu'au service d'anesthésie-réanimation, l'association levures/bactéries est impliquée dans 44% des infections et 58% des colonisations. Les levures seules sont responsables des contaminations, des colonisations et des infections avec des taux respectifs de 100%, 13% et 06%. Les bactéries seules, quant à elles, sont responsables uniquement d'infections (50%) et des colonisations (29%). En neurologie médicale, l'association levures/bactéries est responsable des infections et des colonisations avec des taux de 50% et 10% respectivement. Les levures seules sont incriminées dans 86% des contaminations et 40% des colonisations. Les bactéries seules sont responsables des infections et des colonisations avec un taux de 50% et des contaminations avec un taux de 14%. Le taux élevé des contaminations fongiques est probablement lié au fait que les levures font partie de la flore commensale de la peau et peuvent par conséquent contaminer les cathéters au moment de leur pose.

Au service de chirurgie ortho-traumatologie, les infections et les contaminations sont d'origine mixte (levure/bactérie) ou bactérienne, alors que les colonisations, elles sont toutes d'origine bactérienne. Il est important de signaler que les levures seules ne sont responsables ni de contaminations, ni de colonisations, ni d'infections dans ce service.

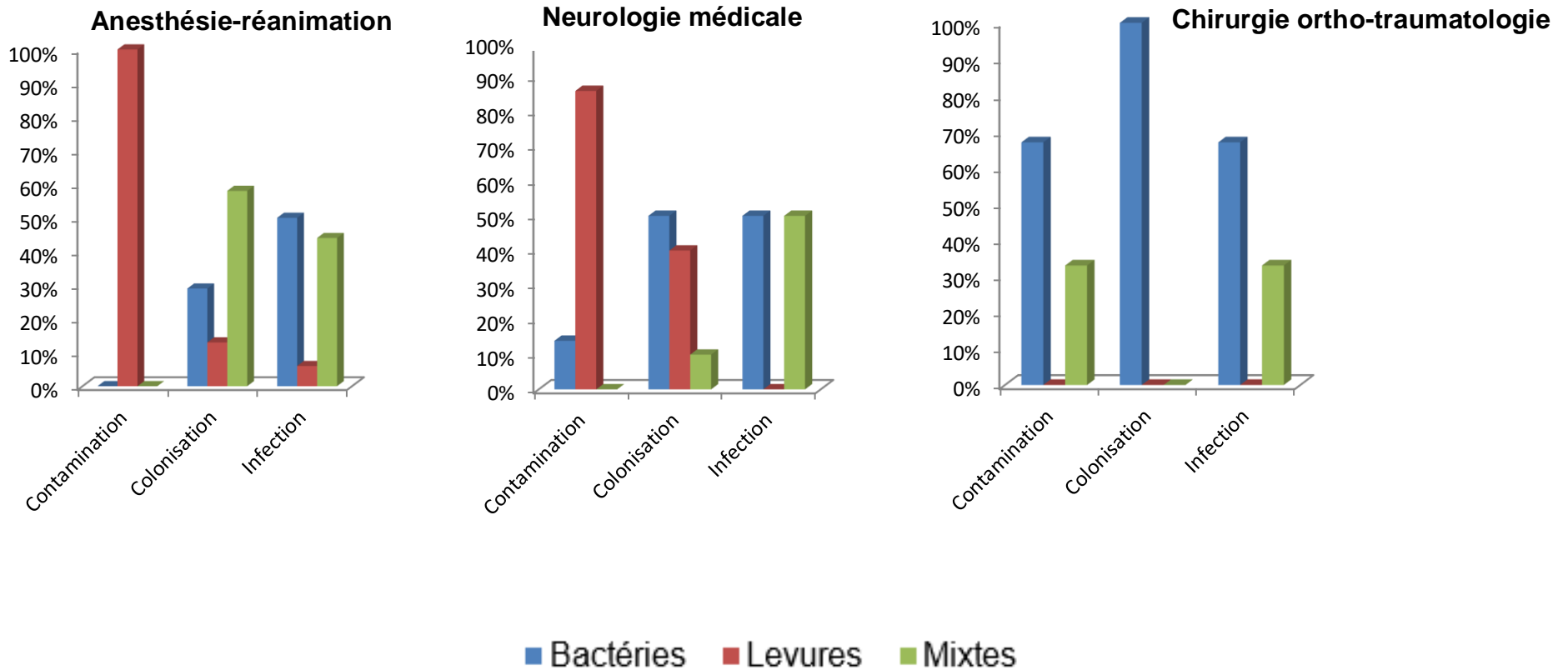


Figure n°5 : Différents types d’infectivités des dispositifs médicaux prélevés du CHU de Tlemcen selon l’origine de l’altération

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de quelques facteurs de risque (nature du dispositif médical, durée de cathétérisme, antibiothérapie et âge des patients) sur l'infectivité des dispositifs médicaux aux services d'anesthésie-réanimation, de neurologie médicale et de chirurgie ortho-traumatologie.

2.1. Infectivité et nature du dispositif médical

Le tableau n°4 représente la répartition des différents types d'infectivités selon la nature des dispositifs médicaux.

Tableau n°4 : Répartition des différents types d'infectivités en fonction de la nature des dispositifs médicaux

Infectivités Type de dispositif médical	Contamination	Colonisation	Infection
Cathéters veineux périphériques	09 (82%)	08 (21%)	01 (1%)
Cathéters veineux centraux	01 (9%)	09 (24%)	03 (4%)
Sondes vésicales	00	19 (50%)	73 (92%)
Matériels d'Ostéosynthèse	01 (9%)	02 (5%)	02 (3%)

Le type d'infectivité dépend de la nature du dispositif médical utilisé. En effet, les sondes vésicales sont les dispositifs les plus concernés par les infections avec un taux de 92%. Alors que les cathéters veineux périphériques sont impliqués dans les contaminations avec un taux de 82%. La colonisation quant à elle est due à l'utilisation des sondes vésicales (50%), des cathéters veineux centraux (24%) et périphériques (21%).

Ce résultat est en accord avec celui de **Nicolle (2014)** qui a mis en évidence que les sondes vésicales étaient responsables de plus de 70% des infections au service d'urologie du CHU de Serbie.

Par ailleurs, en **2016**, l'équipe de **Kaur** a mené une étude en Inde au service des soins intensifs, ils ont montré que les infections étaient retrouvées essentiellement chez les patients porteurs de cathéters veineux centraux et de sondes vésicales avec des taux respectifs de 81,3% et de 85,7%.

Au service de chirurgie ortho-traumatologie, les trois types d'infectivités sont retrouvés sur les matériels d'ostéosynthèse. Ces altérations sont toutes d'origine bactérienne.

2.2. Infectivité et durée du cathétérisme

Les résultats de la relation entre l'infectivité et la durée du cathétérisme sont représentés sur **la figure n°6**.

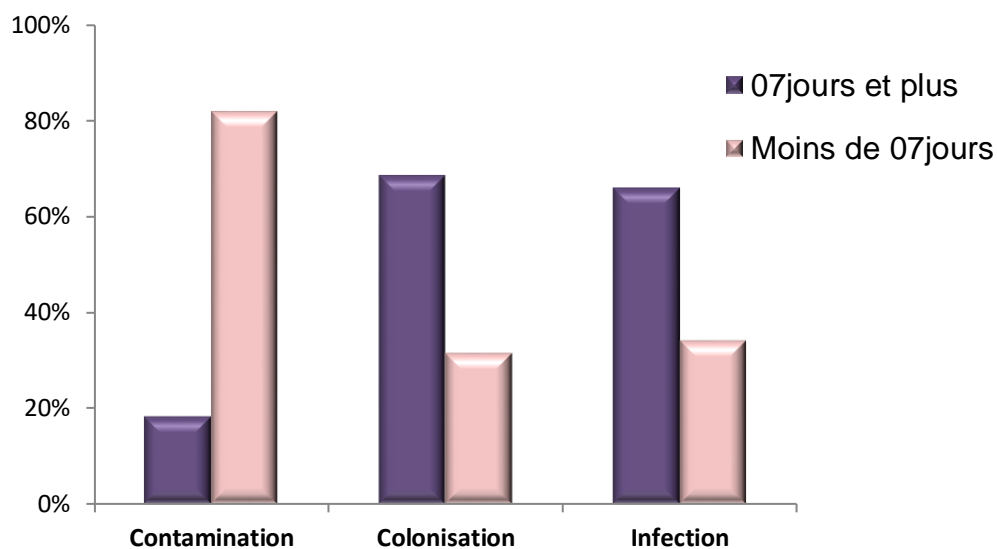


Figure n°6 : Répartition des types d'infectivités en fonction de la durée de pose

Le type d'infectivité est lié à la durée de pose du dispositif médical. En effet, pour une durée de pose inférieure à 7 jours, les contaminations sont dominantes avec un taux de 82%, les colonisations et les infections avec un taux de 30% environ. En revanche, lorsque la durée de pose est de 7 jours est plus, les colonisations et les infections se classent en premier avec des taux respectifs de 68,5% et 66%. Les contaminations ne représentent que 18%.

Ce résultat va dans le même sens que celui d'**Al Mohajer et Darouiche (2013)** qui ont montré que le taux d'infection des cathéters dont la durée de pose est de 8 jours en moyenne, était supérieur à 50%.

Rappelons que pour les 128 dispositifs médicaux altérés de cette étude, la durée de pose est inférieure à 7 jours pour 48 cathéters et de 7 jours et plus pour 80 cathéters.

Selon **Lolom et coll., (2009)**, la durée de maintien de la voie veineuse chez l'adulte ne devrait pas dépasser les 96 heures (soit quatre jours au maximum). Aussi, **Schmalz-Ottet coll., (2008)** et **Espinasse et coll., (2010)**, ont montré qu'une durée de pose d'un cathéter supérieure à 7 jours est le principal facteur de risque des infections associées aux soins. De plus, en 2016, **Flores-Mireles et coll.,** ont montré que les sondes urinaires dont la durée de pose dépasse 7 jours sont responsables d'un taux de mortalité supérieur à 30%.

2.3. Infectivité et antibiothérapie

La figure n°7 regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'antibiothérapie administrée aux patients sur l'infectivité des dispositifs médicaux.

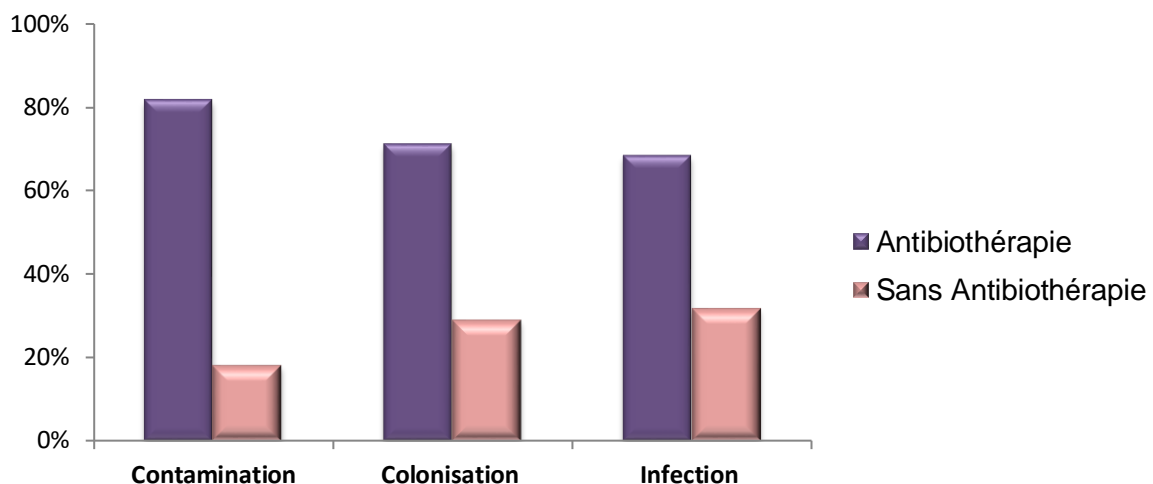


Figure n°7 : Effet de l'antibiothérapie sur les différents types d'infectivités

L'antibiothérapie administrée aux patients influe sur l'infectivité des dispositifs médicaux. En l'absence de tout traitement, les contaminations, les colonisations et les infections sont retrouvées avec des taux respectifs de 18%, 29% et 31%. Alors que pour les patients sous antibiothérapie, ces taux sont de 82% pour les contaminations, 71% pour les colonisations et 68% pour les infections.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Talaat et coll., (2010)** ainsi que ceux de **Tao et coll., (2015)** qui ont montré que l'utilisation des antibiotiques favorise l'apparition des infections avec des taux respectifs de 93% et 91%.

2.4. Infectivité et âge des patients

La figure n°8 regroupe la répartition des différents types d'infectivités en fonction de l'âge des patients (années).

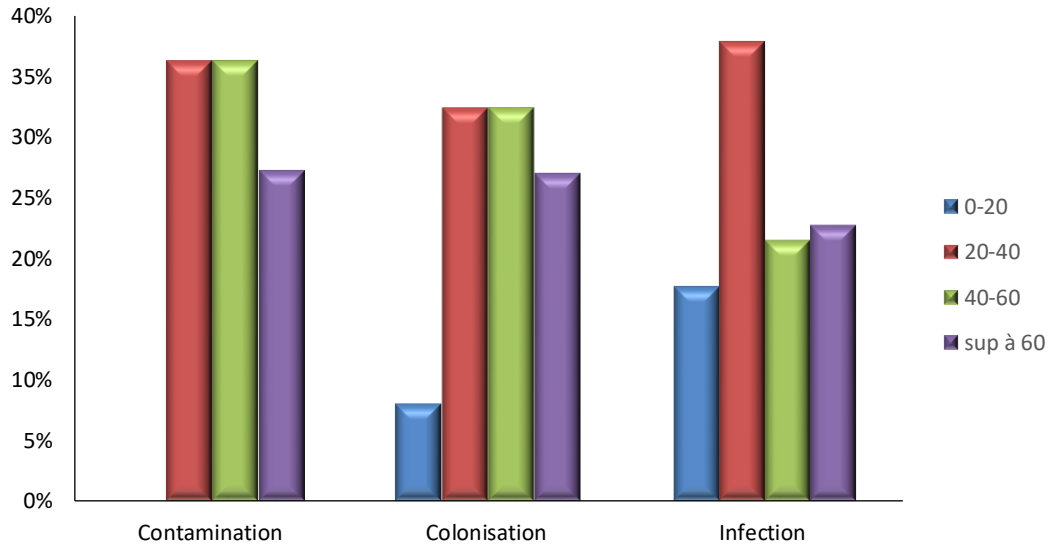


Figure n°8 : Répartition des différents types d'infectivités en fonction de l'âge des patients

Nous remarquons que les patients âgés de moins de 20 ans ne sont concernés que par les colonisations et les infections avec des taux respectifs de 8% et 18%. Par ailleurs, les patients appartenant aux tranches d'âge 20-40 ans et 40-60 ans, sont les plus concernés par les contaminations et les colonisations avec des taux respectifs de 36,30% et 32,40%. En revanche, les infections sont retrouvées majoritairement (38%) chez les patients de la tranche d'âge 20-40 ans. Ce résultat est en accord avec celui d'**Odoki et coll., (2019)**, qui ont montré que dans trois CHU de l'Ouganda, 44% des infections sont enregistrées chez des patients âgés de 20 à 40 ans.

Pour les patients âgés de 60 ans et plus, ils sont concernés par les contaminations (27%), les colonisations (27%) et les infections (22%). Or, en **2015, Tao et coll.**, ont montré que 72% des infections étaient enregistrées dans l'unité des soins intensifs en Chine chez des patients âgés de 60 ans et plus. Cette différence est probablement liée à la nature des dispositifs médicaux utilisés. En effet, l'étude de l'équipe de Tao a porté sur les cathéters veineux centraux.

3. Identification des microorganismes

A partir des 128 dispositifs médicaux altérés, 50 altérations mixtes (levures/bactéries) sont enregistrées soit un taux de 39%. Ce taux est supérieur à celui rapporté par **Seghir A. (2015)** et **Bekkal Brikci O. (2016)** au sein du même CHU qui était de 21%. Cette différence peut être liée à la nature des dispositifs médicaux et des services étudiés.

Rappelons que la suite de ce travail concernera uniquement la recherche des altérations mixtes, *Candida albicans*/bactéries.

3.1. Identification des levures

L'identification des levures issues d'altérations mixtes par croissance sur Chrom-Agar et galeries Api-*Candida* a permis d'assigner 29 levures au genre *Candida* dont 13 à l'espèce *Candida albicans*, 20 au genre *Geotrichum* et une au genre *Saccharomyces* soit des taux respectifs de 58%, 40% et 2% (**annexe 1**).

Sur les 13 levures de *Candida albicans* qui cohabitent avec les bactéries sur un même dispositif médical, 11 sont isolées du service d'anesthésie-réanimation, une du service de neurologie médicale et une du service de chirurgie ortho-traumatologie. Ce résultat va dans le même sens que celui de **Chen et coll., (2015)** qui ont révélé que 27 à 57% d'infections à *Candida albicans* sont polymicrobiennes, impliquant d'autres agents pathogènes ou opportunistes comme les bactéries.

3.2. Identification des bactéries

19 bactéries sont co-isolées avec *Candida albicans* d'un même dispositif médical. Leur identification est réalisée par galeries Api 20E[®], Api 20NE[®] et Api[®] Staph. Les résultats de l'identification sont présentés sur la **figure n°9**.

Les détails de l'identification de toutes les bactéries isolées sont présentés dans **l'annexe 2**.

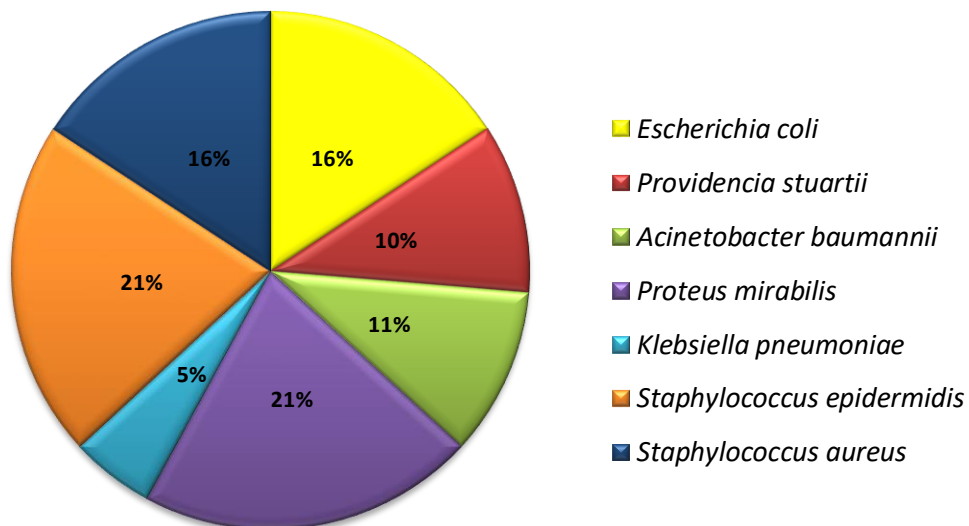


Figure n°9 : Identification des bactéries co-isolées avec *Candida albicans* d'un même dispositif médical.

Douze (12) bactéries sont des bacilles à Gram négatif, parmi lesquelles quatre (4) appartiennent à l'espèce *Proteus mirabilis*, trois (3) à l'espèce *Escherichia coli*, deux (2) aux espèces *Acinetobacter baumannii* et *Providencia stuartii* et une à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Les sept (7) autres sont des cocci à Gram positif dont quatre (4) *Saphylococcus epidermidis* et trois (3) *Staphylococcus aureus*.

Selon **Gajdács et ses collaborateurs (2019)** *Candida albicans* est co-isolée avec *Escherichia coli* dans des candiduries mixtes chez 8,33% des patients hospitalisés.

De plus, *Candida albicans* est co-isolée avec *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* à partir de cathéters veineux centraux responsables de 20% des septicémies (**Carolus et coll., 2019**).

3.3. Identification et infectivités des associations *Candida albicans*/bactéries

La figure n°10 regroupe les différentes associations présentes aux services d'anesthésie-réanimation, de neurologie médicale et de chirurgie ortho-traumatologie du CHU de Tlemcen.

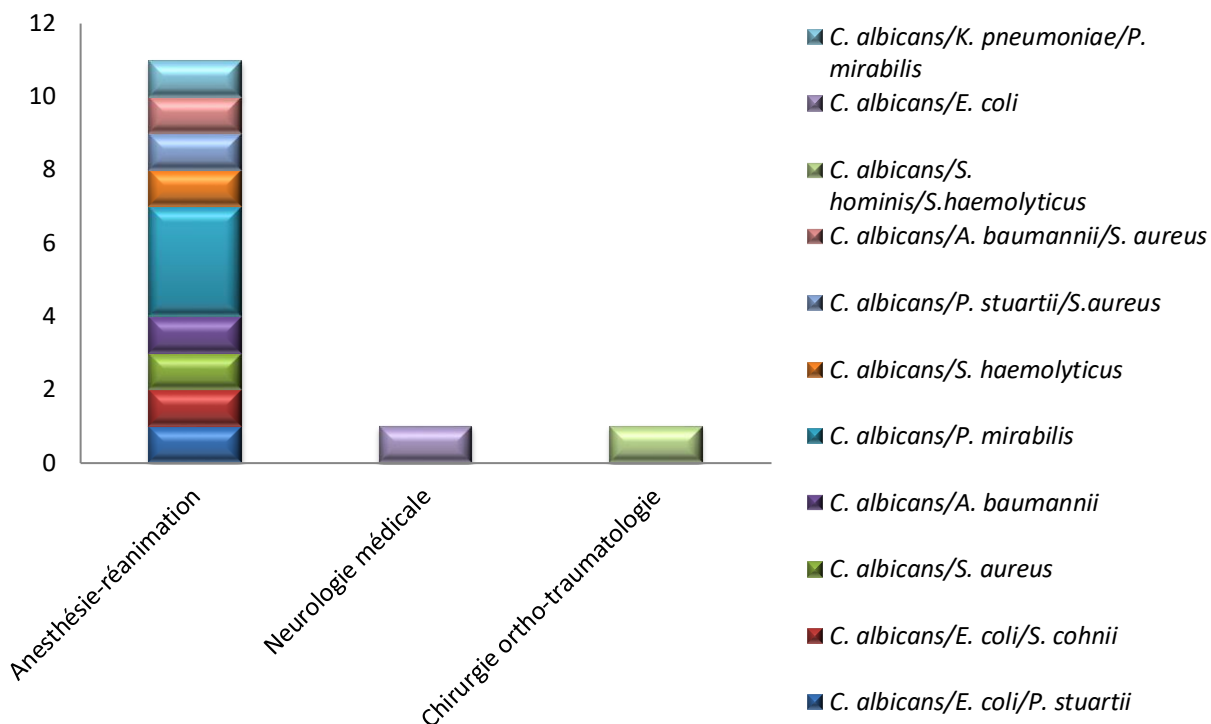


Figure n°10 : Répartition des associations *Candida albicans*/bactéries par service du CHU de Tlemcen

Nous remarquons que *Candida albicans* cohabite avec une seule bactérie sur sept (7) dispositifs médicaux et avec deux bactéries sur les six (6) autres.

De plus, sur les treize (13) associations *Candida albicans*/bactéries, onze (11) sont isolées du service d'anesthésie-réanimation, une du service de neurologie médicale et une du service de chirurgie ortho-traumatologie.

En effet, au service d'anesthésie-réanimation, *Candida albicans/Proteus mirabilis* occupe la première place avec un taux de 23%. Les autres associations, à savoir ; *Candida albicans/Escherichia coli/Providencia stuartii*, *Candida albicans/Escherichia coli/Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans/Providencia stuartii/Staphylococcus aureus*, *Candida albicans/Acinetobacter baumannii/Staphylococcus aureus*, *Candida albicans/Klebsiella pneumoniae/Proteus mirabilis*, *Candida albicans/Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans/Staphylococcus aureus*, *Candida albicans/Staphylococcus epidermidis* sont isolées avec un même taux de 7,6%. En revanche, l'association retrouvée au service de neurologie médicale correspond à *Candida albicans/Escherichia coli*, alors que celle isolée du service de chirurgie ortho-traumatologie abrite trois espèces, il s'agit de *Candida albicans/ Staphylococcus hominis/Staphylococcus haemolyticus*.

L'évaluation de l'implication des altérations mixtes *Candida albicans*/bactéries dans les différents types d'infectivités montre qu'aux services de neurologie médicale et de chirurgie ortho-traumatologie, les associations de *Candida albicans*/bactéries sont isolées d'une sonde vésicale infectée. Alors qu'au service d'anesthésie-réanimation, les associations sont isolées de sondes vésicales et de cathéters veineux centraux colonisés et infectés. La répartition des différentes associations selon le type d'infectivité au service d'anesthésie-réanimation est représentée sur **la figure n° 11**.

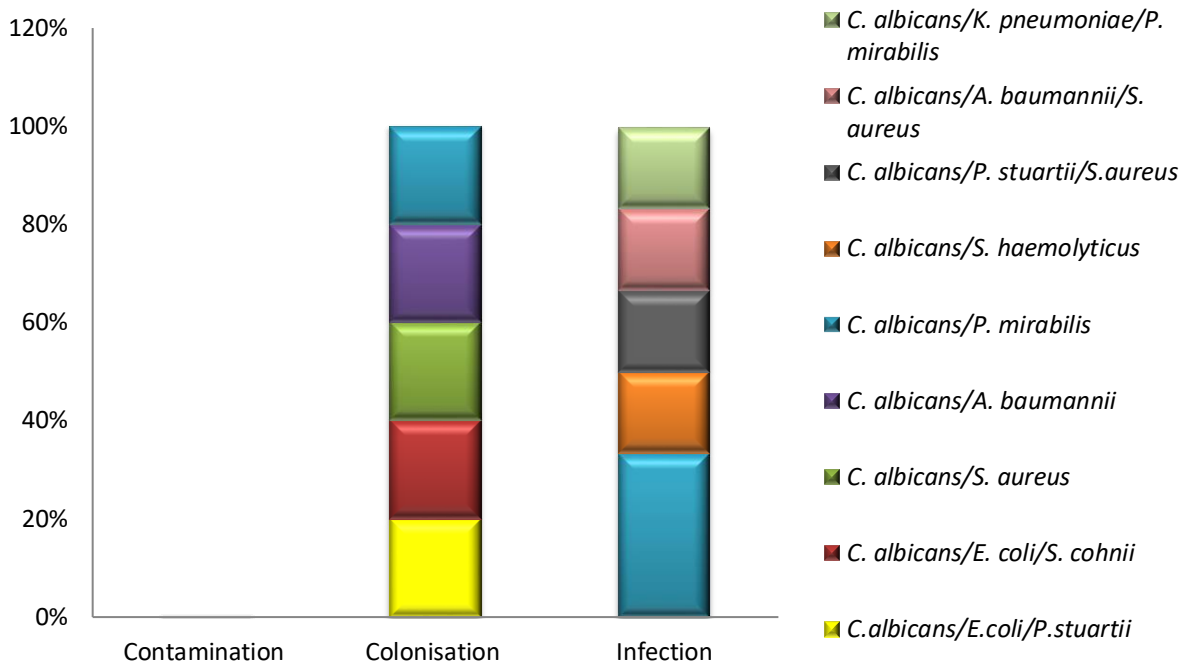


Figure n°11 : Répartition des associations *Candida albicans*/bactéries selon le type d'infectivité au service d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen

Les associations de *Candida albicans/Escherichia coli/Providencia stuartii*, *Candida albicans/Escherichia coli/Staphylococcus cohnii*, *Candida albicans/Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans/Staphylococcus aureus*, sont responsables des colonisations mixtes avec un taux comparable de 20%.

Quant aux infections mixtes, une part importante (33%) est liée à la coexistence de *Candida albicans* et de *Proteus mirabilis* qui ont également co-colonisées 20% des dispositifs.

Selon de nombreuses études, la co-infection et la co-colonisation par *Candida albicans* et *Proteus mirabilis* sont souvent rencontrées chez les patients immunodéprimés porteurs d'une sonde vésicale [(Jacobsen et Shirtliff, 2011) ; (Armbruster et coll., 2017) ; (kart et coll., 2020) ; (Gaston et coll., 2021)].

Aucune contamination mixte n'est observée dans les trois services étudiés. L'anesthésie-réanimation est le service où les infections mixtes associées aux soins sont les plus fréquentes. Cela pourrait être lié à l'apparition de microorganismes multi-résistants, à la sévérité des pathologies sous-jacentes, à la durée de séjour relativement prolongée des patients et au recours systématique à des procédures invasives à visée diagnostique ou thérapeutique [(Selek et coll., 2016) ; (Gaston et coll., 2021)].

De plus, Klingspor et ses collaborateurs (2015) ont montré que la co-infection par *Candida albicans* et les bactéries est observée dans 5% des septicémies en soins intensifs.

La relation entre l'infektivité à *Candida albicans*/bactérie et la nature des dispositifs médicaux est également étudiée. Les résultats sont regroupés sur la figure n°12.

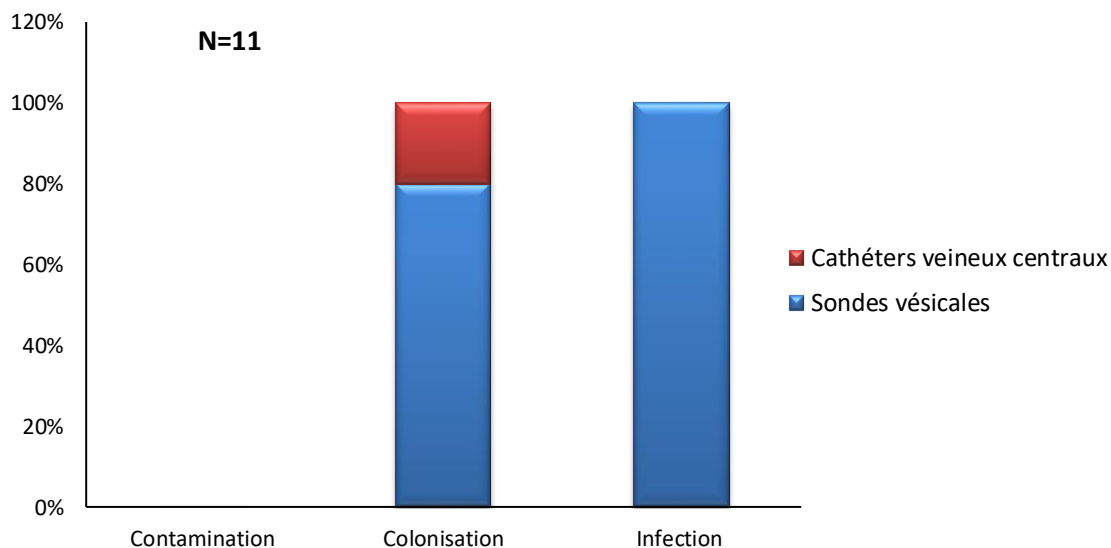


Figure n°12 : Infectivités à *Candida albicans*/bactéries et nature des dispositifs médicaux au service d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen

Le type d'infektivité dépend de la nature du dispositif médical utilisé. En effet, toutes les infections enregistrées dans le service d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen sont associées à l'utilisation de sondes vésicales. En revanche, les colonisations sont retrouvées sur les sondes vésicales (80%) et sur les cathéters veineux centraux (20%). Ce résultat va dans le même sens que celui de Choi et coll., (2016) qui ont montré que l'espèce *Candida albicans* est l'un des principaux agents pathogènes responsables d'infections mixtes sur sondes vésicales en soins intensifs.

Selon les travaux de **Galvan et coll., (2016)** et de **Kart et coll., (2020)**, 86 % des infections sur sondes vésicales sont polymicrobiennes impliquant différentes associations entre *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *enterococcus*.

4. Etude du profil de résistance des souches de *Candida albicans* et des bactéries co-isolées d'un même dispositif médical

4.1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques de *Candida albicans*

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida albicans* qui cohabitent avec les bactéries sur un même dispositif médical sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°5 : CMI de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida albicans* co-isolées avec les bactéries.

Souches (nombre)	CMI AmB (µg/mL)	Souches (nombre)	CMI Vor (µg/mL)	Souches (nombre)	CMI Csp (µg/mL)
1	0,25	1	0,03	4	0,03
10	0,5	0	0,06	4	0,06
2	1	4	0,125	4	0,125
		6	0,25	1	0,25
		2	0,5		

Nous remarquons que les CMI varient de 0,25 à 1µg/mL pour l'amphotéricine B, de 0,03 à 0,5µg/mL pour le voriconazole et de 0,03 à 0,25µg/mL pour la caspofungine. Selon les recommandations du CLSI 2008, les levures du genre *Candida* sont considérées comme sensibles à l'amphotéricine B, au voriconazole et à la caspofungine si la CMI est inférieure à 1 ; 4 et 2µg/mL respectivement. De ce fait, tous nos isolats cliniques de *Candida albicans* sont sensibles à ces trois antifongiques.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Seghir et coll., (2014)**, **Bendjelloul et coll., (2016)**, **Lahfa-Hassaine et coll., (2017)** et **Benhabib-Bekkal Brikci et coll., (2017)** qui ont montré que toutes les souches de *Candida albicans* isolées des CHU de Tlemcen et d'Oran, sont sensibles à l'amphotéricine B et à la caspofungine.

La sensibilité en mode planctonique des levures du genre *Candida* à ces trois antifongiques a été également rapportée en Espagne (**Valentín et coll., 2012**), en Egypte (**Al Azizi et coll., 2015**) et en Turquie (**Dagi et coll., 2016**).

Selon **Wisplinghoff et coll., (2014)**, la résistance de *Candida sp.* à la caspofungine est très rare et inhabituelle, elle est de l'ordre de 0,4%.

4.2. Antibiogramme des bactéries co-isolées avec *Candida albicans*

Trois familles d'antibiotiques sont utilisées, les β -lactamines (ticarcilline, ceftazidime et imipénème), les aminosides (gentamicine, tobramycine et amikacine) et les quinolones (Acidenalidixique et ciprofloxacine).

Les résultats de l'antibiogramme des bactéries à Gram négatif co-isolées avec *Candida albicans* sont présentés sur **le tableau n°6**.

Tableau n°6 : Antibiogramme des bactéries à Gram négatif co-isolées avec *Candida albicans*

	PIP	CAZ	IPM	GN	TOB	AK	AN	CIP
	< 21 ≥27	<19 ≥22	<16 ≥22	<14 ≥17	<14 ≥17	<13 ≥16	<22 ≥28	<19 ≥22
<i>Escherichia coli</i> 2	06 (R)	12 (R)	26 (S)	22 (S)	10 (R)	18 (S)	10 (R)	06 (R)
<i>Escherichia coli</i> 4	06 (R)	06 (R)	26 (S)	08 (R)	08 (R)	19 (S)	12 (R)	06 (R)
<i>Escherichia coli</i> 13	16 (R)	30 (S)	24 (S)	25 (S)	24 (S)	23 (S)	18 (R)	24 (S)
<i>Acinetobacter baumannii</i> 7	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	15 (I)	06 (R)	06 (R)
<i>Acinetobacter baumannii</i> 11	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)
<i>Providencia stuartii</i> 2	10 (R)	12 (R)	18 (I)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	10 (R)	14 (R)
<i>Providencia stuartii</i> 3	12 (R)	06 (R)	22 (S)	18 (S)	17 (S)	24 (S)	16 (R)	17 (R)
<i>Proteus mirabilis</i> 16	17 (R)	06 (R)	24 (S)	17 (S)	16 (I)	25 (S)	18 (R)	20 (I)
<i>Proteus mirabilis</i> 18	14 (R)	18 (R)	22 (S)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	10 (R)	06 (R)
<i>Proteus mirabilis</i> 19	12 (R)	06 (R)	24 (S)	06 (R)	06 (R)	06 (R)	12 (R)	13 (R)
<i>Proteus mirabilis</i> 21	21 (R)	18 (R)	28 (S)	21 (S)	15 (I)	24 (S)	17 (R)	15 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 18	21 (R)	28 (S)	25 (S)	24 (S)	24 (S)	23 (S)	23 (I)	32(S)

PIP :Pipéracilline, CAZ : Ceftazidime, IPM : Impénème, GN : Gentamicine, TOB : Tobramicyne, AK : Amikacine, AN : Acide nalidixique, CIP : Ciprofloxacine.

Pour la famille des β -lactamines, les douze (12) bactéries à Gram négatif qui cohabitent avec *Candida albicans* sur un même dispositif médical sont résistantes à la piperacilline. Dix (10) d'entre elles sont résistantes à la ceftazidime et deux (2) à l'imipénème. Alors que pour les aminosides et les quinolones, onze (11) bactéries sont résistantes à l'acide nalidixique, neuf (9) à la ciprofloxacine, sept (7) à la tobramycine, six (6) à la gentamicine et quatre (4) à l'amikacine.

Les deux souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à tous les antibiotiques testés.

Pour les bactéries à Gram positif, seules les espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* sont co-isolées avec *Candida albicans*. Les résultats de l'antibiogramme sont regroupés sur **le tableau n°7**.

Sept (7) souches de staphylocoques sont résistantes à la pénicilline, à l'oxacilline et à la céfoxitine, six (6) à la gentamicine, à la tobramycine et à la ciprofloxacine, trois (3) à la tétracycline et à l'érythromycine. En revanche, toutes les souches sont sensibles à la clindamycine et la fosfomycine.

Tableau n°7 : Antibiogramme des bactéries à Gram positif co-isolées avec *Candida albicans*

	P	OX	FOX	GN	TOB	CIP	E	DA	TE	FOS
	<12 ≥18	<20 ≥20	<22 ≥25	<18 ≥18	<18 ≥18	<20 ≥20	<18 ≥21	<19 ≥22	<19 ≥22	< 25 ≥33
<i>Staphylococcus aureus</i> 6	06 (R)	06 (R)	06 (R)	09 (R)	12 (R)	12 (R)	30 (S)	32 (S)	10 (R)	33 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 11	06 (R)	06 (R)	06 (R)	08 (R)	12 (R)	12 (R)	29 (S)	32 (S)	10 (R)	33 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 24	06 (R)	06 (R)	06 (R)	08 (R)	12 (R)	12 (R)	28 (S)	30 (S)	08 (R)	33 (S)
<i>Staphylococcus épidermidis</i> 2	06 (R)	06 (R)	06 (R)	12 (R)	15 (R)	12 (R)	06 (R)	35 (S)	24 (S)	34 (S)
<i>Staphylococcus épidermidis</i> 3	06 (R)	06 (R)	06 (R)	10 (R)	10 (R)	16 (R)	13 (R)	27 (S)	20 (I)	33 (S)
<i>Staphylococcus épidermidis</i> 9	06 (R)	06 (R)	06 (R)	12 (R)	20 (S)	12 (R)	10 (R)	32 (S)	28 (S)	35 (S)
<i>Staphylococcus épidermidis</i> 10	10 (R)	08 (R)	20 (R)	18 (S)	17 (R)	22 (S)	21 (S)	30 (S)	31 (S)	35 (S)

P : Pénicilline, OX : Oxacilline, FOX : Céfoxitine, GN : Gentamicine, TOB : Tobramicyne, CIP : Ciprofloxacine, E : Erythromycine, DA : Clindamycine, TE : Tetracycline, FOS : Fosfomycine

Chapitre 2 : Formation des biofilms mono-et multi-espèces de *Candida albicans* et des bactéries co-isolées d'un même dispositif médical

1. Formation des biofilms fongiques mono-espèces de *Candida albicans*

1.1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

La figure n°13 regroupe les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*.

Nous remarquons que les SCMI des trois antifongiques testés vis-à-vis des cellules de *Candida albicans* varient de 2 à 64µg/mL pour l'amphotéricine B, de 2 à 128µg/mL pour le voriconazole et de 1 à 64µg/mL pour la caspofungine. Ces valeurs sont significativement supérieures aux CMI des cellules planctoniques ($p < 0,05$) ($P = 0,0031$). En effet, les SCMI sont plus élevées que les CMI d'un facteur de 64 pour l'amphotéricine B, de 1024 pour le voriconazole et de 1066 pour la caspofungine. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bojsen et coll., (2014)** qui ont montré que les cellules sessiles fongiques sont jusqu'à mille fois plus résistantes aux antifongiques par rapport aux cellules planctoniques. Cette résistance accrue aux antifongiques des cellules sessiles de *Candida sp.* a été également rapportée par **Bonhomme et D'Enfert (2013)** et **Lohse et coll., (2020)**.

Selon **Cavalheiro et Teixeira (2018)**, la résistance des levures en mode biofilm peut être liée à plusieurs mécanismes notamment, la diminution de la pénétration des antifongiques à travers la matrice extracellulaire du biofilm, l'augmentation de l'expression d'un système de pompe à efflux, l'expression des gènes de résistance et aussi la modification du métabolisme microbien.

L'augmentation des SCMI par rapport aux CMI, met en évidence le potentiel des cellules à former des biofilms (**Ramage et coll., 2002**). De ce fait, toutes les levures de *Candida albicans* isolées sont formatrices de biofilms.

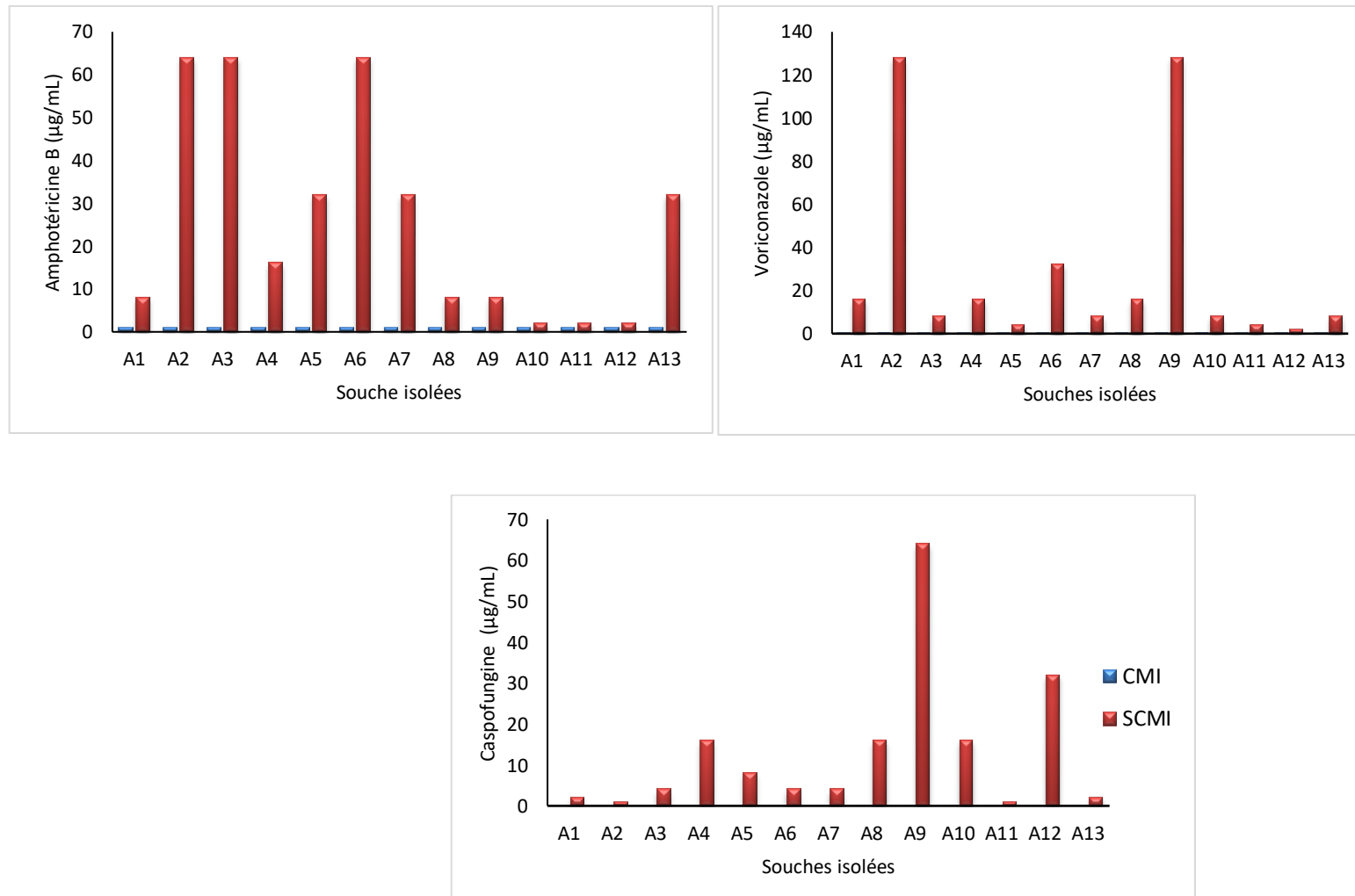


Figure n°13 : CMI de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*.

1.2. Activité métabolique des biofilms mono-espèces

L'évaluation de l'activité métabolique des microorganismes en mode biofilm permet de les classer dans l'une des catégories, hautement formatrices, modérément formatrices ou faiblement formatrices de biofilm, selon leur potentiel à réduire le XTT en formazane.

Les résultats de l'activité métabolique des cellules sessiles de *Candida albicans* mesurée après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C sont présentés sur **la figure n°14**. Les souches productrices de biofilms sont regroupées par catégorie.

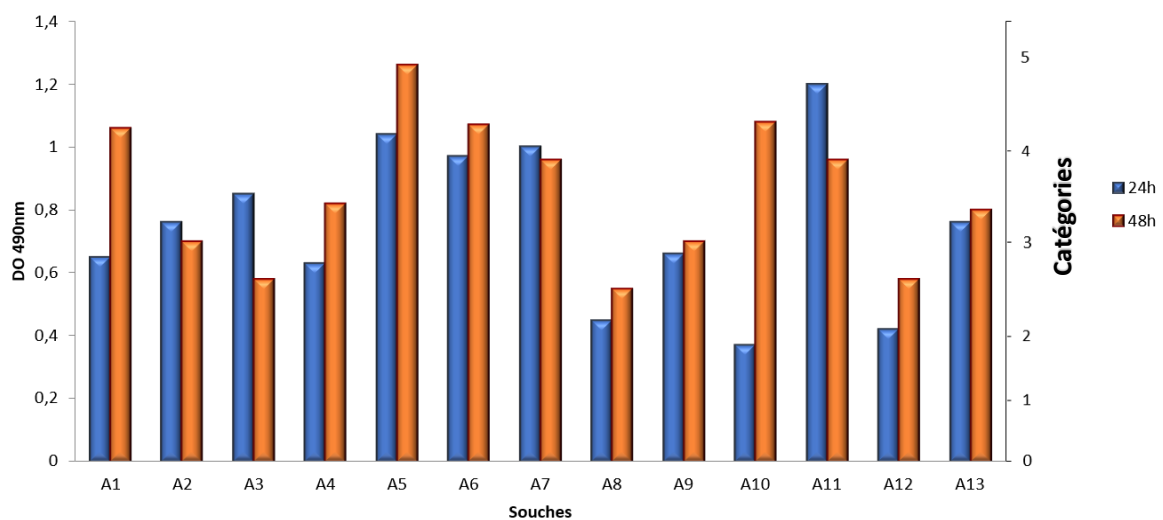


Figure n°14 : Activité métabolique des souches de *Candida albicans* obtenue par réduction du XTT après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C.

Les densités optiques enregistrées varient respectivement de 0,37 à 1,20 et de 0,55 à 1,26 après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Tumbarello et coll., (2012)** qui ont montré que les isolats cliniques de *Candida albicans* forment des biofilms mono espèce avec des densités optiques comprises entre 0,291 et 1,506.

La répartition des souches de *Candida albicans* par catégories nous a permis de les classer dans trois catégories. En effet, sur les treize souches *Candida albicans* isolées, quatre (A1, A5, A6, A10) appartiennent à la catégorie +5, six (A2, A4, A7, A9, A11, A13) à la catégorie +4 et trois (A3, A8, A12) à la catégorie +3. Les souches appartenant à la catégorie +5 sont hautement formatrice de biofilms alors que les celles de la catégorie +4 et +3 sont modérément formatrices de biofilms (**Villar-Vidal et coll., 2011**).

Nous remarquons également qu'après 48 heures d'incubation, la majorité des biofilms mono-espèces fongiques présentent une meilleure activité métabolique. En effet, les souches A1 et A6 passent respectivement des catégories +3 et +4 à la catégorie +5 et deviennent hautement formatrices de biofilms.

Ce résultat est en accord avec celui de **Pathak et ses collaborateurs qui en 2012**, ont révélé que le potentiel de formation de biofilms varie d'une souche à une autre et dépend du temps d'incubation et par conséquent de la maturité du biofilm.

Seules les souches de *Candida albicans* classées dans la catégorie +5 (bonnes formatrices de biofilms) et les bactéries qui cohabitaient sur un même dispositif médical sont retenues pour cette partie de l'étude.

2. Activité métabolique des biofilms multi-espèces (*Candida albicans*/bactéries)

Les biofilms mixtes sont formés *in vitro* par les levures de *Candida albicans* et les bactéries co-isolées d'un même dispositif médical. Les associations retrouvées sont :

- *Candida albicans*1/*Escherichia coli*2/*Providencia stuartii*2 (A1/Ec2/Ps2)
- *Candida albicans*5/*Providencia stuartii*3/*Staphylococcus aureus*6 (A5/Ps3/Sa6)
- *Candida albicans*6/*Acinetobacter baumannii*7/*Staphylococcus aureus*11 (A6/Ab7/Sa11)
- *Candida albicans*10/*Acinetobacter baumannii*11 (A10/Ab11).

Les résultats des activités métaboliques de ces différentes associations après 24 et 48h d'incubation à 37°C sont présentés sur la **figure n°15**.

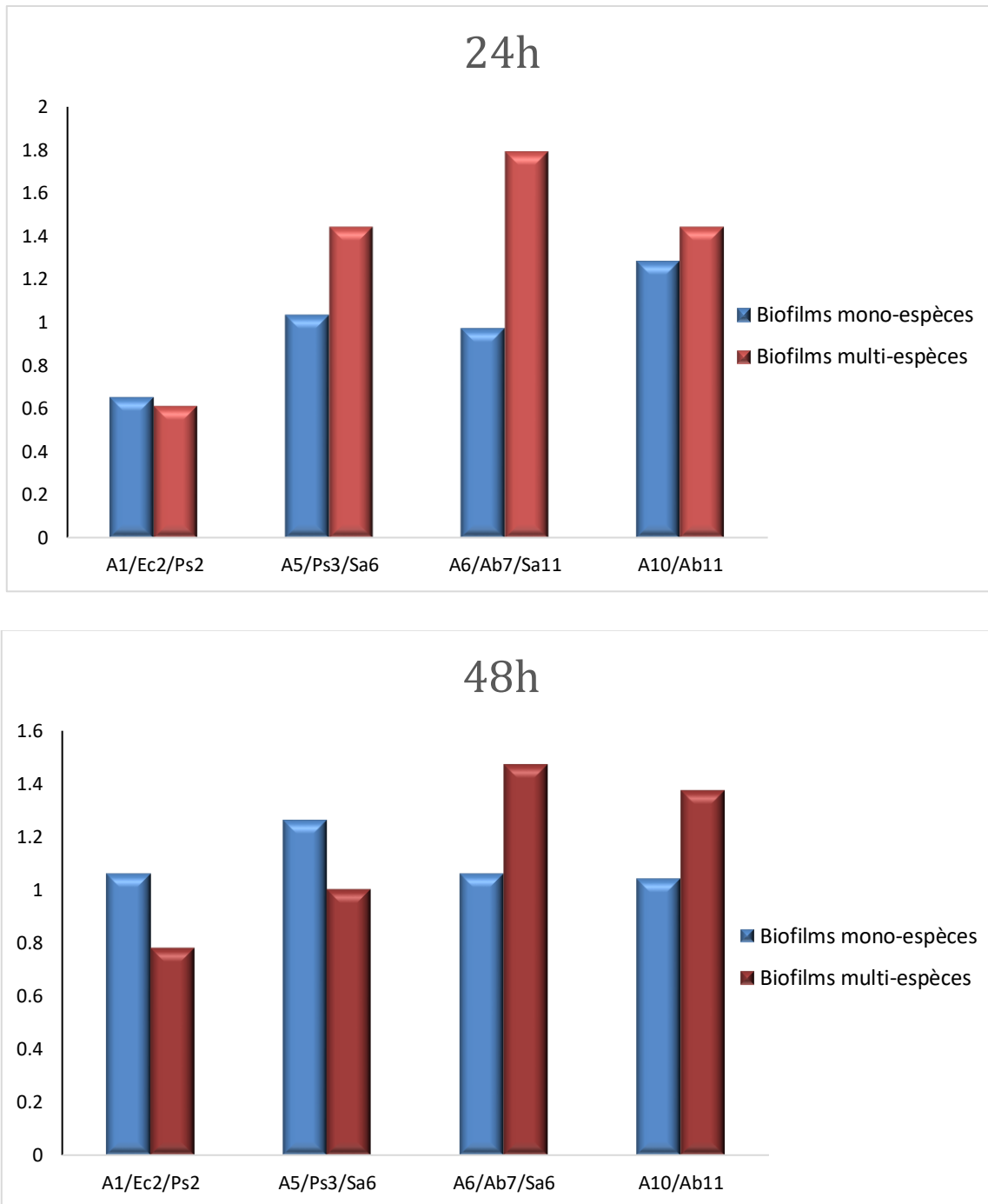


Figure n°15 : Activités métaboliques des différentes associations de *Candida albicans*/bactéries obtenus par réduction du XTT après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C

Nous remarquons qu'après 24 heures d'incubation à 37°C, à l'exception de l'association A1/Ec2/Ps2, une augmentation de l'activité métabolique est observée pour les autres associations étudiées. En effet, l'activité métabolique a augmenté de 46% pour l'association A6/Ab7/Sa11, 30% pour A5/Ps3/Sa6 et 12% pour A10/Ab11. Lorsque le temps d'incubation est de 48 heures, les activités métaboliques augmentent de 28% et 25% pour A6/Ab7/Sa11 et A10/Ab11 respectivement, alors que pour A1/Ec2/Ps2 et A5/Ps3/Sa6, l'activité métabolique diminue de 27% et 21% respectivement.

La diminution de l'activité métabolique après 48 heures d'incubation est probablement liée à la présence de l'espèce *Providencia stuartii*. Ce résultat va dans le même sens que les travaux de **Lee et coll., 2017** et de **kart et coll., 2020** qui ont montré que l'espèce *Proteus mirabilis* réduit l'activité métabolique de *Candida albicans* au sein du biofilm mixte. Sachant que les genres *Proteus* et *Providencia* sont des entérobactéries. L'activité métabolique dépend de la nature de l'espèce bactérienne et du temps d'incubation qui sont deux facteurs capables de moduler la physiologie de ces biofilms en affectant la morphogénèse des levures (**Bandara et coll., 2009**).

Par ailleurs, la meilleure activité métabolique est enregistrée pour *Candida albicans* 6 (A6). Cette souche a été co-isolée avec deux bactéries *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii* à partir d'une sonde vésicale placée chez un patient de sexe masculin. Ce résultat est en accord avec ceux d'**Ibarra-Trujillo et ses collaborateurs (2012)** qui ont montré que la présence de *Staphylococcus aureus* dans un biofilm mixte avec *Candida albicans* augmente son activité métabolique.

Chapitre 3 : Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces

1. Inhibition *in vitro* des biofilms mono-espèces formés par *Candida albicans* par des combinaisons d'antifongiques

1.1. Amphotéricine B/Caspofungine

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Indices des Concentrations Inhibitrices Fractionnaires (FICI) de l'amphotéricine B associée à la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°8 : CMI et FICI de l'amphotéricine B associée à la caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

Souches	SCMI µg/mL			FICI	Interactions
	Amphotéricine B	Caspofungine	Amphotéricine B /Caspofungine		
A1	8	2	1/0,5	0,37	Synergie
A2	64	1	16/0,125	0,37	Synergie
A3	64	4	32/2	1,00	Indifférence
A4	16	16	8/2	0,62	Indifférence
A5	32	8	8/4	0,75	Indifférence
A6	64	4	4/0,5	0,25	Synergie
A7	32	4	8/1	0,5	Synergie
A8	8	16	4/4	0,75	Indifférence
A9	8	64	4/16	0,75	Indifférence
A10	2	16	0,5/8	0,75	Indifférence
A11	2	1	1/0,5	1,00	Indifférence
A12	2	32	0,25/4	0,25	Synergie
A13	32	2	8/0,5	0,75	Indifférence

Les CMI de l'association amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* sont significativement inférieures à celles des deux antifongiques testés seuls ($p=0,0072$). Elles varient de 0,25µg/mL à 16µg/mL pour l'amphotéricine B et de 0,125µg/mL à 16µg/mL pour la caspofungine.

Le calcul des FICI a montré que l'interaction entre les deux antifongiques est de type indifférente pour huit (08) souches (A3, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A13) et synergique pour cinq (05) souches (A1, A2, A6, A7, A12).

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Tobudic et coll., (2009)** qui ont mis en évidence une interaction indifférente pour l'association amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* isolées à partir d'hémoculture à l'hôpital universitaire de Vienne (Autriche). En revanche, aucune interaction antagoniste n'est observée pour cette association d'antifongiques. Ce même résultat a été rapporté en **2007** par **Barchiesi et ses collaborateurs** et en **2012** par **Oz et ses collaborateurs**.

Le phénomène de synergie peut être expliqué par la facilité d'internalisation de l'amphotéricine B suite à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire par la caspofungine (**Barchiesi et coll., 2007**).

1.2. Amphotéricine B/Voriconazole

Le tableau n°9 regroupe les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Indices des Concentrations Inhibitrices Fractionnaires (FICI) de l'amphotéricine B associée au voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*.

Tableau n°9 : CMI et FICI de l'amphotéricine B associée au voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

Souches	SCMI µg/mL			FICI	Interactions
	Amphotéricine B	Voriconazole	Amphotéricine B /Voriconazole		
A1	8	16	2/4	0,5	Synergie
A2	64	128	32/32	0,75	Indifférence
A3	64	8	8/2	0,37	Synergie
A4	16	16	4/4	0,5	Synergie
A5	32	4	8/1	0,50	Synergie
A6	64	32	8/8	0,37	Synergie
A7	32	8	8/4	0,75	Indifférence
A8	8	16	2/4	0,5	Synergie
A9	8	128	2/32	0,5	Synergie
A10	2	8	0,5/2	0,5	Synergie
A11	2	4	0,25/0,5	0,25	Synergie
A12	2	2	1/0,5	0,75	Indifférence
A13	32	8	4/1	0,25	Synergie

Les CMI de l'association amphotéricine B/voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*, sont significativement inférieures à celles des deux antifongiques testés seuls ($p=0,0172$). Elles sont comprises entre 0,25µg/mL et 32µg/mL pour l'amphotéricine B et entre 0,5µg/mL et 32µg/mL pour le voriconazole.

Le calcul des FICI a montré que l'interaction entre l'amphotéricine B et le voriconazole est de type synergique pour dix (10) souches (A1, A3, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A13) et indifférente pour trois (03) souches (A2, A7, A12).

Ce résultat est en accord avec celui de **Tobudic et coll., (2009)** et de **Rodrigues et coll., (2018)** qui ont mis en évidence une interaction synergique entre l'amphotéricine B et le posaconazole, un autre dérivé azolé vis-à-vis de souches de *Candida albicans* et de *Candida glabrata* respectivement.

2. Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces par des terpénoïdes endogènes et exogènes

La formation de biofilms par *Candida albicans* est sous le contrôle d'une molécule autoproduite du quorum sensing, le farnésol. Ce sesquiterpène inhibe la formation des hyphes par *C. albicans*, nécessaire à son adhésion aux différents supports ce qui limite

sa capacité de formation de biofilms. C'est pourquoi, nous avons jugé utile d'évaluer l'effet du farnésol seul et associé à des terpénoïdes exogènes, le carvacrol et le cuminaldéhyde sur la formation de biofilms mono et multi-espèces par *C. albicans* et les bactéries co-isolées avec elle d'un même dispositif médical.

L'effet de ces terpénoïdes est évalué par mesure de l'activité métabolique au sein des biofilms au cours des différentes phases de leur formation, à savoir, la phase d'adhésion initiale (4h), la phase de prolifération (24h) et la phase de maturation (48h).

2.1. Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces par des terpénoïdes seuls

2.1.1. Terpénoïde endogène

a. Farnésol

La figure n°16 représente les taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le farnésol au cours des trois phases de leur développement.

Le farnésol est utilisé à des concentrations finales comprises entre 3 et 24mM. Ces concentrations correspondent aux SCMI de ce terpénoïde vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans*.

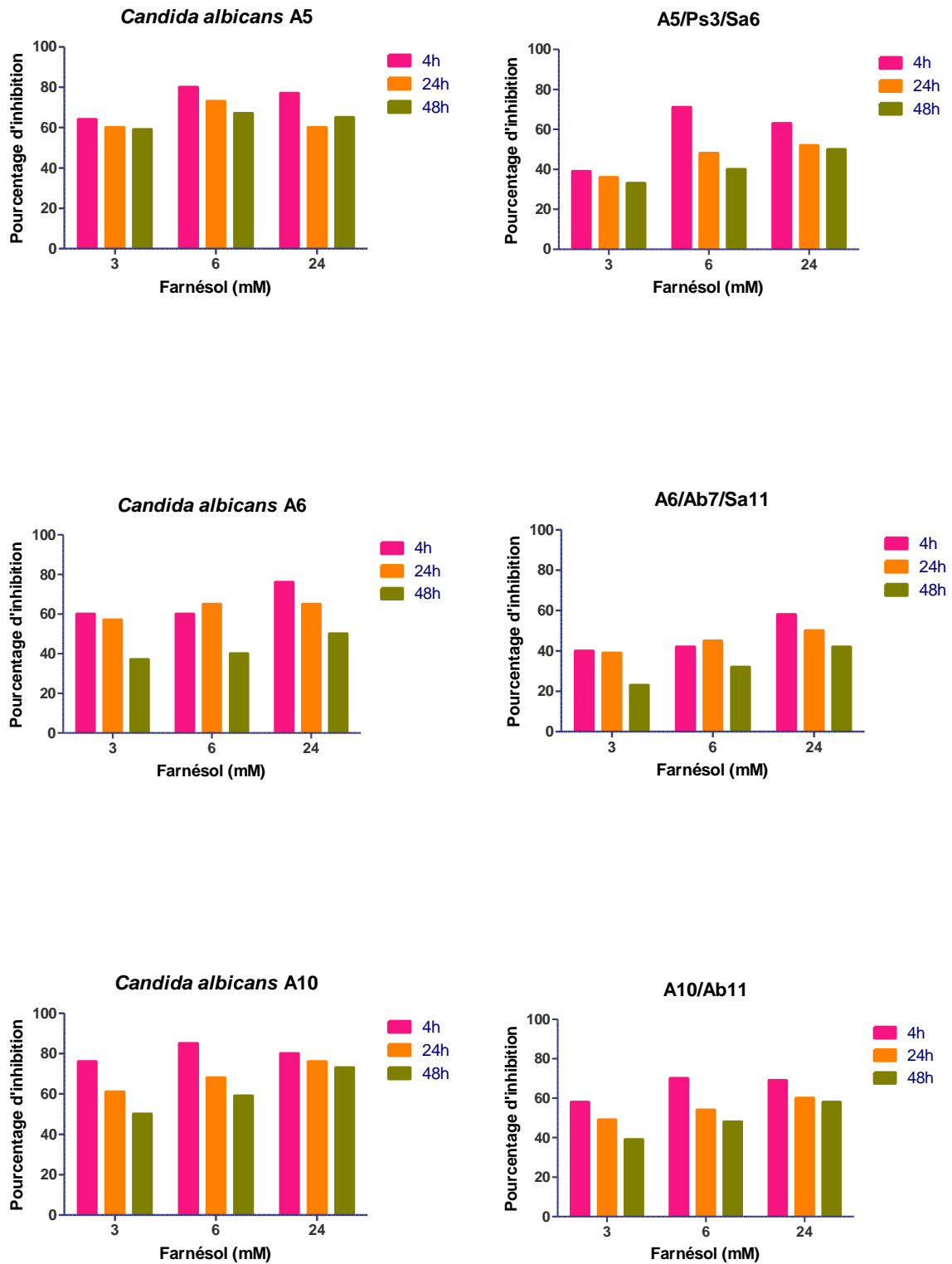


Figure n°16 : Taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le farnésol au cours des trois phases de leur développement

Nous constatons que quel que soit la concentration utilisée, le farnésol présente une meilleure activité vis-à-vis des biofilms formés par *Candida albicans* seule. Cet effet est plus important lorsque le farnésol est additionné au cours de la phase d'adhésion initiale (4h) et diffère d'une manière significative d'une souche à une autre ($P=0,027$). En effet, un taux d'inhibition maximal (80%) est obtenu à des concentrations finales de farnésol égale à 24mM pour *Candida albicans*₆ et *Candida albicans*₁₀ et 6mM pour *Candida albicans*₅. Cela est probablement lié au fait que le farnésol agit soit par inhibition de la formation des hyphes par *Candida albicans*, soit par interruption de l'élongation d'hyphes préexistants (**Polke et coll., 2018**).

La photo n°02 représente l'effet inhibiteur du farnésol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans*₅.

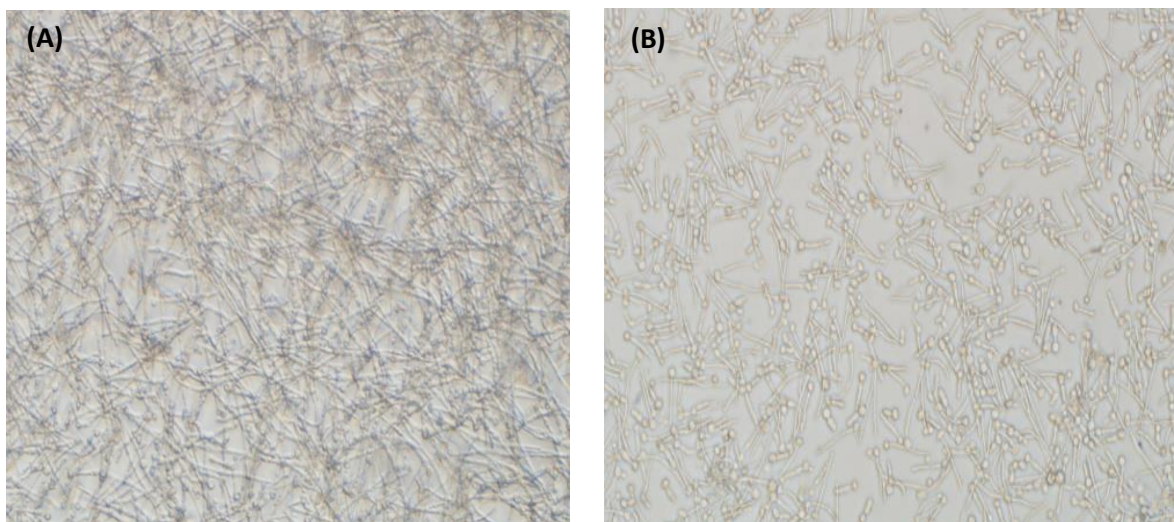


Photo n°02 : Effet inhibiteur du farnésol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 5. (A) Biofilms non traités (contrôle). (B) Biofilms traités avec 6mM de farnésol (Grossissement×400).

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Cernakova et coll., (2018)** qui ont montré que le farnésol additionné à une concentration finale de 200µM, inhibe à 50% les biofilms formés par *Candida albicans* SC5314. Ces derniers sont constitués principalement de blastospores. Aussi, en 2016, **Fernandes et coll.**, ont révélé que le taux d'inhibition des biofilms mono-espèces de *Candida albicans* varie de 64% à 96% pour une concentration finale de farnésol supérieure à 1,56mM.

De même, lorsque le farnésol est additionné à des biofilms matures (après 48 heures d'incubation à 37°C), le taux d'inhibition des biofilms mono-espèces est supérieur à celui obtenu pour les biofilms multi-espèces. Ce taux diffère significativement d'une souche à une autre ($P=0,0033$). En effet, le farnésol utilisé à une concentration finale de 3mM inhibe les biofilms mono-espèces formés par *Candida albicans*⁵, *Candida albicans*¹⁰ et *Candida albicans*⁶ avec des taux respectifs de 60%, 50% et 40%. Ces taux passent à 33% pour le biofilm mixte formé par *Candida albicans*⁵/*Providencia stuartii*³/*Staphylococcus aureus*⁶, 40% pour *Candida albicans*¹⁰/*Acinetobacter baumannii*¹¹ et 23% *Candida albicans*⁶/*Acinetobacter baumannii*⁷/*Staphylococcus aureus*¹¹. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Fernandes et coll., (2016)** et de **Öztürk et coll., (2022)** qui ont montré que l'efficacité du farnésol sur des biofilms multi-espèces de *Candida albicans*/*Streptococcus mutans* et de *Candida albicans*/*Escherichia coli* est réduite par rapport aux biofilms formés par la levure seule.

2.1.2. Terpénoïdes exogènes

Le carvacrol et le cuminaldéhyde sont utilisés à des concentrations finales égales à leurs CMI respectives, 1,5 fois la CMI et 2 fois la CMI.

a. Carvacrol

La figure n°17 représente les résultats relatifs à l'effet inhibiteur du carvacrol sur l'activité métabolique des biofilms au cours des différentes phases de leurs formation (4h, 24h et 48h).

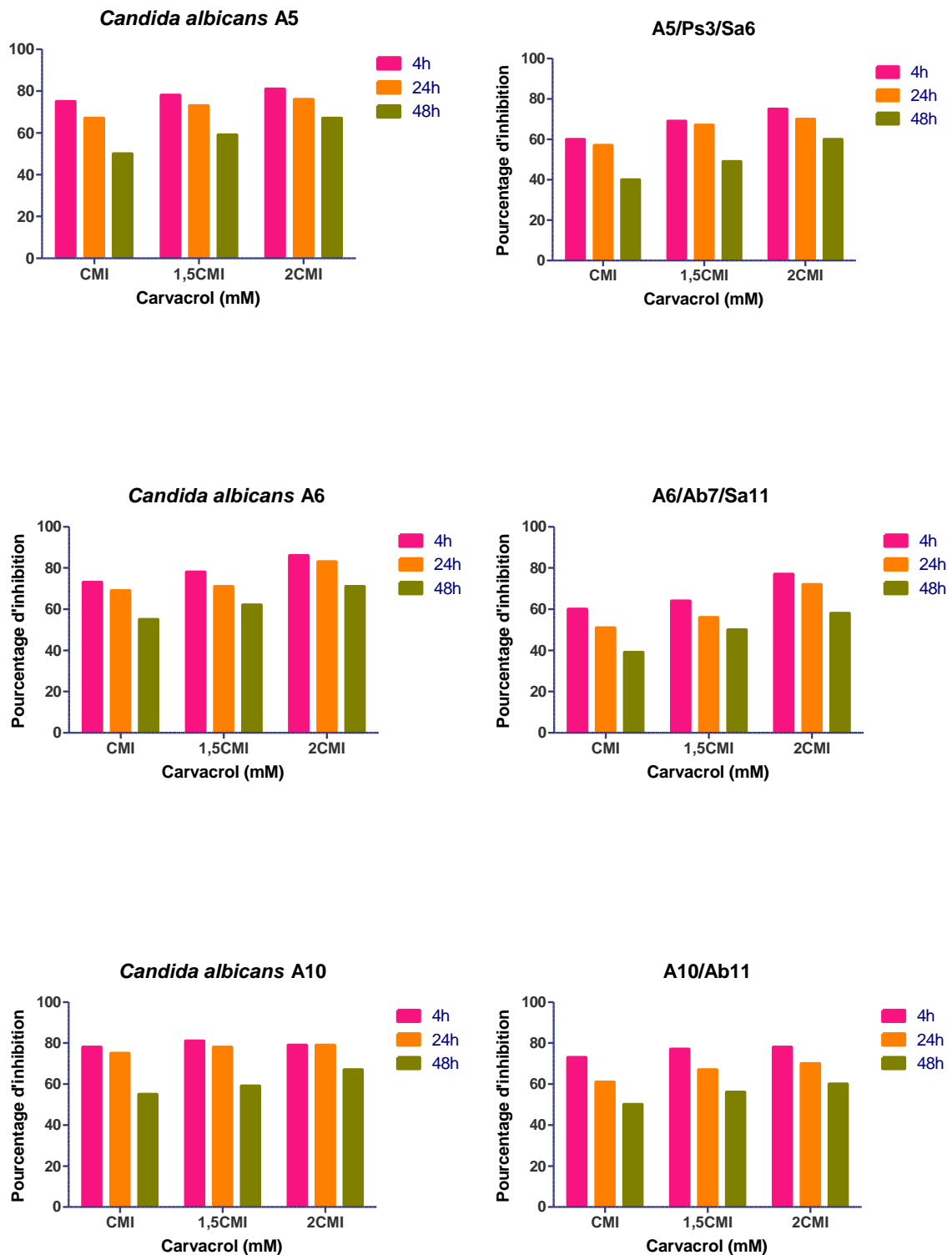


Figure n°17 : Taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le carvacrol au cours des trois phases de leur formation

Nous remarquons que quel que soit la nature des biofilms formés (mono et multi-espèces), les taux d'inhibition enregistrés pendant les trois phases de formation des biofilms mono-espèces sont plus élevés que ceux des biofilms mixtes. De plus, le meilleur effet inhibiteur du carvacrol est obtenu lorsqu'il est ajouté au cours de la phase d'adhésion initiale (4h) pour toutes les souches testées.

Cette inhibition est proportionnelle à la concentration du carvacrol utilisée. Le taux d'inhibition maximal est obtenu pour une concentration finale de carvacrol égale à 2 fois sa CMI. Ce taux est de 86% pour les biofilms mono-espèces de *Candida albicans* et de 78% pour les biofilms multi-espèces. Ce résultat est en accord avec ceux de **Doke et coll., (2014)** et de **Miranda-Cadena et coll., (2021)** qui ont montré que l'effet inhibiteur du carvacrol des biofilms mono-espèces de *C. albicans* dépend de sa concentration finale et de la phase de formation des biofilms au cours de laquelle il est incorporé. Selon ces mêmes auteurs, le carvacrol additionné au cours de la phase de prolifération et de la phase de maturation à une concentration de 13,3mM, induit une inhibition des biofilms de *Candida albicans* de 85% et 80% respectivement.

De plus, en **2008**, **Braga et ses collaborateurs**, ont montré que le thymol, un isomère du carvacrol, utilisé à deux fois sa CMI, inhibe à 90% des biofilms mono-espèces formés par des souches de références de *Candida albicans*.

La photo n°03, montre que la morphologie des levures de *Candida albicans* soumises à une concentration finale de carvacrol de 2xCMI est similaire à celle obtenue pour ces mêmes espèces en présence du farnésol. Selon **Inouye et coll., (2009)**, le carvacrol utilisé à une concentration inférieure ou égale à 2mg/mL inhibe la formation des hyphes de *Candida albicans* de la même manière que le farnésol.

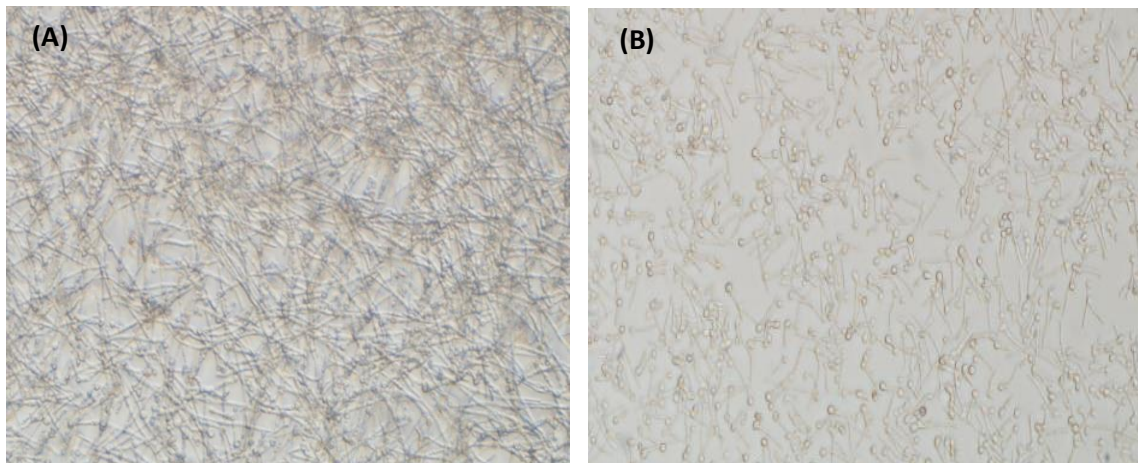


Photo n°03 : Effet inhibiteur du carvacrol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 5. (A) Biofilms non traités (contrôle). (B) Biofilms traités avec le carvacrol à 2xCMI (Grossissement×400).

Par ailleurs, lorsque le carvacrol est incorporé à des biofilms multi-espèces matures à une concentration égale à sa CMI, le taux d'inhibition passe de 50% pour *Candida albicans*5 seule à 40% pour *Candida albicans*5/*Providencia stuartii*3/*Staphylococcus aureus*6, de 55% pour *Candida albicans*6 à 39% pour *Candida albicans*6/*Acinetobacter baumannii*7 /*Staphylococcus aureus*11 et de 55% pour *Candida albicans*10 à 50% pour *Candida albicans*10/*Acinetobacter baumannii*11. Cette différence réside probablement dans la production excessive des matériaux de la matrice extracellulaire par les biofilms mixtes (*Candida albicans*/*staphylococcus* sp) (Carolus et coll., 2019).

b. Cuminaldéhyde

Les résultats relatifs à l'effet inhibiteur du cuminaldéhyde sur des biofilms mono et multi-espèces au cours des trois phases de leur développement sont représentés sur la figure n°18.

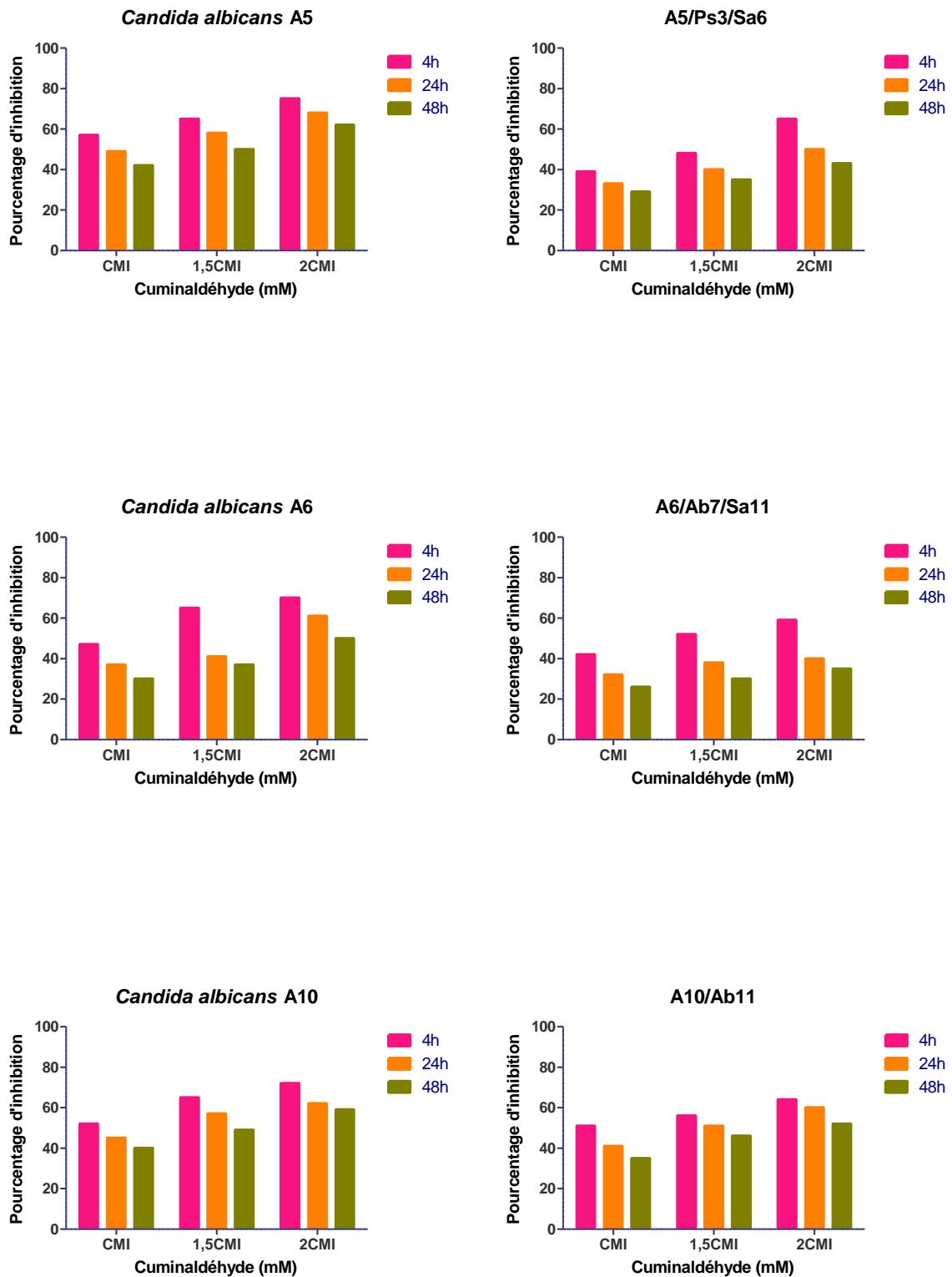


Figure n°18 : Taux d'inhibition des biofilms mono et multi-espèces par le cuminaldéhyde au cours des trois phases de leur développement

Nous constatons que les taux d'inhibition enregistrés pendant les trois phases de formation des biofilms mono-espèces sont plus élevés que ceux obtenus pour les biofilms mixtes. Les meilleurs taux d'inhibition étant obtenus lorsque le cuminaldéhyde est ajouté, pendant la phase d'adhésion initiale (4h), à une concentration équivalente à deux fois sa CMI pour toutes les souches testées. Ce taux est estimé à environ 72% pour les biofilms mono-espèces et à 63% pour les biofilms multi-espèces.

La **photo n°04** met en évidence l'effet inhibiteur du cuminaldéhyde du biofilm formé par *Candida albicans*⁶ à une concentration égale à deux fois sa CMI. Le nombre de levures est réduit, néanmoins, les hyphes formés sont plus longs comparés aux morphologies obtenues pour les levures traitées avec le farnésol et le carvacrol.

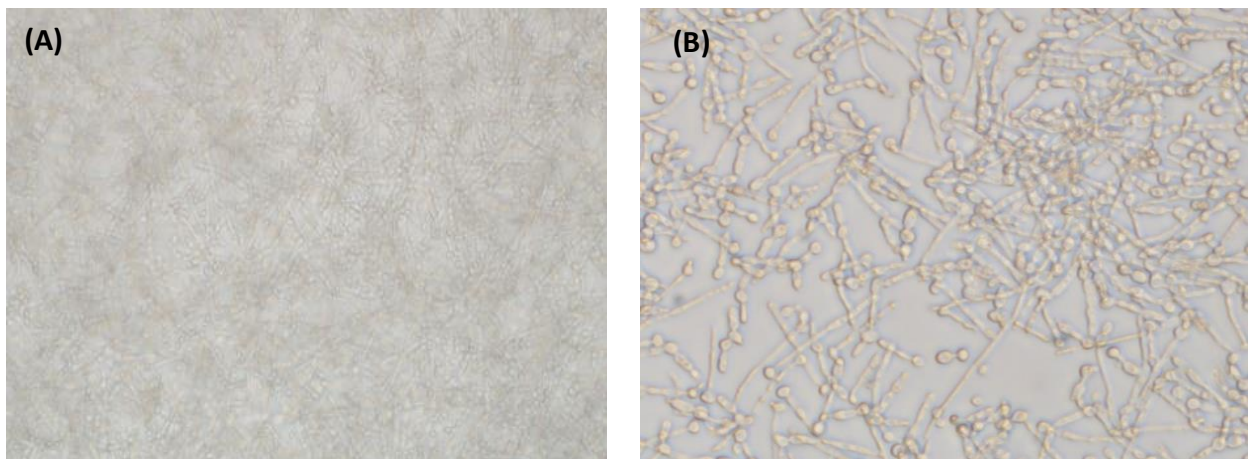


Photo n°04 : Effet inhibiteur du cuminaldéhyde sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 6. (A) Biofilms non traités (contrôle). (B) Biofilms traités avec le cuminaldéhyde à 2xCMI (Grossissement×400).

Cependant, lorsque le cuminaldéhyde est ajouté à des biofilms matures à une concentration égale à sa CMI, le taux d'inhibition passe de 42% pour *Candida albicans*⁵ seule à 30% pour *Candida albicans*⁵/*Providencia stuartii*³/*Staphylococcus aureus*⁶, de 30% pour *Candida albicans*⁶ à 23% pour *Candida albicans*⁶/*Acinetobacter baumannii*⁷/*Staphylococcus aureus*¹¹ et de 40% pour *Candida albicans*¹⁰ à 35% pour *Candida albicans*¹⁰/*Acinetobacter baumannii*¹¹.

Il ressort de cette partie de l'étude que les terpénoïdes endogènes (farnésol) et exogènes (carvacrol et cuminaldéhyde) inhibent d'une manière significative les biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par les souches que nous avons testées. Cet effet inhibiteur est plus important lorsque les terpénoïdes sont ajoutés au cours de la phase d'adhésion initial. Selon **Marcos-Arias et coll., (2011)**, les terpénoïdes provoquent des modifications de la perméabilité et de la fluidité membranaire des levures du genre *Candida*, ce qui affecte leur adhésion aux différentes surfaces.

2.2. Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces par les associations de terpénoïdes

L'effet inhibiteur des terpenoïdes associés est évalué uniquement pendant la phase d'adhésion initiale c'est-à-dire, après 4 heures d'incubation à 37°C.

2.2.1. Farnésol/Carvacrol

Le tableau n°10 regroupe les résultats relatifs aux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et aux Indices des Concentrations Inhibitrices Fractionnaires (FICI) du farnésol associé au carvacrol vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*.

Tableau n°10 : CMI et FICI du farnésol associé au carvacrol vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

Souches	SCMI (mM)			FICI	Interactions
	Farnésol	Carvacrol	Farnésol/ Carvacrol		
A5	6	13,3	1,5/3,3	0,49	Synergie
A6	24	5	3/1,7	0,46	Synergie
A10	6	10	1,5/1,7	0,42	Synergie

L'association farnésol/carvacrol induit une diminution importante des SCMI pour chaque terpénoïde testé seul. Elles varient de 1,5 à 3mM pour le farnésol et de 1,7 à 3,3mM pour le carvacrol.

Les SCMI de farnésol sont 8 fois inférieures pour *Candida albicans*6 et 4 fois pour *Candida albicans* 5 et *Candida albicans* 10. De même, les concentrations du carvacrol associé au farnésol sont 6 fois inférieures pour *Candida albicans*10, 4 fois pour *Candida albicans*5 et 2 fois pour *Candida albicans*6 par rapport au carvacrol testé seul. Le calcul des FICI a donné des valeurs comprises entre 0,42 et 0,49. Il s'agit d'une interaction synergique pour toutes les souches testées.

La photo n°05 met en évidence l'inhibition du biofilm mono-espèce de *Candida albicans* 10 par l'association farnésol/carvacrol. Les levures présentent une morphologie en blastospores avec absence d'hyphes et de pseudohyphes.

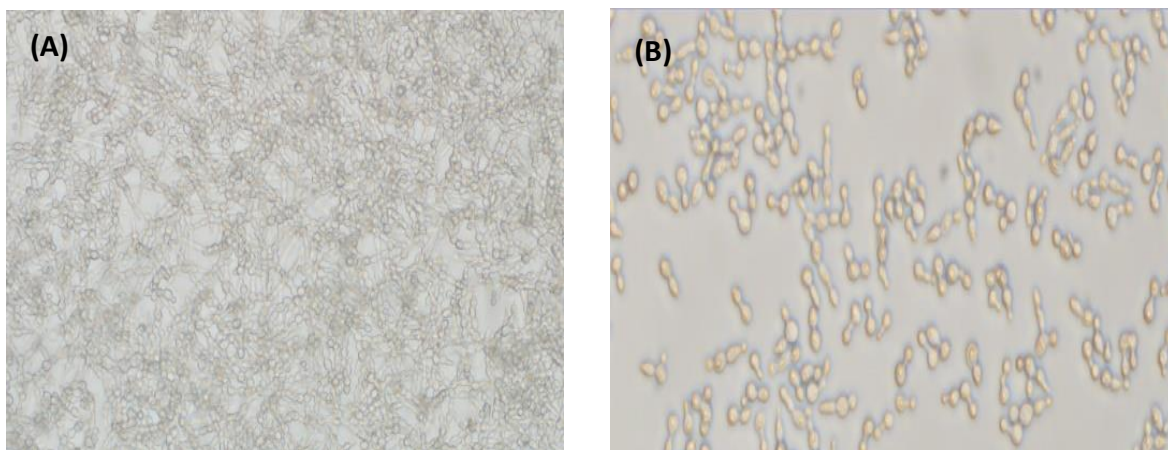


Photo n°05 : Effet inhibiteur de l'association farnésol/carvacrol sur la formation de biofilms mono-espèces de *Candida albicans* 10. (A) Biofilms non traités (contrôle). (B) Biofilms traités avec 1,5mM/1,7mM de la combinaison farnésol/carvacrol. (Grossissement×400).

Le tableau n°11 regroupe les résultats relatifs aux CMI et des FICI du farnésol associé au carvacrol vis-à-vis des biofilms mixtes de *Candida albicans*/bactéries.

Tableau n°11 : CMI et FICI du farnésol associé au carvacrol vis-à-vis des biofilms mixtes de *Candida albicans*/bactéries

Biofilms mixtes	SCMI (mM)			FICI	Interactions
	Farnésol	Carvacrol	Farnésol /carvacrol		
<i>C.albicans</i> 5/ <i>P.stuartii</i> 3/ <i>S.aureus</i> 6	6	13,3	3/3,3	0,74	Indifférence
<i>C.albicans</i> 6/ <i>A.baumannii</i> 7 / <i>S.aureus</i> 11	48	6,7	6/3,3	0,61	Indifférence
<i>C.albicans</i> 10/ <i>A.baumannii</i> 11	24	13,3	1,5/1,7	0,19	Synergie

Les SCMI de l'association farnésol/carvacrol vis-à-vis des biofilms mixtes sont inférieures à celles obtenues pour ces deux terpénoïdes testés séparément. Elles sont comprises entre 1,5 et 6mM pour le farnésol et entre 1,7 et 3,3mM pour le carvacrol. Le calcul des FICI a montré que l'interaction entre le farnésol et le carvacrol pour les biofilms multi-espèces est de type synergique pour *C.albicans*10/*A.baumannii*11 et indifférente pour *C.albicans*5/ *P.stuartii*3/*S.aureus*6 et *C.albicans*6/ *A.baumannii*7 /*S.aureus*11.

Selon **Gaddy et coll., (2009)**, *Acinetobacter baumannii* possède dans sa membrane externe une protéine (OmpA), impliquée dans le mécanisme de fixation et de destruction de la forme filamenteuse de *Candida albicans* en déclenchant l'apoptose. De plus, la production d'une quantité importante du farnésol par *Candida albicans* perturbe l'intégrité membranaire d'*Acinetobacter baumannii* (**Kostoulas et coll., 2016**).

2.2.2. Farnésol/Cuminaldéhyde

Les SCMI et les FICI de l'association farnésol/cuminaldéhyde vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* sont regroupés sur le tableau n°12.

Tableau n°12 : CMI et FICI de l'association farnésol/cuminaldéhyde vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

Souches	SCMI (mM)			FICI	Interactions
	Farnésol	Cuminaldéhyde	Farnésol/cuminaldéhyde		
A5	6	54	3/13,5	0,75	Indifférence
A6	24	40,5	3/13,5	0,45	Synergie
A10	6	54	1,5/13,5	0,5	Synergie

L'association farnésol/cuminaldéhyde implique une interaction synergique pour la souche A6 et A10. En revanche, la souche A5 montre une interaction indifférente.

Une diminution des SCMI est observée pour l'association farnésol/cuminaldéhyde qui peut atteindre un facteur de 8 pour le farnésol et un facteur de 4 pour le cuminaldéhyde.

Le tableau n°13 regroupe les résultats relatifs aux SCMI et des FICI de farnésol associée au cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes *Candida albicans*/bactéries.

Tableau 13 : CMI et FICI du farnésol associé au cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes de *Candida albicans*/bactéries

Biofilms mixtes	SCMI (mM)			FICI	Interactions
	Farnésol	Cuminaldéhyde	Farnésol/ cuminaldéhyde		
<i>C.albicans</i> 5/ <i>P.stuartii</i> 3/ <i>S.aureus</i> 6	6	54	3/27	1,00	Indifférence
<i>C.albicans</i> 6/ <i>A.baumannii</i> 7 / <i>S.aureus</i> 11	24	54	6/13,5	0,5	Synergie
<i>C.albicans</i> 10/ <i>A.baumannii</i> 11	6	54	1,5/27	0,75	Indifférence

Les résultats obtenus montrent que les SCMI de l'association farnésol/cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes sont inférieures à celles enregistrées pour les deux terpénoïdes testés seuls.

Le calcul des FICI a montré que l'interaction entre les deux terpénoïdes est de type synergique pour *C.albicans*6/*A.baumannii*7/*S.aureus*11 et indifférente pour *C.albicans*5/ *P.stuartii*3/*S.aureus*6 et *C.albicans*10/*A.baumannii*11.

2.2.3. Carvacrol/cuminaldéhyde

Les valeurs des CMI et des FICI de l'association carvacrol/cuminaldéhyde vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* sont regroupées dans le tableau n°14.

L'association carvacrol/cuminaldéhyde, entraîne une diminution des SCMI d'un facteur de 12 pour *Candida albicans*¹⁰, de 6 pour *Candida albicans*⁶ et de 4 pour *Candida albicans*⁵.

Les indices des concentrations inhibitrices fractionnaires sont compris entre 0,34-0,49, il s'agit, par conséquent, d'une interaction synergique entre le carvacrol et le cuminaldéhyde.

Tableau 14 : CMI et FICI du carvacrol associé au cuminaldéhyde vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*

Souches	SCMI (mM)			FICI	Interactions
	Carvacrol	Cuminaldéhyde	Carvacrol / Cuminaldéhyde		
A5	13,3	54	3,3/13,5	0,49	Synergie
A6	5	40,5	0,8/13,5	0,49	Synergie
A10	10	54	0,8/13,5	0,34	Synergie

Le tableau n°15 regroupe les SCMI et les FICI de l'association carvacrol/cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes de *Candida albicans*/bactéries.

Tableau 15 : CMI et FICI du carvacrol associé au cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes de *Candida albicans*/bactéries

Biofilms mixtes	SCMI (mM)			FICI	Interactions
	Carvacrol	Cuminaldéhyde	Carvacrol / Cuminaldéhyde		
<i>C.albicans</i> 5/ <i>P.stuartii</i> 3/ <i>S.aureus</i> 6	13,3	54	3,3/13,5	0,49	Synergie
<i>C.albicans</i> 6/ <i>A.baumannii</i> 7 / <i>S.aureus</i> 11	6,7	54	1,7/27	0,75	Indifférence
<i>C.albicans</i> 10/ <i>A.baumannii</i> 11	13,3	54	1,7/27	0,62	Indifférence

Les SCMI de l'association carvacrol/cuminaldéhyde vis-à-vis des biofilms mixtes de *Candida albicans*/bactéries sont inférieures à celles obtenues pour les deux terpénoïdes testés séparément. Elles varient de 1,7 à 3,3mM pour le carvacrol et de 13,5 à 27mM pour le cuminaldéhyde.

Le calcul des FICI a montré que l'interaction entre les deux terpénoïdes est de type synergique pour le biofilm mixte *Candida albicans*5/*Providencia stuartii*3/*Staphylococcus aureus*6 et indifférente pour les deux biofilms mixtes *Candida albicans*6/*Acinetobacter baumannii*7/*Staphylococcus aureus*11 et *Candida albicans*10/*Acinetobacter baumannii*11.

Bien que le mécanisme d'action du carvacrol et de cuminaldéhyde sur les biofilms reste encore mal connu, leur nature amphipathique pourrait expliquer le phénomène de synergie observé. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'hydrophilie de ces deux terpénoïdes permet leur diffusion à travers la matrice polysaccharidique polaire, tandis que les propriétés hydrophobes prévalentes de ces composés peut conduire à des interactions spécifiques avec les chaînes d'acides gras des phospholipides de la membrane, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité [(El abed et coll., 2011) ; (Miranda-Cadena et coll., 2021)].

Quatrième partie

Conclusion générale

L'utilisation des dispositifs médicaux implantés a connu un accroissement considérable depuis quelques décennies. Malgré que ces outils thérapeutiques jouent un rôle essentiel en assurant la survie et en améliorant le quotidien des patients, ils sont des substrats idéaux pour le développement de biofilms pouvant être à l'origine de plusieurs infections invasives.

C'est pourquoi, plusieurs travaux se sont intéressés au développement de nouvelles approches thérapeutiques ayant pour principal objectif, l'inhibition de ces structures polymicrobiennes.

L'identification des extraits de plantes dotés d'une activité anti-biofilms a été proposée en tant que stratégie alternative. Le développement des moyens de prévention qui empêchent la formation de biofilms en inhibant l'adhérence des microorganismes colonisateurs constitue également une approche intéressante. C'est ainsi que l'étude de l'effet des molécules du quorum-sensing nécessaires à la maturation du biofilm semble être une voie prometteuse dans la lutte antibiofilms.

Partant de ces données nous avons entrepris cette étude qui a porté sur la formation et l'inhibition des biofilms mixtes (*Candida albicans*/bactéries) isolées des dispositifs médicaux du CHU de Tlemcen.

Les souches isolées ont fait l'objet des tests de sensibilité à trois antifongiques systémiques, l'amphotéricine B, le voriconazole et la caspofungine seuls et combinés, d'une évaluation de leur potentiel à former des biofilms mixtes *in vitro*. L'effet inhibiteur de terpénoïdes endogènes (le farnésol) et exogènes (le carvacrol et le cuminaldéhyde) seuls et associés vis-à-vis des biofilms mono et multi-espèces a été évalué. La détermination des différents types d'infectivités a été également étudiée.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Sur les 340 dispositifs prélevés, 128 présentent une culture positive ce qui correspond à un taux d'altération globale de 37,6%.

- Le calcul des taux d'altérations par service a montré que l'anesthésie-réanimation occupe la première place avec un taux de 89% suivi de la neurologie médicale et de la chirurgie ortho-traumatologie avec des taux respectifs de 21,3% et 12%.

- L'origine d'altération diffère d'un service à l'autre. Cela dépend de la nature des dispositifs utilisés.

- Les altérations causées par les bactéries seules occupent la première place avec un taux de 47%, suivies des altérations mixtes avec un taux de 39%. Les altérations levuriennes représentent 14% et cela, dans les trois services étudiés.
- 61,7% des cathéters positifs étaient infectés, 29,68% colonisés et 9% contaminés. Ceci pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs de risque dont l'exposition à une antibiothérapie à large spectre et la durée de mise en place des dispositifs médicaux.
- Sur les 128 prélèvements positifs, soixante et onze (71) levures et cent soixante-trois (163) bactéries sont isolées et identifiées.
- Quinze (15) levures de *Candida albicans* sont isolées dont treize (13) cohabitent avec une ou deux bactéries sur un même dispositif médical, il s'agit d'altération multi-espèces ou mixtes.
- Le type d'infectivité de l'altération mixte (*Candida albicans*/bactéries) dépend de la nature du dispositif médical utilisé. Toutes les infections enregistrées dans le service d'anesthésie-réanimation du CHU de Tlemcen sont associées à l'utilisation de sondes vésicales. En revanche, les colonisations sont retrouvées sur les sondes vésicales (80%) et sur les cathéters veineux centraux (20%).
- A l'état planctonique, tous les isolats cliniques de *Candida albicans* sont sensibles aux trois antifongiques testés avec des concentrations minimales inhibitrices allant de 0,25 à 1µg/mL pour l'amphotéricine B, de 0,03 à 0,5µg/mL pour le voriconazole et de 0,03 à 0,25µg/mL pour la caspofungine.
- A l'état sessile, les SCMI des trois antifongiques testés vis-à-vis des cellules de *Candida albicans* varient de 2 à 64µg/mL pour l'amphotéricine B, de 2 à 128µg/mL pour le voriconazole et de 1 à 64µg/mL pour la caspofungine.
- Selon les intervalles fixés par **Villar-Vidal et coll., (2011)**, les isolats cliniques de *Candida albicans* sont classées dans deux catégories ; hautement et modérément producteurs de biofilms mono-espèces avec des taux respectifs de 31% et 69%.
- Les souches de *Candida albicans* présentent une grande variabilité de former des biofilms *in vitro* avec les bactéries co-isolées du même dispositif médical.
- L'activité métabolique du biofilm multi-espèces varie en fonction de l'espèce, du nombre bactérien associée à la levure et de la durée d'incubation.

- Le traitement des biofilms par des combinaisons d'antifongiques a mis en évidence une interaction synergique de l'association amphotéricine B/voriconazole vis-à-vis dix souches de *Candida albicans* et indifférente vis-à-vis des trois souches.
- L'interaction de la combinaison amphotéricine B/caspofungine vis-à-vis des cellules sessiles est synergique ou indifférente avec des taux respectifs de 38% et 62%.
- Une diminution significative des SCMI est observée pour les deux associations testées vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*.
- Les trois terpénoïdes testés ont montré une inhibition efficace des différentes formes morphologiques de *Candida albicans*, levure, hyphes et biofilms et cela en fonction de la nature du terpénoïde.
- Le farnésol a inhibé efficacement la formation d'hyphes dans les biofilms mono-espèces par rapport aux biofilms multi-espèces.
- Quel que soit le terpénoïde testé (endogène ou exogène), les taux d'inhibition enregistrés pendant les trois phases de formation des biofilms mono-espèces sont plus élevés que ceux des biofilms mixtes. Le meilleur effet inhibiteur est obtenu lorsque les terpénoïdes sont ajoutés au cours de la phase d'adhésion initiale (4h).
- L'association des terpénoïdes a donné deux types d'interactions dont la synergie et l'indifférence vis-à-vis des biofilms mono-et multi-espèce de *Candida albicans*. Ce résultat va dans le même sens que ceux de **Lobo et ses collaborateurs, (2021)** qui ont mis en évidence une action synergique entre le farnésol et un flavonoïde dans un biofilm mixte de *Candida albicans*/ *Streptococcus mutans*.
- Les observations microscopiques ont montré qu'en l'absence de terpénoïde, *Candida albicans* développe un biofilm hétéromorphe, complexe caractérisé par la présence de blastospores, de pseudohyphes et d'hyphes. Cependant, après un traitement par les terpénoïdes seuls, les biofilms formés sont beaucoup moins denses avec réduction importante des blastospores et absence d'hyphes. Alors qu'en présence de l'association farnésol/carvacrol, les biofilms changent d'architecture et sont composés exclusivement de blastospores.

Pour continuer dans la voie de la recherche ouverte par cette étude, il serait intéressant de :

- Rechercher des altérations mixtes (Levures/bactéries), (levures/levures), (bactéries/bactéries) sur d'autres dispositifs médicaux ou sur des supports vivants (tissus vivants).
- Etudier le pouvoir d'inhibition des biofilms mixtes dans différentes conditions physico-chimiques.
- Evaluer l'efficacité des terpénoïdes seuls ou combinés vis-à-vis des biofilms mixtes formés *in vivo*.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Al Mohajer M., Darouiche R.O. (2013) Prevention and treatment of urinary catheter-associated infections. *Current infectious disease reports*, 15(2):116-23.
2. Alem M.A., Oteef M.D., Flowers T.H., Douglas L.J., (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell*, 5(10):1770-9.
3. Al-Fattani M.A., Douglas L.J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8):999-1008.
4. Alim D., Sircaik S., Panwar S.L., (2018) The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: an emerging perspective. *Journal of Fungi*, 4(4):140.
5. Alvarez-Rueda N., Rouges C., Touahri A., Misme-Aucouturier B., Albassier M., Pape P.L. (2020) *In vitro* immune responses of human PBMCs against *Candida albicans* reveals fungal and leucocyte phenotypes associated with fungal persistence. *Scientific reports*, 10(1):1-16.
6. Armbruster C.E., Forsyth-DeOrnellas V., Johnson A.O., Smith S.N., Zhao L., Wu W., et al. (2017) Genome-wide transposon mutagenesis of *Proteus mirabilis*: essential genes, fitness factors for catheter-associated urinary tract infection, and the impact of polymicrobial infection on fitness requirements. *PLoS pathogens*, 13(6):e1006434.
7. Arnaud M.B., Costanzo M.C., Shah P., Skrzypek M.S., Sherlock G. (2009) Gene Ontology and the annotation of pathogen genomes: the case of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 17(7):295-303.
8. Atriwal T., Azeem K., Husain F.M., Hussain A., Khan M.N., Alajmi M.F. et al. (2021) Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 12:932.
9. Bandara H., Yau J., Watt R., Jin L., Samaranyake L. (2009) *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. *Journal of medical microbiology*, 58(12):1623-31.
10. Barchiesi F., Spreghini E., Tomassetti S., Giannini D., Scalise G. (2007) Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(3):941-5.
11. Bendjelloul M., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2016) Study of strains of *Candida spp.* Isolated from catheters in UHC of Oran (Algeria): Identification and antifungal susceptibility. *Journal de mycologie medicale*, 26(3):212-6.

12. Blackman L.D., Qu Y., Cass P., Locock K.E. (2021) Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents. *Chemical Society Reviews*, 50(3):1587-616.
13. Bojsen R., Regenber B., Folkesson A. (2014) *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC microbiology*, 14(1):1-10.
14. Bonhomme J., d'Enfert C. (2013) *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Current opinion in microbiology*, 16(4):398-403.
15. Boucherit-Atmani Z., Seddiki S., Boucherit K., Sari-Belkharoubi L., Kunkel D. (2011) *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de mycologie médicale*, 21(3):182-7.
16. Braga P.C., Culici M., Alfieri M., Dal Sasso M. (2008) Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 31(5):472-7.
17. Brikci-Benhabib O.B., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2016) Fungal biofilms: Confusion between tolerance and resistance drugs. *Journal de mycologie médicale*, 26(3):286-7.
18. Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S., Rapin M. (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Archives of internal medicine*, 147(5):873-7.
19. Carolus H., Van Dyck K., Van Dijck P. (2019) *Candida albicans* and *Staphylococcus species*: a threatening twosome. *Frontiers in microbiology*, 10:2162.
20. CASFM. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2015.
21. Cavalheiro M., Teixeira M.C. (2018) *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine* 2018;5:28.
22. Cepas V., López Y., Gabasa Y., Martins C.B., Ferreira J.D., Correia M.J., et al. (2019) Inhibition of bacterial and fungal biofilm formation by 675 extracts from microalgae and cyanobacteria. *Antibiotics*, 8(2):77.
23. Černáková L., Jordao L., Bujdáková H. (2018) Impact of farnesol and Corsodyl® on *Candida albicans* forming dual biofilm with *Streptococcus mutans*. *Oral Diseases*, 24(6):1126-31.

24. Chen H. F. et Lan C. Y. (2015). Role of SFP1 in the regulation of *Candida albicans* biofilm formation. *PLoS One*, 10(6), e0129903.
25. Choi J.Y., Kwak Y.G., Yoo H., Lee S.O., Kim H.B., Han S.H. et al. (2016) Trends in the distribution and antimicrobial susceptibility of causative pathogens of device-associated infection in Korean intensive care units from 2006 to 2013: results from the Korean Nosocomial Infections Surveillance System (KONIS). *Journal of Hospital Infection*, 92(4):363-71.
26. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute 2006.
27. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3.2008. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
28. Cordeiro R.A., Teixeira C.E., Brilhante R.S., Castelo-Branco D.S., Paiva M.A., Giffoni Leite J.J., et al. (2013) Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Medical mycology*, 51(1):53-9.
29. Dagi H.T., Findik D., Senkeles C., Arslan U. (2016) Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from bloodstream infections in Konya, Turkey. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 15(1):36.
30. Dalleau S., Cateau E., Bergès T., Berjeaud J. M., Imbert C. (2008) *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 31(6), 572-576.
31. Dantas-Medeiros R., Zanatta A.C., de Souza L.B.F.C., Fernandes J.M., Amorim-Carmo B., Torres-Rêgo M. et al. (2021) Antifungal and Antibiofilm Activities of B-Type Oligomeric Procyanidins From *Commiphora leptophloeos* Used Alone or in Combination With Fluconazole Against *Candida* spp. *Frontiers in microbiology*, 27.
32. Desai J.V. (2018) *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. *Journal of Fungi*, 4(1):10.
33. Doke S.K., Raut J.S., Dhawale S., Karuppayil S.M. (2014) Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. *The Journal of general and applied microbiology*, 60(5), 163-168.
34. Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2):167-93.
35. Douglas L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1):30-6.

36. El Abed S., Houari A., Latrache H., Remmal A., Koraichi S.I. (2011) *In vitro* activity of four common essential oil components against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Microbiology*, 6(4):394.
37. Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010) Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(426):51-63.
38. Fakhim H., Chowdhary A., Prakash A., Vaezi A., Dannaoui E., Meis J.F., et al. (2017) *In vitro* interactions of echinocandins with triazoles against multidrug-resistant *Candida auris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11):01056-17.
39. Fernandes R.A., Monteiro D.R., Arias L.S., Fernandes G.L., Delbem A.C.B., Barbosa D.B. (2016) Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*, 32(3):329-38.
40. Filleron A., Jumas-Bilak E. (2015) Implantation du microbiote intestinal chez l'enfant: ontogenèse d'une niche écologique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(469):27-35.
41. Finkel J.S., Mitchell A.P. (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2):109-18.
42. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Potretzke A., Schreiber IV H.L., Pinkner J.S., Bauman T.M. et al. (2016) Antibody-based therapy for enterococcal catheter-associated urinary tract infections. *MBio*, 7(5), e01653-16.
43. Fox E., Cowley E., Nobile C., Hartooni N., Newman D., Johnson A. (2014) Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Current biology*, 24(20):2411-6.
44. Gaddy J.A., et Actis L.A. (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation.
45. Gajdács M., Dóczy I., Ábrók M., Lázár A., Burián K. (2019) Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: results from a 10-year retrospective survey. *Central European journal of urology*, 72(2):209.
46. Galvan E.M., Mateyca C., Ielpi L. (2016) Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed *in vitro* by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*, 32(9):1067-77.

47. Gaston J.R., Johnson A.O., Bair K.L., White A.N., Armbruster C.E. (2021) Polymicrobial interactions in the urinary tract: is the enemy of my enemy my friend? *Infection and Immunity*, 89(4):e00652-20.
48. Ghosh S., Kebaara B.W., Atkin A.L., Nickerson K.W. (2008) Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23):7211-8.
49. Gulati M., Nobile C.J. (2016) *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5):310-21.
50. Gunsalus K.T., Tornberg-Belanger S.N., Matthan N.R., Lichtenstein A.H., Kumamoto C.A. (2016) Manipulation of host diet to reduce gastrointestinal colonization by the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *MSphere*, 1(1):e00020-15.
51. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2):95-108.
52. Hamzah H., Pratiwi S.U.T., Hertiani T. (2021) Efficacy Of C-10 Massoialactone against-Multispecies Microbial Biofilm.
53. Hassaine-Lahfa I., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkherroubi L., Boucherit K. (2017) Retrospective study of *Candida sp.* Contaminations of endoscopes at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *Journal de Mycologie Médicale*, 27(2):127-32.
54. Hawser S.P., Douglas L.J. (1994) Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and immunity*, 62(3):915-21.
55. Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R. et al. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*, 67(7):2982-92.
56. Ibarra-Trujillo C., Villar-Vidal M., Gaitán-Cepeda L.A., Pozos-Guillen A., Mendoza-de Elias R., Sánchez-Vargas L.O. (2012) Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(4):214-22.
57. Íñigo M., Del Pozo J.L. (2018) Fungal biofilms: From bench to bedside. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(Suppl 1):35.

58. Inouye S., Takahashi M., Abe S. (2009) Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 50(4):243-51.
59. Jacobsen S.M, Shirtliff M.E. (2011) *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*, 2(5):460-5.
60. Jung P., Mischo C.E., Gunaratnam G., Spengler C., Becker S.L., Hube B. et al. (2020). *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence*, 11(1), 1453-1465.
61. Kamble V.A. (2015) *In vitro* anti-fungal activity of *Cuminum cyminum* (cumin seed) essential oil against clinical isolates of *Candida* species. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 3:264-75.
62. Kart D., Ciftci S.Y., Nemutlu E. (2020) Altered metabolomic profile of dual-species biofilm: Interactions between *Proteus mirabilis* and *Candida albicans*. *Microbiological research*, 230:126346.
63. Katragkou A., McCarthy M., Meletiadis J., Petraitis V., Moradi P.W., Strauss G.E., et al. (2014) *In vitro* combination of isavuconazole with micafungin or amphotericin B deoxycholate against medically important molds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(11):6934-7.
64. Kaur H., Rohlik G.M., Nemergut M.E., Tripathi S. (2016) Comparison of staff and family perceptions of causes of noise pollution in the Pediatric Intensive Care Unit and suggested intervention strategies. *Noise and Health*, 18(81):78.
65. Klingspor L., Tortorano A.M., Peman J., Willinger B., Hamal P., Sendid B., et al. (2015) Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)(2006–2008). *Clinical Microbiology and Infection*, 21(1):87. e1-e10.
66. Kostoulias X., Murray G.L., Cerqueira G.M., Kong J.B., Bantun F., Mylonakis E., Khoo C.A., Peleg A.Y. (2016) Impact of a cross-kingdom signaling molecule of *Candida albicans* on *Acinetobacter baumannii* physiology. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(1), 161-167.
67. Kuhn D., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P., Ghannoum M. (2003) Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of clinical microbiology*, 41(1):506-8.

68. Kuhn D., Chandra J., Mukherjee P., Ghannoum M. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*, 70(2):878-88.
69. Kullberg B.J., Arendrup M.C. (2015) Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15):1445-56.
70. LaFleur M.D., Kumamoto C.A., Lewis K. (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11):3839-46.
71. Lee K.H., Park S.J., Choi S.J., Park, J.Y. (2017) *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* decrease *Candida albicans* biofilm formation by suppressing morphological transition to its hyphal form. *Yonsei Medical Journal*, 58(6), 1135-1143.
72. Lewis R.E. (2010) Antifungal therapeutic drug monitoring. *Current fungal infection reports*, 4(3):158-67.
73. Lobo C.I.V., Lopes A.C., Klein M.I. (2021) Compounds with distinct targets present diverse antimicrobial and antibiofilm efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and combinations of compounds potentiate their effect. *Journal of Fungi*, 7(5), 340.
74. Lohse M.B., Gulati M., Craik C.S., Johnson A.D., Nobile C.J. (2020) Combination of antifungal drugs and protease inhibitors prevent *Candida albicans* biofilm formation and disrupt mature biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11:1027.
75. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. (2018) Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1):19-31.
76. Lohse M.B., Gulati M., Valle Arevalo A., Fishburn A., Johnson A.D., Nobile C.J. (2017) Assessment and optimizations of *Candida albicans* *in vitro* biofilm assays. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5):e02749-16.
77. Lolom I., Deblangy C., Capelle A., Guerinot W., Bouvet E., Barry B. et al. (2009) Impact d'un programme prolongé d'amélioration continue de la qualité sur le risque infectieux lié aux cathéters veineux périphériques. *La Presse Médicale*, 38(1):34-42.
78. Mah T-FC., O'Toole G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1):34-9.

79. Marcos-Arias C., Eraso E., Madariaga L., Quindós G. (2011) *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1):1-7.
80. Miranda-Cadena K., Marcos-Arias C., Mateo E., Aguirre-Urizar J.M., Quindós G., Eraso E. (2021) *In vitro* activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112218.
81. Mitchell K.F., Zarnowski R., Andes D.R. (2016) Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS pathogens*, 12(9):e1005828.
82. Nicolle L.E. (2014) Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial resistance and infection control*, 3(1):1-8.
83. Nobile C.J., Johnson A.D. (2015) *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual review of microbiology*, 69:71.
84. Odds F., Webster C., Mayuranathan P., Simmons P. (1988) *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *Journal of medical and veterinary mycology*, 26(5):277-83.
85. Odoki M., Almustapha Aliero A., Tibyangye J., Nyabayo Maniga J., Wampande E., Drago Kato C., et al. (2019) Prevalence of bacterial urinary tract infections and associated factors among patients attending hospitals in Bushenyi district, Uganda. *International journal of microbiology*, 2019.
86. Oubihi B., Zoubir M. (2015) Epidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation. Université Cadi Ayyad de Marrakech (Maroc).
87. Oz Y., Dag I., Kiraz N. (2012) Broth Microdilution and Time–Kill Testing of Caspofungin, Voriconazole, Amphotericin B and their Combinations Against Clinical Isolates of *Candida krusei*. *Mycopathologia*, 173(1):27-34.
88. Öztürk Y.B., Yenice Gürsu B., Dağ İ. (2022) *In vitro* effect of farnesol on planktonic cells and dual biofilm formed by *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Biofouling*, 1-12.
89. Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., Ostrosky-Zeichner L., Kullberg B.J. (2018) Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1):1-20.
90. Pathak D.T., Wei X., Bucuvalas A., Haft D.H., Gerloff D.L., Wall D. (2012) Cell contact–dependent outer membrane exchange in Myxobacteria: genetic determinants and mechanism. *PLoS genetics*, 8(4):e1002626.

91. Pathirana R.U., McCall A.D., Norris H.L., Edgerton M. (2019) Filamentous non-*albicans* *Candida* species adhere to *Candida albicans* and benefit from dual biofilm growth. *Frontiers in microbiology*, 1188.
92. Pereira L.D., Vila T., Borba-Santos L.P., Souza W., Navarro M., Rozental S. (2020) Activity of metal-azole complexes against biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Current Pharmaceutical Design*, 26(14):1524-31.
93. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L., Mowat E., Ramage G., et al. (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.
94. Pierce C.G., Vila T., Romo J.A., Montelongo-Jauregui D., Wall G., Ramasubramanian A., Lopez-Ribot, J.L. (2017) The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *Journal of Fungi*, 3(1), 14.
95. Polke M., Leonhardt I., Kurzai O., Jacobsen ID. (2018) Farnesol signalling in *Candida albicans*—more than just communication. *Critical reviews in microbiology*, 44(2):230-43.
96. Quinet B. (2006) Central venous catheter: epidemiology, diagnosis, prevention and treatment of infectious complications. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*, 13(6):718-20.
97. Ramage G., Rajendran R., Williams C. (2012) *Fungal biofilm resistance*. *International journal of microbiology*, 2012.
98. Ramage G., Saviile S.P., Wickes B.L., López-Ribot J.L. (2002) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11):5459-63.
99. Ramage R. (2009) Synthesis of sesquiterpenoids of biogenetic importance. *Further Perspectives in Organic Chemistry*, 67.
100. Revankar S.G. (2021) *Candidiasis invasives*. *Infectious diseases*, 2nd edn. ASM Press.
101. Riekhof W.R., Nickerson K. (2017) Quorum sensing in *Candida albicans*: farnesol versus farnesoic acid.
102. Rodrigues C.F., Alves D.F., Henriques M. (2018) Combination of Posaconazole and Amphotericin B in the Treatment of *Candida glabrata* Biofilms. *Microorganisms*, 6(4):123.

103. Rodrigues C.F., Černáková L. (2020) Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. *Genes*, 11(4):444.
104. Salinas C., Florentín G., Rodríguez F., Alvarenga N., Guillén R. (2022). Terpenes Combinations Inhibit Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* by Interfering with Initial Adhesion. *Microorganisms*, 10(8), 1527.
105. Santos A.L.S., Galdino A.C.M., Mello T.P., Ramos L.S., Branquinha M.H., Bolognese A.M. et al. (2018) What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113.
106. Scaffaro R., Lopresti F., D'Arrigo M., Marino A., Nostro A. (2018) Efficacy of poly (lactic acid)/carvacrol electrospun membranes against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in single and mixed cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(9):4171-81.
107. Schmalz-Ott S., Monti M., Vollenweider P. (2008) Mise en place d'un cathéter veineux central chez l'adulte. *Rev Med Suisse*, 4:2343-8.
108. Seddiki S.M.L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K, Badsı-Amir S., Taleb M., Kunkel D. (2013) Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *International journal of general medicine*, 6:1.
109. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Belkherroubi-Sari L., Boucherit K. (2014) Catheterization and fungal infection risk in the University Hospital of Tlemcen: epidemiology and susceptibility to antifungals. *Journal de mycologie medicale*, 24(4):e179-84.
110. Seghir A. (2015) Recherche de biofilms mixtes sur cathéters veineux périphériques au CHU de Tlemcen. These de doctorat
111. Selek M.B., Atik T. K., Bektöre B., Atik B., Demir S., Baylan O., Özyurt M. (2016) First report of macroscopic biofilm formation caused by *Candida albicans* on silver hydrogel-coated urinary catheters. *American Journal of Infection Control*, 44(10), 1174-1175.
112. Silva J.P.B., Peres A.R.M.N., Paixão T.P., Silva A.S.B., Baetas A.C., Barbosa W.L.R. et al. (2017) Antifungal activity of hydroalcoholic extract of *Chrysobalanus icaco* against oral clinical isolates of *Candida* species. *Pharmacognosy Research*, 9(1):96.

113. Stéphan F., Bah M.S., Desterke C., Rézaiguia-Delclaux S., Foulet F., Duvaldestin P., Bretagne S. (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clinical infectious diseases*, 35(12), 1477-1483.
114. Sudbery P., Gow N., Berman J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7):317-24.
115. Talaat M., Hafez S., Saied T., Elfeky R., El-Shoubary W., Pimentel G. (2010) Surveillance of catheter-associated urinary tract infection in 4 intensive care units at Alexandria university hospitals in Egypt. *American journal of infection control*, 38(3):222-8.
116. Tao L., Segil N. (2015) Early transcriptional response to aminoglycoside antibiotic suggests alternate pathways leading to apoptosis in sensory hair cells in the mouse inner ear. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9:190.
117. Tobudic S., Kratzer C., Lassnigg A., Graninger W., Presterl E. (2009) *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(2):271-4.
118. Tomlin K.L., Malott R.J., Ramage G., Storey D.G., Sokol P.A., Ceri H. (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9):5208-18.
119. Tumbarello M., Fiori B., Treçarichi E.M., Posteraro P., Losito A.R., De Luca A. et al. (2012) Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PloS one*, 7(3):e33705.
120. Valentín A., Cantón E., Pemán J., Quindós G. (2007) Actividad *in vitro* de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4):272-277.
121. Valentín A., Canton E., Peman J., Martinez J. (2012) Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(10):2418-23.
122. Villar-Vidal M., Marcos-Arias C., Eraso E., Quindós, G. (2011) Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(9), 660-665.
123. Weber K., Sohr R., Schulz B., Fleischhacker M., Ruhnke M. (2008) Secretion of E, E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(5):1859-61.

-
124. Whiteway M., Bachewich C. (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual review of microbiology*, 61:529.
 125. Wisplinghoff H., Ebbers J., Geurtz L., Stefanik D., Major Y., Edmond MB. et al. (2014) Nosocomial bloodstream infections due to *Candida spp.* in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *International journal of antimicrobial agents*, 43(1):78-81.
 126. Xia J., Qian F., Xu W., Zhang Z., Wei X. (2017) *In vitro* inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of *Candida albicans* resistant strains. *Biofouling*, 33(4):283-93.