



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen

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

Département de Biologie

Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

présenté par

Mlle CHERIFI Loubna

en vue de l'obtention du

diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Contribution à l'étude des altérations fongiques buccodentaires d'enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

Soutenu le 13/06/2024, devant le jury composé de :

Dr. KAZI TANI-BABA AHMED Zahira Z.	Présidente	Université de Tlemcen
Pr. BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Encadreur	Université de Tlemcen
Dr. SEGHIR Abdelfettah	Examineur	Université de Tlemcen
Dr. HASSAINE-LAHFA Imene	Examinatrice	Université de Tlemcen

Année universitaire 2023/2024

ملخص:

بحثت هذه الدراسة عن تغيرات فطرية في تجاويف الفم لدى 20 طفلاً مصاباً بداء السكري من النوع الأول في مدينة تلمسان، تتراوح أعمارهم بين 3 و15 عامًا. 20 عينة تم أخذها بين فبراير ومارس 2024، أظهرت 8 عينات منها مزرعة إيجابية على وسط سابورو، وهو ما يمثل نسبة تغيرات بنسبة 40%. وقد توزعت هذه التغيرات بين 5 فتيات (62.5%) تتراوح أعمارهن بين 11 و13 عامًا و3 فتيان (37.5%) تتراوح أعمارهم بين 12 و14 عامًا.

وقد مكنتنا تحديد السلالات الثمانية المعزولة بواسطة Vitek2 من تعيينها جميعًا إلى فصيلة *Candida albicans*.

وأظهر اختبار الحساسية للعوامل المضادة للفطريات أن جميع السلالات كانت مقاومة للسيكلوهكسيميد ($CMI > 8$ ميكروغرام/مل). وفيما يتعلق بالأمفوتريسين ب، كانت 6 سلالات حساسة مع CMI ما بين 0.125 و1 ميكروغرام/ملتر، وكانت سلالتان مقاومتان بعد 24 و48 ساعة من الحضانة عند درجة حرارة 35 درجة مئوية (ميكروغرام/مل. $CMI > 8$)

شكلت جميع السلالات المعزولة أغشية حيوية في المختبر. كانت الكتلة الحيوية للأغشية الحيوية المتكونة بعد 48 ساعة من الحضانة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية أكبر من الكتلة الحيوية المتكونة بعد 24 ساعة.

الكلمات المفتاحية: فُزَح فُؤِيَّة - أطفال مصابون بداء السكري - تغيرات فطرية - الأغشية الحيوية، الأمفوتريسين ب - السيكلوهكسيميد

Résumé

Cette étude a porté sur la recherche des altérations fongiques dans les cavités buccales de 20 enfants atteints d'un diabète de type 1 de la ville de Tlemcen, âgés de 3 à 15 ans.

Vingt prélèvements sont effectués entre février et mars 2024 parmi lesquels huit ont présenté une culture positive sur milieu Sabouraud soit un taux d'altération de 40%. Ces altérations sont réparties entre 5 filles (62,5%) âgées de 11 à 13 ans et 3 garçons (37,5%) âgés de 12 à 14 ans.

L'identification des huit souches isolées par Vitek2, nous a permis de les attribuer toutes à l'espèce *Candida albicans*

Les tests de sensibilité aux antifongiques ont montré que toutes les souches sont résistantes à la cycloheximide (CMI>8µg/mL). En ce qui concerne l'amphotéricine B, six souches en sont sensibles avec des CMIs comprises entre 0,125 et 1µg/mL et 2 souches résistantes après 24 et 48 heures d'incubation à 35°C (CMI>8µg/mL).

Toutes les souches isolées sont formatrices de biofilms *in vitro*. La biomasse des biofilms formés après 48 heures d'incubation à 37°C est supérieure à celle des biofilms de 24 heures.

Mots-clés : Candidoses buccales - enfants diabétiques - Altérations fongiques - *Candida albicans* – Biofilms - Amphotéricine B – Cycloheximide

Abstract:

This study investigated fungal alterations in the oral cavities of 20 children with type 1 diabetes from the city of Tlemcen, aged between 3 and 15 years. 20 samples were taken between February and March 2024, among which eight presented a positive culture on Sabouraud medium, resulting in an alteration rate of 40%. These alterations were distributed among 5 girls (62.5%) aged between 11 and 13 and 3 boys (37.5%) aged between 12 and 14.

The identification of the eight strains isolated by the Vitek2 system allowed us to attribute them all to the *Candida albicans* species.

Antifungal susceptibility tests showed that all strains were resistant to cycloheximide (MIC>8µg/mL). Regarding amphotericin B, 6 strains were sensitive with MICs between 0.125 and 1µg/mL, and 2 strains were resistant after 24 and 48 hours of incubation at 35°C (MIC>8µg/mL).

All the isolated strains are biofilm formers *in vitro*. The biomass of biofilms formed after 48 hours of incubation at 37°C is greater than that of 24-hour biofilms.

Keywords : Oral candidiasis - Diabetic children - Fungal alterations - *Candida albicans* - Biofilms - Amphotericin B - Cycloheximide

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	8
1. Prélèvements buccodentaires	8
2. Isolement et purification des levures du genre <i>Candida</i>	8
3. Identification des levures du genre <i>Candida</i>	8
3.1. Test de blastèse (test de germination)	8
3.2. Test de chlamydosporulation	9
3.3. Croissance sur CHROM-Agar tm <i>Candida</i>	9
4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	9
4.1. Préparation des antifongiques	9
4.2. Préparation de l'inoculum	10
4.3. Technique de microdilution sur microplaque.....	10
5. Détermination de la biomasse des biofilms formés par les souches de <i>Candida</i> sp	11
5.1. Préparation de l'inoculum.....	11
5.2. Formation des biofilms <i>in vitro</i>	11
5.3. Mesure de la biomasse des biofilms formés	11
6. Etude statistique.....	12
Troisième partie : Résultats et discussion	14
1. Taux d'altération fongique	14
2. Identification des levures	15
3. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la cycloheximide vis-à- vis des souches isolées de <i>Candida albicans</i>	17
3.1. Amphotéricine B.....	17
3.2. Cycloheximide	18
4. Biomasse des biofilms formés <i>in vitro</i> par les souches de <i>C. albicans</i> isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques	19
Quatrième partie : Conclusion générale	21
Cinquième partie : Références bibliographiques	24

Dédicaces

Je dédie ce travail, aboutissement de ma persévérance, au noble peuple palestinien, dont la bravoure et la détermination dans l'adversité sont une source intarissable d'inspiration.

À mes chers parents, mon père et ma mère, piliers indéfectibles, qui m'ont inculqué les valeurs de courage, d'humilité et de droiture. Leur amour inconditionnel a été le phare guidant mes pas.

À mes frères et ma sœur, compagnons de vie, avec qui les joies ont été décuplées et les peines allégées par les liens sacrés de la famille.

À mes amies dévouées : Sabiha, Fatima, Ikhlas, Radja et Sihem, Fatima el zohra, Yasmina dont l'amitié sincère et le soutien indéfectible ont été un baume apaisant dans les moments d'incertitude.

Aux membres du laboratoire "Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique", qui ont été des guides éclairés, prodiguant leurs conseils avisés et encourageant mes efforts.

À tous mes camarades de la promotion Biochimie 2023-2024, avec qui j'ai partagé des moments d'apprentissage enrichissants et de convivialité chaleureuse.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia Professeur de biochimie au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD Tlemcen, encadrante remarquable. Ses qualités scientifiques et humaines exceptionnelles ont grandement contribué à la réussite de ces travaux. Par son encadrement rigoureux et bienveillant, ses conseils avisés et son accompagnement de chaque instant, elle a su aplanir les difficultés et me guider sur la voie de la persévérance. Sa passion contagieuse pour la recherche, son dévouement sans faille et les encouragements prodigués avec tant d'altruisme ont été un véritable moteur, nourrissant ma motivation aux moments les plus ardues.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame KAZI TANI-BABA AHMED Zahira Zakia, Maître de Conférences Classe A de microbiologie 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 de Tlemcen. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait l'insigne honneur de présider le jury lors de ma soutenance.

J'exprime également ma sincère gratitude à Monsieur SEGHIR Abdelfettah, Maître de Conférences Classe A de biochimie 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 de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Mme HASSAINE-LAHFA Imene, Maître assistante Classe B de biochimie, 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 de Tlemcen, d'avoir accepté de passer en revue et d'évaluer ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Monsieur BOUCHERIT Kebir pour avoir partagé, avec tant de générosité, ses connaissances et son expertise. Ses judicieux conseils et son orientation avisée ont été une boussole précieuse jalonnant mon cheminement. Son soutien moral indéfectible et ses

paroles rassurantes ont été d'un réconfort inestimable, renouvelant sans cesse ma détermination.

J'exprime par ailleurs ma profonde gratitude à Madame GOURARI-BOUZOUINA Karima, Doctorante au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique » Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen, dont le rôle a été prépondérant. Son implication totale, son abnégation et son aide précieuse ont permis de surmonter d'innombrables défis. Sa rigueur exemplaire, son dévouement absolu et sa disponibilité de tous les instants ont grandement facilité la concrétisation de ce travail. Son humanisme, sa patience et son écoute bienveillante ont été un véritable baume au cœur dans les moments de doute.

Mes sincères remerciements à l'ensemble des professeurs pour leurs enseignements durant mon cursus universitaire. Leur apport a été essentiel à ma formation.

Liste des figures

Figure N°1 : Morphologique de <i>Candida albicans</i> (Odds, 1998)	2
Figure N°2 : Etapes de formation d'un biofilm de <i>Candida albicans</i> (Gulati et Nobile 2016)	5
Figure N°3 : Répartition des prélèvements positifs par sexe et par tranche d'âge	15
Figure N°4 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de <i>C. albicans</i> isolées.....	17
Figure N°5 : Biomasses des biofilms formés <i>in vitro</i> par les souches de <i>C. albicans</i> isolées des cavités buccales d'enfants diabétiques	19

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Répartition des prélèvements positifs par sexe 14

Tableau N°2 : Résultat de l'identification des levures isolées des cavités buccales d'enfants diabétiques de la ville de Tlemcen 16

Liste des photos

Photo N°1 : Aspect de *Candida* sp sur Chrom-Agar™ *Candida* 9

Liste des abréviations

AmB: Amphotéricine B

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

PBS: Solution saline tampon phosphate

RAT: *Rice Agar Tween*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

Première partie

Synthèse bibliographique

Les candidoses sont des infections fongiques dues à des champignons saprophytes du genre *Candida* vivant en commensal sur les muqueuses digestive et génitale [(Bougnoux et al., 2006) ; (Beigi et al., 2004)]. Bien que bénignes chez le sujet sain, elles peuvent se propager par voie sanguine ou gagner le tractus gastro-intestinal supérieur chez les personnes immunodéprimées, entraînant des atteintes sévères pouvant engager le pronostic vital (Yapar, 2014).

Les levures du genre *Candida* appartiennent au règne des champignons et se distinguent par leur mode de vie unicellulaire et leur reproduction asexuée qui s'effectue principalement par formation de bourgeons ou par scission binaire. Elles présentent généralement des dimensions microscopiques comprises entre 2 et 5µm et se caractérisent par l'absence de pigmentation et de capsule. Elles peuvent également adopter d'autres formes de croissance telles que des pseudomycéliums ou des vrais mycéliums, formant des colonies de couleur blanche crémeuse lorsqu'elles sont cultivées en milieu gélosé (Sudbery et al., 2011).

Sur le plan structural, ces microorganismes eucaryotes adoptent typiquement une morphologie ovale ou arrondie (Sudbery et al., 2004). Leur structure comprend une enveloppe extérieure rigide, la paroi cellulaire qui assure une fonction protectrice.

D'un point de vue biochimique, la composition de la paroi cellulaire des levures du genre *Candida* se caractérise par une forte teneur en composés polysaccharidiques, représentant entre 80 et 90% de sa structure. Cette enveloppe rigide contient également une proportion non négligeable de polypeptides qui varie de 6 à 25%. Les lipides constituent l'autre classe de molécules présentes dans la paroi de ces levures (Ruiz-Herrera et al., 2006).

L'espèce *Candida albicans* représente le principal agent étiologique responsable de la majorité des cas de candidoses avec un taux de 54,3%. Cependant, d'autres espèces de *Candida* non *albicans* sont identifiées comme agents causaux de ces infections. Parmi celles-ci figurent *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*, dont les fréquences respectives sont de 16%, de 14,9%, de 8,2% et 1,6% des cas de mycoses superficielles (Mujica et al., 2004).

Un des déterminants majeurs de la virulence et de la pathogénèse de *C. albicans* est sa capacité à passer d'une forme unicellulaire levure à une forme filamenteuse

(hyphes/pseudo-hyphes). Cette transition morphologique appelé aussi dimorphisme est contrôlée par différents signaux environnementaux tels que le pH, la température, la disponibilité des nutriments et des signaux provenant de l'hôte qui sont les composants du système immunitaire (cytokines, anticorps) et les molécules de reconnaissance (récepteurs, protéines) **(Figure N°1)**.

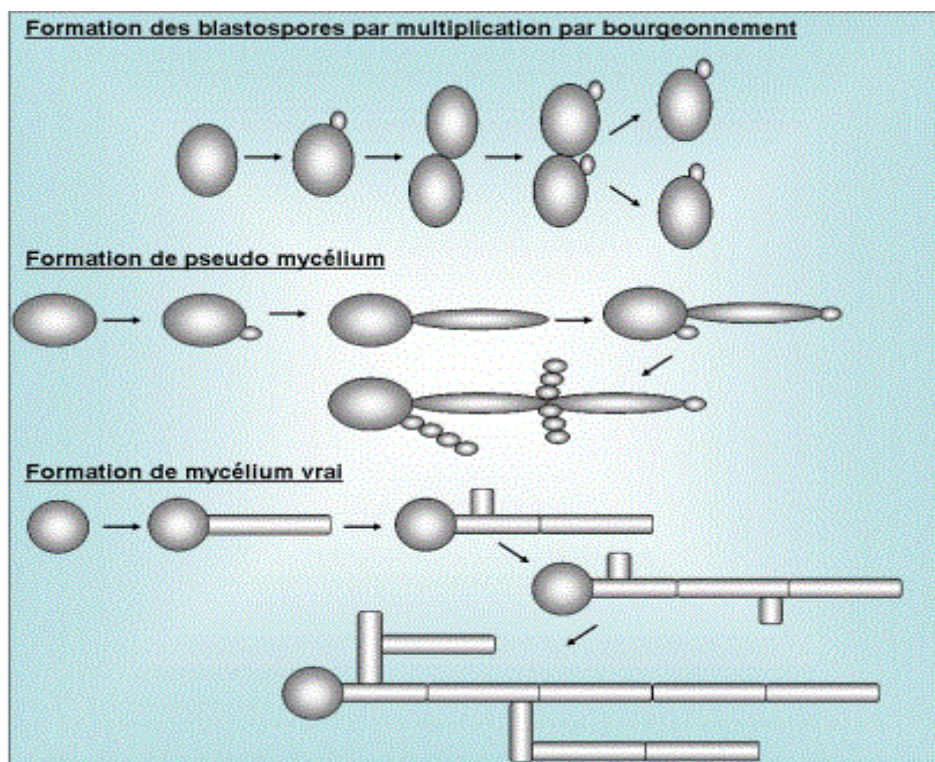


Figure N°1 : Morphologie de *Candida albicans* (Odds, 1998)

Le dimorphisme joue un rôle important dans la virulence de certaines levures telle que l'espèce *Candida albicans* lui permettant ainsi d'échapper au système immunitaire de l'hôte et d'envahir les tissus **(Sudbery, 2004)**

Les filaments fongiques (hyphes) sécrètent des enzymes hydrolytiques comme les protéinases et les phospholipases, facilitant l'invasion des tissus de l'hôte et l'acquisition de nutriments **(Ghannoum, 2000)**.

Les levures appartenant au genre *Candida* sont présentes de manière commensale dans la flore microbienne naturellement établie de la cavité buccale **(Arendorf et Walker, 1980)**.

Rappelons qu'avant de faire partie de la flore commensale ou d'être un parasite, les levures doivent adhérer à des constituants de l'hôte. Ce phénomène d'adhérence

représente la première étape de pathogénicité lors de la dissémination. Il s'agit d'une étape cruciale qui précède toute colonisation, elle est indispensable à la survie de la levure **(Douglas,1987)**.

Les levures du genre *Candida* ont la capacité d'adhérer aux cellules et aux tissus de l'hôte mais aussi aux surfaces biotiques (email des dents et prothèses dentaires, les appareils orthodontiques,) et abiotiques (dispositifs médicaux introduits dans l'organisme). Des espèces de *Candida* ont une préférence pour certaines localisations. Effectivement, il semble que *Candida albicans* adhère mieux à l'épithélium de la cavité buccale que *Candida tropicalis*. De plus, ces deux espèces ont une forte affinité pour l'épithélium vaginale **(Cassone et al., 2007)**

L'adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales de l'hôte implique des interactions entre les adhésines présentes à la surface de la levure (Als, Hwp1, etc.) **(De Groot, 2013)** et les récepteurs des cellules hôtes comme les protéines de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine) ou les récepteurs membranaires **(Sheppard et al., 2004)**.

Ce phénomène d'adhésion induit une réorganisation du cytosquelette des cellules hôtes, ce qui facilite, d'une part, l'endocytose de *C. albicans* et son invasion. D'autre part, elle déclenche une réponse pro-inflammatoire contribuant aux dommages tissulaires **[(Park et al., 2005) ; (Phan et al., 2007) ; (Zakikhany et al., 2007)]**.

Dans une cavité buccodentaire saine, les levures du genre *Candida* cohabitent de manière équilibrée, formant un écosystème microbien stable. Leur présence harmonieuse contribue au maintien de l'homéostasie et de l'équilibre physiologique de la cavité buccale **(Kleinegger et al., 1996)**.

Lorsque l'équilibre physiologique de l'organisme est perturbé, en raison de l'âge avancé, de l'utilisation d'une antibiothérapie ou d'une corticothérapie, d'une radiothérapie ou de l'installation d'un diabète non équilibré, etc., ces levures peuvent se transformer en agents pathogènes et provoquer des infections fongiques graves **(Lionakis et al., 2018)**.

En outre, en cas d'un diabète de type1 (Insulino-dépendant), les candidoses buccales sont favorisées par l'hyperglycémie chronique qui crée des conditions favorables à la prolifération de l'espèce *Candida albicans* **(Guggenheimer et al., 2000)**.

Les taux élevés de glucose dans la salive des patients diabétiques constituent un environnement idéal au développement excessif des levures du genre *Candida* au sein de la cavité buccale conduisant ainsi à une colonisation anormale et l'apparition de candidoses buccales **(Knight et Fletcher, 1971)**.

D'autres complications liées au diabète, telles que la xérostomie (sécheresse buccale) et les lésions des muqueuses orales, contribuent également à augmenter le risque de développement de candidoses buccales **(Akpan et Morgan, 2002)**.

Les enfants diabétiques présentent une vulnérabilité accrue aux infections fongiques affectant la cavité buccale, en particulier la candidose orale communément appelée muguet **[(Akpan et Morgan, 2002) ; (Rossie et Guggenheimer, 1997)]**.

Ces infections peuvent s'aggraver par l'adhésion de ces microorganismes à l'émail des dents et la formation de biofilms qui sont des structures dynamiques de cellules fixées à une surface biotique ou abiotique et encastrées dans une matrice exopolymérique autoproduite **(Rajendran et al., 2016)**

Rappelons que la formation d'un biofilm fongique passe par cinq étapes bien distinctes **(Figure N°2)** :

Adhésion initiale : Les levures adhèrent à la surface de la muqueuse buccale ou d'un matériau prothétique grâce à des adhésines fongiques. Cette étape initiale est déterminante pour la formation d'un biofilm **(Baldo et al., 2007)**.

Colonisation et croissance : Après leur adhésion, les cellules fongiques se multiplient et forment des hyphes qui s'étendent sur la surface. Elles produisent une matrice extracellulaire polysaccharidique qui contribue à la structure du biofilm **(Gulati et Nobile, 2016)**.

Maturation du biofilm : Au fur et à mesure de la croissance, le biofilm se développe en une structure tridimensionnelle complexe composée de cellules fongiques avec différentes formes morphologiques et d'une matrice extracellulaire **(Gulati et Nobile, 2016)**.

Dispersion : Des cellules fongiques individuelles ou des fragments de biofilms peuvent se détacher et se disperser, ce qui permet la colonisation d'autres sites favorisant ainsi la progression de l'infection **(Uppuluri et al., 2010)**.

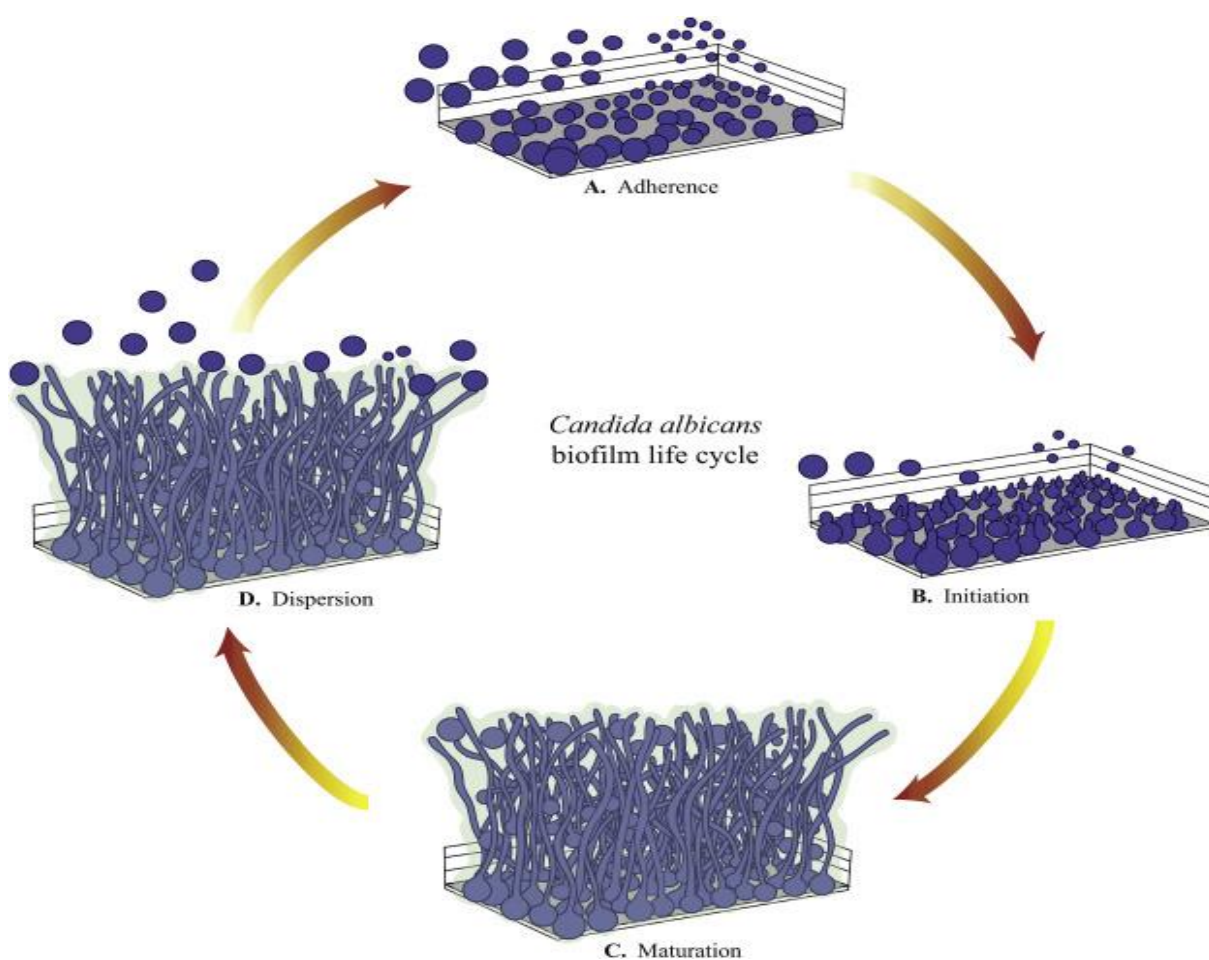


Figure N°2 : Etapes de formation d'un biofilm de *Candida albicans* (Gulati et Nobile 2016).

Plusieurs facteurs contribuent à la formation des biofilms parmi lesquels nous pouvons citer :

-Une mauvaise hygiène buccodentaire chez les enfants diabétiques peut favoriser l'accumulation de plaque dentaire et la formation de biofilms fongiques (**Akpan et Morgan, 2002**).

-L'hyperglycémie observée chez les patients diabétiques entraîne une augmentation du glucose dans la salive, ce qui favorise la prolifération des levures du genre *Candida* et la formation de biofilms (**Darwazeh et al., 1991**).

-Le diabète peut réduire la production de la salive (**Busato et al., 2012**), créant ainsi un environnement favorable à la colonisation par les levures du genre *Candida* et la formation de biofilms

Le traitement des candidoses buccales est basé sur l'utilisation de trois classes d'antifongiques systémiques. Il s'agit des :

-Polyènes, représentés essentiellement par l'amphotéricine B, qui agissent par interaction spécifique avec les stérols membranaires ce qui engendre la formation de pores transmembranaires.

-Azolés comme le fluconazole qui inhibent la synthèse de l'ergostérol en bloquant la 14 α -déméthylase perturbant ainsi l'intégrité membranaire des cellules fongiques.

-Echinocandines, à l'instar de la caspofungine qui ciblent la synthèse du β (1,3) -D-glucane, composant essentiel de la paroi cellulaire fongique (**Odds et al., 2003**).

La 5-fluorocytosine, un antifongique antimétabolite qui inhibe la synthèse de l'ARN fongique de manière indirecte, peut être également utilisée en association avec l'une des trois classes précédentes (**Odds et al., 2003**).

La prise en charge thérapeutique des candidoses buccales fait appel à des agents antifongiques, dont le choix dépend de la sévérité des lésions et de l'espèce de *Candida* en cause (**Camile et al., 2000**). Par conséquent, il est crucial d'établir un diagnostic précis et de mettre en place un traitement adapté pour gérer ces infections de manière adéquate.

C'est dans ce contexte que ce travail est entrepris et qui porte sur la recherche des altérations fongiques buccodentaires chez des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen. L'évaluation du profil de résistance des souches isolées aux antifongiques et leur potentiel à former des biofilms *in vitro* sont également étudiés.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

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

1. Prélèvements buccodentaires

Durant les mois de février et mars de l'année 2024, des prélèvements buccodentaires sont effectués par écouvillonnage de la langue (face dorsale et face ventrale) sur 20 enfants diabétiques, âgés de 3 à 15 ans, de la ville de Tlemcen.

Les écouvillons sont placés dans des tubes stériles auxquels 2mL d'eau physiologique stérile sont ajoutés puis agités au vortex pendant 2 minutes. Un volume de 100µL est ensuite prélevé et transféré dans un tube contenant 900µL de milieu Sabouraud liquide pour la recherche des levures appartenant au genre *Candida*. Les tubes sont incubés à une température de 35°C pendant 24 à 48 heures, voire 72 heures.

2. Isolement et purification des levures du genre *Candida*

A partir des échantillons présentant un trouble, des boîtes de Pétri contenant de la gélose Sabouraud sontensemencées et incubées à 35°C pendant 24 à 48 heures. Les souches isolées sont purifiées par passages successifs sur gélose Sabouraud. Les souches ainsi purifiées sontensemencées dans des tubes contenant de la gélose Sabouraud inclinée puis incubées pendant 24h à 35°C et conservées à +4°C.

3. Identification des levures du genre *Candida*

L'identification des souches isolées est réalisée par la recherche de tubes germinatifs (test de blastèse) et des chlamydospores, par croissance sur le milieu chromogénique, le Chrom-Agar™ *Candida* et par vitek2

3.1. Test de blastèse (test de germination)

Test décrit par **Taschdjian (1960)**, inspiré de **Reynolds et Braune (1956)** montrant que les constituants sanguins favorisent la filamentation de certaines levures. Une culture pure sur Sabouraud est mise en suspension dans 1mL de sérum humain, incubée 3-4h à 35°C. Une goutte observée au microscope x40 permet de vérifier la présence ou l'absence de tubes germinatifs (**Bouchet et al., 1989**).

3.2. Test de chlamydosporulation

Une colonie de la souche à analyser est étalée par stries sur milieu Riz, Agar, Tween 80 (RAT) incliné en tube, avec une piqûre centrale profonde. Après incubation pendant 48h à 28°C, une observation microscopique montrant des levures, des pseudomycéliums, des blastospores et des chlamydospores indique qu'il s'agit de l'espèce *Candida albicans*. (Drouhet et Vieu,1957).

3.3. Croissance sur CHROM-Agar™ *Candida*

Le CHROM-Agar™ *Candida* est un milieu sélectif et différentiel permettant d'isoler rapidement *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* et *Candida glabrata* de cultures mixtes, en se basant sur la coloration et la morphologie des colonies (Photo N°1). Des boîtes de Pétri contenant ce milieu sont ensemencées par stries, puis incubées pendant 48 heures.

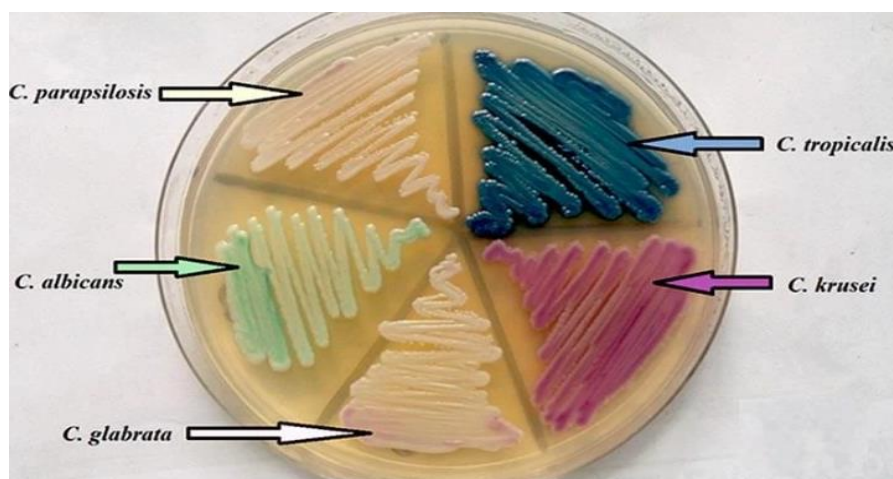


Photo N°1 : Aspect de *Candida* sp sur Chrom-Agar™ *Candida*

4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

4.1. Préparation des antifongiques

Notre choix a porté sur un antifongique systémique, l'amphotéricine B de la famille des polyènes qui agit sur la membrane plasmique des cellules fongiques et la cycloheximide ou actidione, un antibiotique avec des propriétés antifongiques significatives qui inhibe la synthèse des protéines des cellules eucaryotes (Takagi et al., 1986). Les deux antifongiques proviennent des laboratoires Sigma.

Les solutions mères de l'amphotéricine B et de la cycloheximide sont préparées en extemporané par dissolution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations respectives de 1,6mg/mL et 0,05mg/mL.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B et de la cycloheximide vis-à-vis des souches de *Candida* sp. isolées sont déterminées selon le protocole standard du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008 M27-A3)*. C'est une technique de microdilution sur microplaque 96 puits dans le milieu *Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)* tamponné à pH 7 (Sigma).

Candida albicans ATCC10231 est utilisée comme contrôle interne pour la détermination des CMI.

Les tests sont réalisés en triplicata.

4.2. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture de 24 heures sur gélose Sabouraud, une suspension levurienne de 3×10^6 cellules/mL est préparée dans de l'eau physiologique stérile à 8,5% par dénombrement sur cellule de Thoma. Des dilutions au 1/50 puis au 1/20 dans le milieu RPMI sont réalisées pour obtenir une concentration cellulaire de départ égale à $1,5 \times 10^3$ cellules/mL.

4.3. Technique de microdilution sur microplaque

Dans les 96 puits d'une microplaque, 100µL de l'inoculum sont introduits auxquels sont ajoutés 100µL de la solution d'amphotéricine B ou de cycloheximide. Les concentrations finales des antifongiques varient de 0,03 à 16µg/mL pour l'amphotéricine B et de 0,5 à 8µg/mL pour la cycloheximide.

Les microplaques ainsi préparées sont scellées puis incubées à 35°C. Les CMI de l'amphotéricine B et de la cycloheximide sont lues à l'œil nu après 24 et 48 heures d'incubation à 35°C. La viabilité et la cultivabilité des levures sont vérifiées par leur culture sur gélose Sabouraud.

5. Détermination de la biomasse des biofilms formés par les souches de *Candida* sp.

5.1. Préparation de l'inoculum

Les souches de *Candida* sp. isolées sont cultivées dans un bouillon Sabouraud, puis incubées pendant 24 h à 35°C. Après centrifugation à 3000g pendant 5 minutes à 4°C, le culot est lavé deux fois avec une solution saline tampon phosphate (PBS) à (pH 7,4 ; 10mM). L'inoculum de départ est ajusté à 10⁶ cellules/mL dans le milieu RPMI.

5.2. Formation des biofilms *in vitro*

100µL de l'inoculum à 10⁶cellules/mL sont introduits dans chaque puits d'une microplaque. Cette dernière est ensuite scellée puis placée dans une étuve à 35°C pendant 24 heures.

5.3. Mesure de la biomasse des biofilms formés

La technique de coloration au crystal violet permet de quantifier la biomasse au sein du biofilm (**Christensen et al., 1985**).

Après formation des biofilms de 24 heures, le milieu est aspiré et les puits sont rincés par le tampon phosphate pH7,4 ; 10mM additionné de 150mM de NaCl (PBS) stérile pour éliminer les cellules planctoniques ou non adhérentes. Pour fixer le biofilm, 100µL de méthanol sont ajoutés aux différents puits et la microplaque est réincubés pendant 15 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite vidés, 100µL de crystal violet sont ajoutés et les microplaques sont réincubées pendant 20 minutes. Le crystal violet lié est solubilisé par 150µL d'acide acétique (33%) et la densité optique est mesurée à 570nm au lecteur de microplaques (**Biochrom Asys UVM340**).

Les souches sont classées selon les intervalles fixés par **Vieu, (2014)** en :

Bonnes formatrices de biofilms : $DO > 0,15$

Moyennement formatrices de biofilms : $0,5 < DO < 1,5$

Faiblement formatrices de biofilms : $0 < DO < 0,05$

Non formatrices de biofilms : $DO \leq 0$

Les tests sont réalisés en triplicata.

6. Etude statistique

Afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le diabète et l'altération fongique buccodentaire, une étude statistique est réalisée basée sur le test de Chi-deux avec correction de continuité de Yates (X-squared) de 16.05 avec 1 degré de liberté ($p < 0.05$).

Troisième partie

Résultats et discussion

1. Taux d'altérations fongiques

A partir des 20 prélèvements buccaux effectués chez des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen et suivis à la clinique Boudghene du CHU (Tlemcen) parmi lesquels 12 filles et 8 garçons ; huit se sont révélés positifs soit un taux d'altération fongique global de 40%. Ce taux est inférieur à celui rapporté par l'équipe d'**Al-Attas** qui a trouvé un taux d'altération de 68,9% chez des enfants diabétiques au Royaume d'Arabie Saoudite (**Al-Attas et al., 2010**).

Le **tableau N°1** présente la répartition des altérations fongiques selon le sexe des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.

Tableau N°1 : Répartition des prélèvements positifs par sexe

Sexe	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements positifs	Taux d'altération (%)
Filles	12	5	62,5
Garçons	8	3	37,5

Nous remarquons que le taux d'altérations fongiques chez les enfants diabétiques de la ville de Tlemcen est de 62,5% pour les filles contre 37,5% pour les garçons.

La répartition des altérations fongiques selon la tranche d'âge des enfants est représentée sur la **figure N°3**.

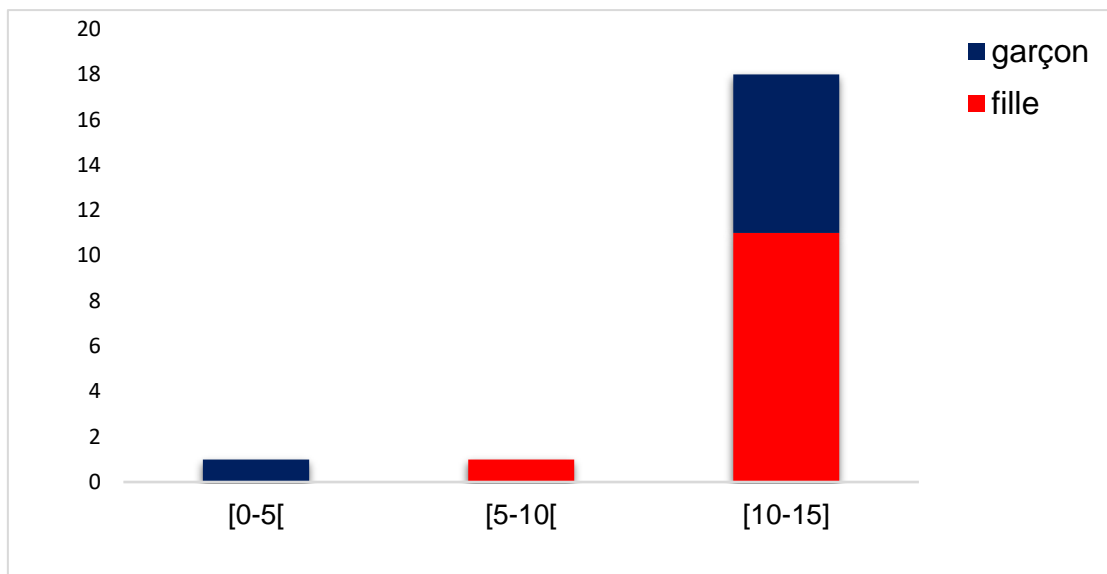


Figure N°3 : Répartition des prélèvements positifs par sexe et par tranche d'âge.

Cette figure montre que 5% des filles concernées par l'altération fongique appartiennent à la tranche d'âge [5-10[ans et 55% à la tranche d'âge [10-15] ans. Pour les garçons, 5% sont dans la tranche d'âge [0-5[ans et seulement 35% dans la tranche d'âge [10-15] ans.

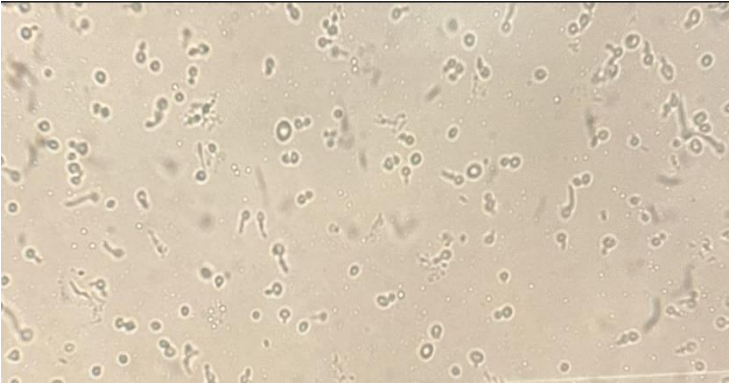

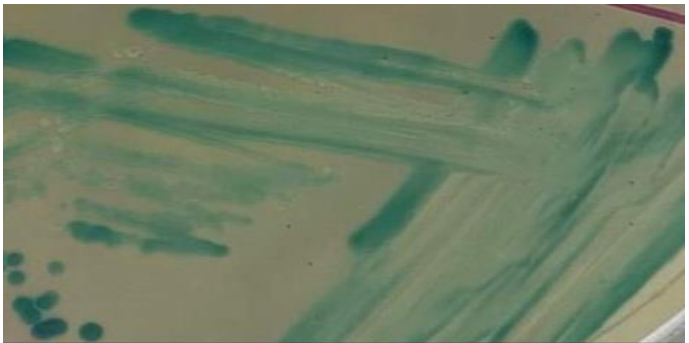
Nous constatons que quel que soit le sexe des enfants, le taux d'altérations fongiques est plus élevé à l'adolescence, c'est-à-dire pour la tranche d'âge [10-15] ans. Cette augmentation est beaucoup plus marquée chez les filles.

Par ailleurs, le test de Chi-deux avec correction de continuité de Yates a donné une statistique de test (X-squared) de 16.05 avec 1 degré de liberté. Le p-value associé est de 6.168e-05 (<0.05) ce qui révèle une corrélation significative entre le diabète et l'altération fongique buccale chez les enfants inclus dans cette étude.

2. Identification des levures

Le **tableau N°2** regroupe les résultats de l'identification des levures isolées par les tests de blastèse, de chlamidosporulation et par croissance sur milieu Chrom-Agar *Candida*.

Tableau N°2 : Résultats de l'identification des levures isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

Tests	Résultats	Photos
Blastèse	Tube germinatif	
Chlamydosporulation	Chlamydospore	
CHROM-Agar <i>Candida</i>	Couleur verte	

Ces résultats montrent que les huit souches de levures isolées appartiennent à l'espèce *Candida albicans*. Cette identification est confirmée par Vitek2.

Selon les travaux de **Willinger et al., (2001)**, la croissance sur le milieu CHROM-Agar™ *Candida* présente une excellente spécificité, supérieure à 99%, pour l'identification de chaque espèce de *Candida*. De plus, sa sensibilité atteint environ 99% permettant ainsi une détection fiable des différentes espèces.

L'espèce *Candida albicans*, fait partie de la flore commensale buccale. Il s'agit de l'agent pathogène le plus incriminé dans les candidoses buccales chez les enfants diabétiques, avec un taux d'isolement qui dépasse les 50% (**Al-Attas et al., 2010**).

3. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la Cycloheximide vis-à-vis des souches de *Candida albicans* isolées

3.1. Amphotéricine B

Les valeurs des CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *C. albicans* isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques déterminées après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C sont représentées sur la **figure N°4**.

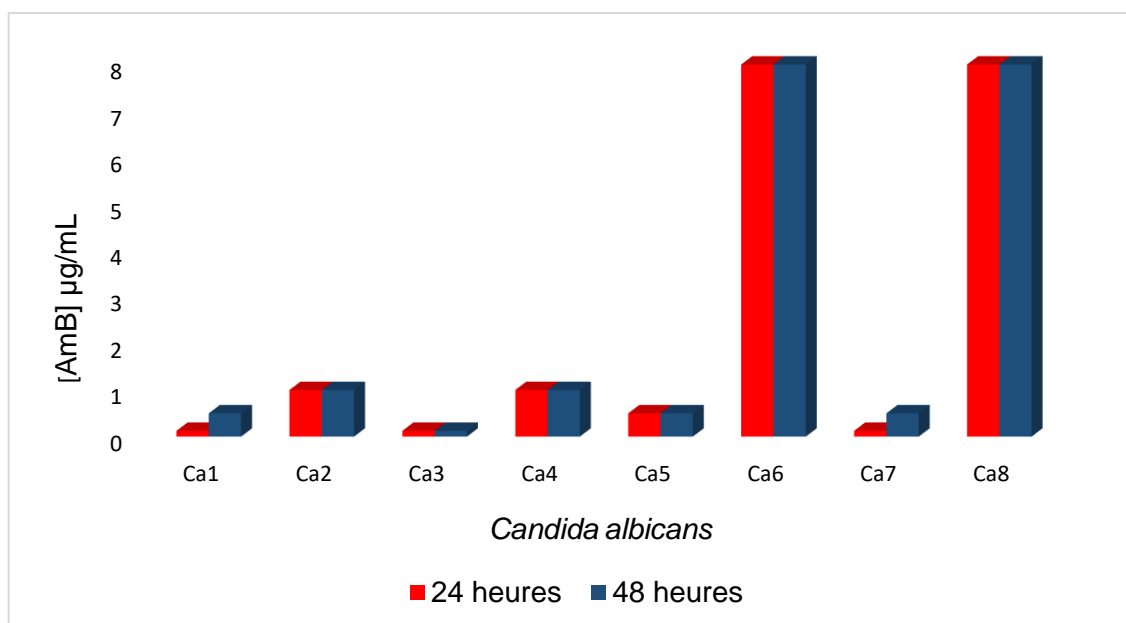


Figure N°4 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *C. albicans* isolées.

Nous remarquons que les CMI's varient de 0,125µg/mL à 1µg/mL pour les souches Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, Ca5 et Ca7. Par conséquent, ces souches sont sensibles à l'amphotéricine B (**CLSI, 2008**). Ce résultat va dans le même sens que ceux de **Dorocka-Bobkowska et al., (2003)** et d'**Ellepola et al., (2015)**.

En revanche, après 24 heures d'incubation, les souches Ca6 et Ca8 ont montré des CMI's supérieures ou égales à 8µg/mL. Ces valeurs sont restées inchangées après 48 heures d'incubation à 35°C. Selon les recommandations du **CLSI de 2008**, ces deux souches sont résistantes à l'amphotéricine B. Rappelons que ces deux souches sont prélevées de deux enfants diabétiques insulinodépendants de sexe féminin âgés de 11 et 12 ans. Au moment du prélèvement, ces deux enfants présentaient des caries dentaires, des rougeurs et des inflammations gingivales, une mauvaise haleine, ainsi que des gonflements de la gencive.

En outre, ces deux enfants n'ont jamais passé de visite médicale chez un dentiste et leur alimentation est riche en sucre. Un système immunitaire affaibli chez ces deux patients diabétiques ainsi qu'une mauvaise hygiène buccodentaire peuvent être à l'origine d'une adhérence de *Candida albicans* et d'une résistance accrue à cet antifongique.

Il est à noter que la résistance des souches de *Candida* sp. à l'amphotéricine B reste très rare et inhabituelle. Elle peut être causée soit par une réduction des niveaux d'ergostérol, stérol dominant des membranes plasmiques des cellules fongiques auquel se lie l'amphotéricine B, soit par une modification de la nature des lipides constituant la cible membranaire de ce médicament. Dans les deux cas, ces changements entraînent une diminution des sites de fixation de l'amphotéricine B réduisant ainsi son efficacité antifongique (**Ellis, 2002**).

3.2. Cycloheximide

Les CMI's de la cycloheximide vis-à-vis des souches de *Candida albicans* isolées, lues après 24 heures d'incubation à 35°C, sont supérieures ou égales à 8µg/mL. De ce fait, toutes les souches de *Candida albicans* testées sont résistantes à cet antifongique (**Singh et al., 2009**).

Candida albicans possède une résistance naturelle à la cycloheximide (**Dehoux et al., 1993**). Des travaux antérieurs ont montré que cette résistance à la cycloheximidine chez *C. albicans* est probablement due à la substitution de la proline

en position 56 par une glutamine (P56Q), dans la protéine ribosomique eL42 (Kawai et al., 1992).

Il faut rappeler que la cycloheximide est un antifongique qui inhibe la synthèse protéique en se liant au site de liaison de l'ARNt-E (site E) des ribosomes (Ben-Yaacov et al., 1994).

4. Biomasse des biofilms formés *in vitro* par les souches de *C. albicans* isolées des cavités buccales d'enfants diabétiques

Les résultats relatifs à la quantification de la biomasse des biofilms formés *in vitro* par les levures de *Candida albicans* isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques sont présentés sur la **Figure N°5**.

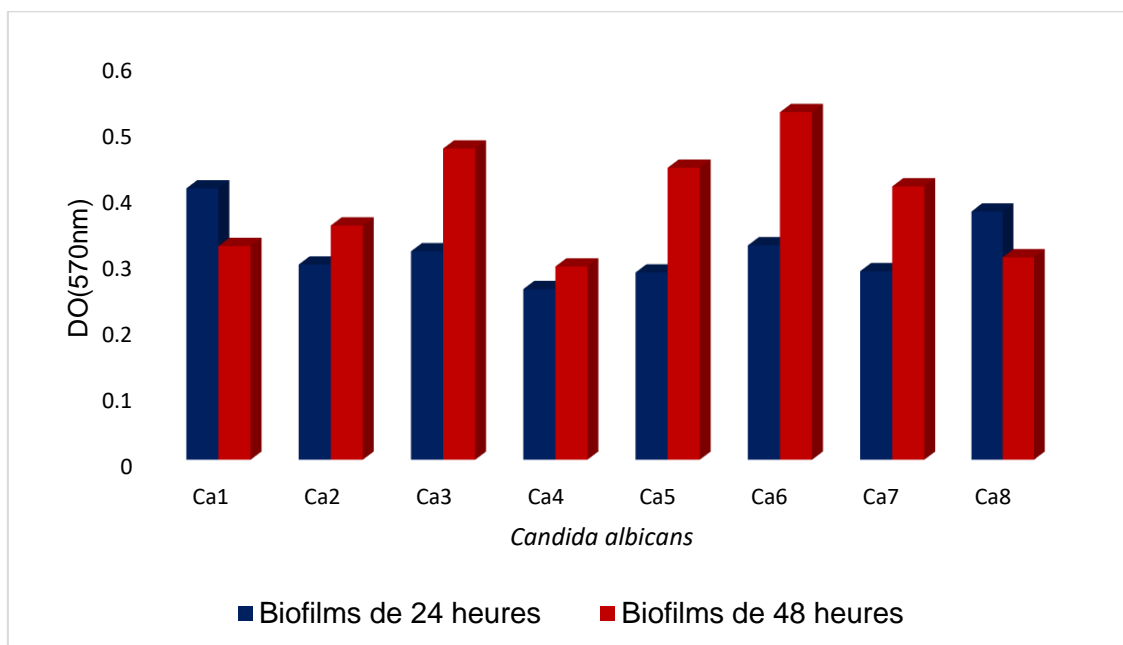


Figure N°5 : Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les souches de *C. albicans* isolées des cavités buccales d'enfants diabétiques.

Nous constatons que toutes les densités optiques des biofilms formés par les souches de *C. albicans* varient de 0,258 à 0,410 et de 0,292 à 0,525 après 24 et 48 heures d'incubation à 35°C respectivement. Selon les intervalles fixés par **Vieu, (2014)**, toutes ces souches sont fortement formatrices de biofilms.

Cependant, pour les souches Ca1 et Ca8, il y a une diminution de l'absorbance pour les biofilms de 48h par rapport à ceux de 24h. Cela peut être expliqué par la dispersion ou la perturbation du biofilm au cours de sa formation (**Uppuluri et al., 2010**).

Quatrième partie

Conclusion générale

Ce travail a porté, dans un premier temps, sur la recherche des altérations fongiques à *Candida* chez des enfants atteints de diabète de type 1 de la ville de Tlemcen et dans un deuxième temps, sur l'évaluation de la sensibilité des souches isolées à deux antifongiques, l'amphotéricine B et la cycloheximide, ainsi que leur potentiel à former des biofilms *in vitro*.

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

- Parmi les 20 prélèvements buccaux effectués sur des enfants diabétiques, 40% sont altérés par les levures du genre *Candida* avec une prévalence plus élevée chez les filles et les adolescents, il est donc nécessaire de renforcer les mesures de l'hygiène buccodentaire et les campagnes de sensibilisation à ces infections auprès de cette population et de leurs familles.

- *Candida albicans* est la seule espèce fongique isolée des cavités buccales des enfants inclus dans cette étude.

- Sur les huit souches isolées, six sont sensibles à l'amphotéricine B, avec des CMI comprises entre 0,125 et 1µg/mL. En revanche, les souches Ca6 et Ca8 sont résistantes à cet antifongique avec une CMI supérieure à 8µg/mL.

La résistance des levures du genre *Candida* à l'amphotéricine B est rarement observée dans des isolats cliniques. Compte tenu de cette résistance à l'amphotéricine B, il convient d'assurer une surveillance étroite de ces patients aux systèmes immunitaires fragiles.

- Toutes les souches de *Candida albicans* testées sont résistantes à la cycloheximide (CMI > 8µg/mL).

- L'ensemble des souches isolées appartiennent à la catégorie « bonnes formatrices de biofilms » *in vitro*.

La relation entre diabète et infections buccodentaires est bien établie dans cette étude. Cela est dû, en plus d'une mauvaise hygiène buccodentaire, à l'hyperglycémie salivaire et au système immunitaire affaibli de ces enfants.

Pour poursuivre ce travail et face à la menace croissante de l'émergence de souches de *Candida albicans* résistantes aux antifongiques actuels, notamment chez les populations à risque comme les enfants diabétiques, il serait intéressant de :

- Faire une caractérisation moléculaire des deux souches résistantes à l'amphotéricine B. Cela permettrait d'ouvrir une voie d'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou de stratégies de lutte anti-biofilms.
- Tester la combinaison d'antifongiques (amphotéricine B/cycloheximide) vis-à-vis des souches isolées

Cependant, la prévention reste la stratégie de première intention, reposant principalement sur le respect des mesures d'hygiène buccodentaires strictes.

Cinquième partie

Références bibliographiques

Akpan, A., & Morgan, R. (2002). Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal* 78(922), 455-459

Al-Attas SA, Amro SO. Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. *Ann Saudi Med.* 2010;30(2):101-108. DOI: 10.4103/0256-4947.60517

Arendorf, T. M., & Walker, D. M. (1980). The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of Oral Biology*, 25(1), 1-10

Baldo, A., Mathy, A., Vermout, S., Tabart, J., Losson, B., & Mignon, B. (2007). Les mécanismes d'adhérence des champignons responsables de mycoses superficielles. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 151, 192-199.

Beigi RH, Meyn LA, Moore DM, et al. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. *Obstet Gynecol.* 2004 Nov ;104(5, Part 1):926–930. DOI:10.1097/01.AOG.0000140687.51048.73.

Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G. A., Becker, J. M., & Koltin, Y. (1994). *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(3), 648-652.

Bouchet P., Guignard J.L., Madulo-Leblond G. and Regli P. (1989) Mycologie générale et médicale. *Ed Masson. Paris* ; 107-120.

Bougnoux ME, Diogo D, Francois N, et al. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol.* 2006 ;44(5):1810–1820.

Busato, I.M.S., Ignácio, S.A., Brancher, J.A., Moysés, S.T., & Azevedo-Alanis, L.R. (2012). Impact of clinical status and salivary conditions on xerostomia and oral health-related quality of life of adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 40(1), 62-69.

Camile, S. F., Ashman, R. B., & Challacombe, S. J. (2000). Oral candidosis. *Clinics in dermatology*, 18(5), 553-562.

Cassone A., De Bernardis F., Santoni G. (2007): Anticandidal Immunity and Vaginitis: Novel Opportunities for Immune Intervention. *Inf Imm*; 75 : 4675-4686

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996–1006.

- CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute, M27-A3*.
- Darwazeh AM, MacFarlane TW, McCuish A, Lamey PJ. Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20(6):280-3.
- Dehoux, P., Davies, J., & Cannon, M. (1993). Natural cycloheximide resistance in yeast. The role of ribosomal protein L41. *European Journal of Biochemistry*, 213(2), 841-848.
- De Groot PWJ, Bader O, de Boer AD, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell.* 2013;12(4). doi:10.1128/EC.00364-12
- Dorocka-Bobkowska, B., Konopka, K., & Düzgüneş, N. (2003). Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells *in vitro*. *Journal de Mycologie Médicale*, 13(2), 121-128.
- Douglas, L. J. (1987). Adhesion of *Candida* Species to Epithelial Surfaces. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 15(1), 27-43.
- Drouhet E. and Vieu M. (1957) biology of *Candida* infections: Laboratory diagnosis; study of 342 strains of *Candida* isolated from pathological specimens. *Sem Hop* ;33:793-807
- Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(suppl_1), 7-10.
- Ellepola A.N., Chandy R. and Khan Z U. (2015). Post-antifungal effect and adhesion to buccal epithelial cells of oral *Candida dubliniensis* isolates subsequent to limited exposure to amphotericin B, ketoconazole and fluconazole. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 6(3), 186-192.
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 122-143.
- Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, et al. Insulin-independent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II, Prevalence and characteristics of *Candida* and Candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:570-6.

- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310-321.
- Kawai, S., Murao, S., Mochizuki, M., Shibuya, I., Yano, K., & Takagi, M. (1992). Drastic alteration of cycloheximide sensitivity by substitution of one amino acid in the L41 ribosomal protein of yeasts. *Journal of Bacteriology*, 174(1), 254-262.
- Kleinegger, C. L., Lockhart, S. R., Vargas, K., & Soll, D. R. (1996). Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *Journal of clinical microbiology*, 34(9), 2246-2254.
- Knight L, Fletcher J. Growth of *Candida albicans* in saliva stimulated by glucose associated with antibiotics, corticosteroids and diabetes meliitus. *J Infect Dis* 1971; 123: 371-7
- Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.
- Lionakis, M. S., & Levitz, S. M. (2018). Host control of fungal infections: lessons from basic studies and human cohorts. *Annual Review of Immunology*, 36, 157-191.
- Mujica M.T., Finquelievich J.L, Jewtuchowicz V. and Iovaniiti C.A. (2004) Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001. *Revista Argentina de Microbiologia* 36: 107-112
- Odds, J. C., (1988). *Candida* and candidosis: 2nd edition. Londres: *Baillière Tindall*.
- Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272-279.
- Park, H., Myers, C.L., Sheppard, D.C., Phan, Q.T., Sanchez, A.A., Edwards, J.E., and Filler, S.G. (2005) Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* 7: 499–510
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E. Jr., Filler, S. G. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS biology*, 5(3), e64.
- Rajendran, R., Sherry, L., Nile, C.J., Sherriff, A., Johnson, E.M., Hanson, M.F., Williams, C., Munro, C.A., Jones, B.J., & Ramage, G. (2016). Biofilm formation is a risk factor for mortality in oropharyngeal candidiasis. *Journal of Dental Research*, 95(11), 1253-1261.

- Reynolds, R. C., & Braude, A. I. (1956). The filament-inducing activity of blood for *Candida albicans*; its nature and significance. *Clinical Research Proceedings*, 4, 40.
- Rossie K, Guggenheimer J. Oral candidiasis: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Pract Periodont Aesthet Dent* 1997;9:635-41
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentín, E., & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 14-29.
- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, et al. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 279: 30840–30849.
- Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000532. doi: 10.1371/journal.ppat.1000532.
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7), 317-324.
- Sudbery, P.E., 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), pp.737-748.
- Takagi, M., Kawai, S., Shibuya, I., Miyazaki, M., & Yano, K. (1986). Cloning in *Saccharomyces cerevisiae* of a Cycloheximide Resistance Gene from the *Candida maltosa* Genome Which Modifies Ribosomes. *Journal of Bacteriology*, 168(1), 417-419.
- Taschdjian, C. L. (1960). Transformation of the yeast phase to mycelial phase in *Candida albicans* on blood agar. *Journal of Bacteriology*, 79(3), 428-429.
- Uppuluri, Priya, Chaturvedi, Ashok K., Srinivasan, Anand, Banerjee, Mohua, Ramasubramaniam, Anand K., Köhler, Julia R., Kadosh, David, Lopez-Ribot, Jose L. (2010). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000828.
- Vieu G. (2014). Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse iii – Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques.
- Willinger B., Hillowoth C., Selitsch B. and Manafi M. (2001). Performance of *Candida ID*, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species,

in comparison to CHROMagar Candida. *Journal of clinical microbiology*,39(10), 3793-3795.

Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:95-105.

Zakikhany, K., Naglik, J.R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., and Hube, B. (2007). *In vivo transcript profiling of Candida albicans identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cellular Microbiology*, 9(12), 2938-2954.

ملخص:

بحثت هذه الدراسة عن تغيرات فطرية في تجاويف الفم لدى 20 طفلاً مصاباً بداء السكري من النوع الأول في مدينة تلمسان، تتراوح أعمارهم بين 3 و15 عاماً. 20 عينة تم أخذها بين فبراير ومارس 2024، أظهرت 8 عينات منها مزرعة إيجابية على وسط سابورو، وهو ما يمثل نسبة تغيرات بنسبة 40%. وقد توزعت هذه التغيرات بين 5 فتيات (62.5%) تتراوح أعمارهن بين 11 و13 عاماً و3 فتيان (37.5%) تتراوح أعمارهم بين 12 و14 عاماً.

وقد مكنتنا تحديد السلالات الثمانية المعزولة بواسطة Vitek2 من تعيينها جميعاً إلى فصيلة *Candida albicans*.

وأظهر اختبار الحساسية للعوامل المضادة للفطريات أن جميع السلالات كانت مقاومة للسيكلو هكسيמיד ($CMI > 8$ ميكروغرام/مل). وفيما يتعلق بالأمفوتريسين ب، كانت 6 سلالات حساسة مع CMI ما بين 0.125 و1 ميكروغرام/ملتر، وكانت سلالتان مقاومتان بعد 24 و48 ساعة من الحضانة عند درجة حرارة 35 درجة مئوية ميكروغرام/مل ($CMI > 8$).

شكلت جميع السلالات المعزولة أغشية حيوية في المختبر. كانت الكتلة الحيوية للأغشية المتكونة بعد 48 ساعة من الحضانة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية أكبر من الكتلة الحيوية المتكونة بعد 24 ساعة.

الكلمات المفتاحية: فُرْح فَمُويّة - أطفال مصابون بداء السكري - تغيرات فطرية - الأغشية الحيوية، الأمفوتريسين ب، السيكلو هكسيמיד

Résumé :

Cette étude a porté sur la recherche des altérations fongiques dans les cavités buccales de 20 enfants atteints d'un diabète de type 1 de la ville de Tlemcen, âgés de 3 à 15 ans.

Vingt prélèvements sont effectués entre février et mars 2024 parmi lesquels huit ont présenté une culture positive sur milieu Sabouraud soit un taux d'altération de 40%. Ces altérations sont réparties entre 5 filles (62,5%) âgées de 11 à 13 ans et 3 garçons (37,5%) âgés de 12 à 14 ans.

L'identification des huit souches isolées par Vitek2, nous a permis de les attribuer toutes à l'espèce *Candida albicans*

Les tests de sensibilité aux antifongiques ont montré que toutes les souches sont résistantes à la cycloheximide ($CMI > 8 \mu\text{g/mL}$). En ce qui concerne l'amphotéricine B, six souches en sont sensibles avec des CMI comprises entre 0,125 et $1 \mu\text{g/mL}$ et 2 souches résistantes après 24 et 48 heures d'incubation à 35°C ($CMI > 8 \mu\text{g/mL}$).

Toutes les souches isolées sont formatrices de biofilms *in vitro*. La biomasse des biofilms formés après 48 heures d'incubation à 37°C est supérieure à celle des biofilms de 24 heures.

Mots-clés : Candidoses buccales - enfants diabétiques - Altérations fongiques -

Candida albicans – Biofilms - Amphotéricine B – Cycloheximide

Abstract

This study investigated fungal alterations in the oral cavities of 20 children with type 1 diabetes from the city of Tlemcen, aged between 3 and 15 years. 20 samples were taken between February and March 2024, among which eight presented a positive culture on Sabouraud medium, resulting in an alteration rate of 40%. These alterations were distributed among 5 girls (62.5%) aged between 11 and 13 and 3 boys (37.5%) aged between 12 and 14 .

The identification of the eight strains isolated by the Vitek2 system allowed us to attribute them all to the *Candida albicans* species.

Antifungal susceptibility tests showed that all strains were resistant to cycloheximide ($MIC > 8 \mu\text{g/mL}$). Regarding amphotericin B, 6 strains were sensitive with MICs between 0.125 and $1 \mu\text{g/mL}$, and 2 strains were resistant after 24 and 48 hours of incubation at 35°C ($MIC > 8 \mu\text{g/mL}$).

All the isolated strains are biofilm formers *in vitro*. The biomass of biofilms formed after 48 hours of incubation at 37°C is greater than that of 24-hour biofilms.

Keywords : Oral candidiasis - Diabetic children - Fungal alterations - *Candida albicans* - Biofilms - Amphotericin B - Cycloheximide