



**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

**Thèse**

En vue de l'obtention du diplôme de

**Doctorat de troisième cycle**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Présentée par

**Mlle BENDOUKHA Imène**

Thème :

---

**Etude des altérations mixtes *Candida albicans*/bactéries Gram négatives chez les enfants atteints de mucoviscidose de l'ouest Algérien**

---

Soutenue le : 04/07/2024

Devant le jury composé de :

Présidente	Pr. SARI-BELKHERROUBI Lamia	Université de Tlemcen
Directrice de thèse	Pr. BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. Kazi TANI-BABA AHMED Zahira Zakia	Université de Tlemcen
Examineur	Pr. GHELLAI Lotfi	Université de Saida
Examineur	Dr. HALLA Noureddine	Université de Saida

**Année universitaire : 2023-2024**

## ملخص:

يُعتبر التليف الكيسي مرضًا نادرًا في الجزائر، والبيانات السريرية والديموغرافية غير مكتملة بسبب عدم وجود سجل طبي وطني. لهذا السبب، أجرينا هذه الدراسة على جزأين. الجزء الأول هو دراسة متعددة الجوانب لوصف مرضى التليف الكيسي في غرب الجزائر. والجزء الثاني مخصص للبحث عن الاصابات البكتيرية متعددة الميكروبات *C. albicans* / البكتيريا سالبة الجرام في مخاط القصبات الهوائية لهؤلاء المرضى.

أظهرت النتائج أنه من بين 34 طفلاً (16 ولدًا و18 بنتاً) مصابين بالتليف الكيسي تمت متابعتهم في مستشفى وهران للصحة النفسية المدرجين في هذه الدراسة، تم تشخيص 15 طفلاً فقط قبل سن 6 أشهر. وكان جميع المرضى يعانون من أعراض تنفسية وهضمية، و33 منهم يعانون من احتقان القصبات الهوائية، و10 منهم يعانون من التهاب القصبات الهوائية الحاد و4 منهم يعانون من الربو. بالإضافة إلى ذلك، كان 25 طفلاً يعانون من وضع اجتماعي واقتصادي منخفض أو متوسط، و18 طفلاً لم يكن لديهم ضمان اجتماعي. توفي ثلاثة مرضى بمتوسط عمر 9 سنوات بسبب قصور في الجهاز التنفسي.

بالإضافة إلى ذلك، في الفترة الممتدة من أبريل 2019 إلى مارس 2020، من إجمالي 67 عينة من مخاط القصبات الهوائية، كانت 64 عينة إيجابية، مما يعطي نسبة اصابات 98%. بلغت نسبة الاصابات المختلطة 80%، منها 51% بسبب الخمائر والبكتيريا، منها 27% بسبب *Candida albicans* والبكتيريا سالبة الجرام، التي تهيمن عليها *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

تم تحديد أربع ارتباطات بين *Candida albicans* /البكتيريا سالبة الجرام. تعايشت *C. albicans* مع بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* في ثلاثة اتحادات، ومع بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* وبكتيريا *Achromobacter xylosoxidans* في اتحاد واحد .

في الوضع البلاكتوني، جميع سلالات *C. albicans* حساسة للأمفوتريسين B وفوريكونازول. في المقابل، كانت سلالات *P. aeruginosa* و *A. xylosoxidans* مقاومة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها (سيفتازيديم، إيميبينيم، أميكاسين، جنتاميسين، سيروفلوكساسين وكوليستين). بالإضافة إلى ذلك، شكلت جميع السلالات المختبرة أغشية حيوية أحادية ومتعددة الأنواع في المختبر. كانت معدلات SCMs أعلى بما يصل إلى 128 مرة من معدلات CMIs. وأظهر علاج الأغشية الحيوية بمزيج من مضادات الفطريات والمضادات الحيوية تفاعلات تآزرية وغير متباينة مع انخفاض كبير في SCMs. كما أثبت محلول ملحي مفرط التوتر بنسبة 7% فعاليته في تثبيط الأغشية الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** التليف الكيسي، دراسة متعددة المراكز، *Candida albicans/ Pseudomonas aeruginosa*، تثبيط الأغشية الحيوية المختلطة، تركيبات مضادات الميكروبات، غرب الجزائر

## Résumé :

La mucoviscidose est considérée comme étant une maladie rare en Algérie et les données cliniques et démographiques sont incomplètes en raison de l'absence d'un registre médical national. C'est pourquoi, nous avons entrepris ce travail qui a porté sur deux volets. Le premier consiste à faire une étude multicentrique visant à caractériser la population atteinte de mucoviscidose dans l'ouest algérien. Le deuxième volet, est consacré à la recherche des altérations polymicrobiennes *C.albicans*/bactéries à Gram négatifs dans les mucus bronchiques de ces patients.

Les résultats obtenus ont montré que sur les 34 enfants, dont 16 garçons et 18 filles, atteints de mucoviscidose suivis à l'EHS d'Oran inclus dans cette étude, 15 seulement ont été diagnostiqués avant l'âge de 6 mois. Tous les patients présentent des manifestations respiratoires et digestives, 33 un encombrement bronchique, 10 une bronchopneumonie sévère et 4 sont asthmatiques.

De plus, 25 enfants sont d'un niveau socio-économique faible à intermédiaire et 18 n'ont pas de couverture sociale. Trois patients sont décédés à un âge moyen de 9 ans à cause d'une insuffisance respiratoire.

Par ailleurs, d'avril 2019 à mars 2020, sur un total de 67 mucus bronchiques prélevés, 64 se sont révélés positifs, soit un taux d'altération de 98%. Les altérations mixtes représentent 80%, avec 51% causées par des levures et des bactéries dont 27% sont altérés par *Candida albicans* et des bactéries Gram négatives, dominées par *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

Quatre associations de *Candida albicans*/bactéries à Gram négatif sont identifiées. *C. albicans* cohabite avec *P. aeruginosa* dans trois associations et avec *P. aeruginosa* et *Achromobacter xylosoxidans* dans une association.

En mode planctonique, toutes les souches de *C. albicans* sont sensibles à l'amphotéricine B et au voriconazole. En revanche, les souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* sont résistantes à tous les antibiotiques testés (la ceftazidime, l'imipénème, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et la colistine). De plus, toutes les souches testées sont formatrices de biofilms mono et multi-espèces *in vitro*. En mode sessile, les SCMI sont jusqu'à 128 fois plus élevées que les CMI. Le traitement des biofilms par des combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques a montré des interactions de type synergique et indifférente avec une réduction significative des SCMI. La solution saline hypertonique à 7% s'est montrée également efficace pour l'inhibition des biofilms.

**Mots clés :** Mucoviscidose, étude multicentrique, *Candida albicans*/ *Pseudomonas aeruginosa*, inhibition biofilms mixtes, combinaisons d'antimicrobiens, ouest Algérien

## **Abstract:**

Cystic fibrosis is considered a rare disease in Algeria, and clinical and demographic data are incomplete due to the absence of a national medical registry. For this reason, we undertook this work, which has two parts. The first part is a multicenter study to characterize the population affected by cystic fibrosis in western Algeria. The second part focuses on investigating polymicrobial alterations of *C. albicans*/Gram-negative bacteria in the bronchial mucus of these patients.

Results showed that of the 34 children (16 boys and 18 girls) with cystic fibrosis followed at the Oran EHS included in this study, only 15 were diagnosed before the age of 6 months. All patients presented with respiratory and digestive manifestations, 33 with bronchial congestion, 10 with severe bronchopneumonia and 4 with asthma. In addition, 25 children were of low to intermediate socio-economic status, and 18 had no social security coverage. Three patients died at an average age of 9 years from respiratory failure.

Furthermore, from April 2019 to March 2020, out of a total of 67 bronchial mucus samples, 64 were positive, representing a 98% alteration rate. Mixed alterations accounted for 80%, with 51% caused by yeasts and bacteria, of which 27% were altered by *Candida albicans* and Gram negative bacteria, dominated by *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

Four *Candida albicans*/Gram-negative bacteria associations have been identified. *C. albicans* cohabits with *P. aeruginosa* in three associations, and with *P. aeruginosa* and *Achromobacter xylosoxidans* in one association.

In planktonic mode, all *C. albicans* strains are sensitive to amphotericin B and voriconazole. In contrast, *P. aeruginosa* and *A. xylosoxidans* strains were resistant to all the antibiotics tested (ceftazidime, imipenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and colistin). In addition, all the strains tested form single and multi-species biofilms in vitro. In sessile mode, SCMI are up to 128 times higher than MICs. Treatment of biofilms with combinations of antifungals and antibiotics showed synergistic and indifferent interactions with a significant reduction in SCMI. Hypertonic saline at 7% was also shown to be effective in inhibiting biofilms.

**Key words:** Cystic fibrosis, multicenter study, *Candida albicans*/*Pseudomonas aeruginosa*, mixed biofilm inhibition, antimicrobial combinations, western Algeria

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*À mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie.*

*Que ce travail soit la modeste preuve de ma reconnaissance infinie et de mon profond  
amour pour eux.*

*À mes sœurs Hadjer, Maria et Lina pour leur présence à mes côtés.*

*À toute ma famille et mes amis dont le soutien et l'encouragement ont été une source  
inestimable de force et d'inspiration.*

*Imène*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Allah, le Tout-Puissant, pour m'avoir octroyé la santé, la sérénité, ainsi que la force et le courage nécessaires pour poursuivre mes études.

Je souhaite exprimer mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse, Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia, Professeur 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 à l'université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen, pour avoir accepté de m'encadrer. Sa disponibilité, ses conseils éclairés et son soutien constant ont été d'une valeur inestimable tout au long de cette recherche. Je lui suis également reconnaissante pour sa bienveillance, sa gentillesse et son dévouement, qui ont rendu cette expérience enrichissante et mémorable.

Je suis très honorée que Madame SARI-BELKHERROUBI Lamia, Professeur 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 à l'université Aboubekr BELKAÏD Tlemcen, ait accepté de présider le jury.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame BABA AHMED-KAZI TANI Zahira Zakia, Maître de conférences 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 à l'université Aboubekr BELKAÏD Tlemcen, et Directrice du laboratoire "Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab)", pour son aide précieuse. Sa sympathie et ses conseils très précieux qui ont grandement enrichi ce travail. Je lui exprime ma profonde gratitude pour avoir accepté de siéger en tant que membre de ce jury.

Je tiens également à témoigner toute ma gratitude à Monsieur GHELLAI Lotfi, Professeur de microbiologie à l'université Moulay Tahar-Saida, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Je voudrais remercier Monsieur HALLA Noureddine, Maître de conférences classe A de biochimie à l'université Moulay Tahar-Saida, pour avoir accepté d'être membre de mon jury. Je lui exprime ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur RADOUI Abdelkarim Professeur et ancien Chef de service de Pneumologie et d'Allergologie Pédiatriques à L'Etablissement Hospitalier Spécialisé Canastel Oran ; Je lui suis reconnaissante pour son orientation, sa disponibilité et sa gentillesse, qui ont été d'une grande aide pour moi.

J'exprime ma gratitude à Monsieur BOUCHERIT Kebir ancien Professeur de biochimie à l'université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen, pour avoir généreusement consacré du temps à relire attentivement mon manuscrit et à fournir des suggestions enrichissantes. Sa gentillesse, ses encouragements ont été d'une grande importance pour moi.

Un grand merci à tous les doctorants, Karima, Ikram, Hafsa, Amel, Fatima Zohra, Wafaa, Abdeselem, ainsi qu'aux ingénieures et aux membres du laboratoire LAPSAB pour leur aide, leur amitié et les moments agréables partagés ensemble.

J'aimerais remercier également tous les patients qui ont généreusement accepté de participer à cette étude et tout le personnel hospitalier qui a contribué à la réalisation de cette étude. Je pense particulièrement à Mlle BOUZID Safaa kinésithérapeute au service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques à l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Canastel Oran.

Je remercie tous ceux qui, par leur encouragement, leur aide, leur conseil, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Liste des figures

Figure N°1 :	Schéma représentant les six classes d'altérations de la CFTR et les organes affectés ( <b>Santos-Fernandez et coll., 2023</b> ).....	3
Figure N°2 :	Evolution du microbiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose au cours de la progression de la maladie ( <b>Santos-Fernandez et coll., 2023</b> ).....	4
Figure N°3 :	Cycle de formation d'un biofilm polymicrobien créé avec BioRender.com.....	7
Figure N°4 :	Interactions entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Candida albicans</i> ( <b>Gourari-Bouzouina et coll., 2024</b> ).....	9
Figure N°5 :	Localisation des centres de référence pour la mucoviscidose en Algérie.....	12
Figure N°6 :	Répartition des enfants atteints de mucoviscidose selon la ville d'origine...	27
Figure N°7 :	Taux des altérations mono et multi-espèces.....	33
Figure N°8 :	Répartition des altérations multi-espèces levures/bactéries.....	34
Figure N°9 :	Répartition des altérations levures/bactéries à Gram négatif selon le sexe et l'âge des enfants mucoviscidosidiques.....	34
Figure N°10 :	Identification des levures et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique.....	35
Figure N°11 :	Dendrogramme des produits de l'ERIC-PCR des souches de <i>P. aeruginosa</i> co-isolées avec <i>C. albicans</i> d'un même mucus bronchique.....	40
Figure N°12 :	Biomasses des biofilms mono et multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> quantifiées par la méthode du crystal violet.....	46
Figure N°13 :	CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> co-isolées avec <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> d'un même mucus bronchique.....	48
Figure N°14 :	CMI des antibiotiques vis-à-vis des cellules sessiles de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> .....	49



Figure N°15 :	SCMIs de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> seules et associées à <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> .....	51
Figure N°16 :	SCMIs des antibiotiques vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> seules et associées à <i>C. albicans</i> .....	53
Figure N°17 :	Activités métaboliques des biofilms mono et multi-espèces obtenus par réduction du MTT.....	54
Figure N°18 :	Inhibition des biofilms mono et multi-espèces par des solutions salines hypertoniques de NaCl.....	61
Photo N°1 :	Profils électrophorétiques des produits de l'ERIC-PCR sur gel d'agarose 1,5%.....	39

## Liste des tableaux

Tableau N°1 :	Caractéristiques longitudinales des enfants mucoviscidosiques de l'ouest Algérien suivis à l'EHS d'Oran.....	28
Tableau N°2 :	Caractéristiques cliniques des enfants mucoviscidosiques de l'ouest Algérien.....	30
Tableau N°3 :	Antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>A. xylosoxidans</i> co-isolées avec <i>C. albicans</i> d'un même mucus bronchique des enfants atteints de mucoviscidose.....	38
Tableau N°4 :	CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis de <i>C. albicans</i> .....	41
Tableau N°5 :	CMI des antibiotiques testés vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>A. xylosoxidans</i> co-isolés avec <i>C. albicans</i> .....	43
Tableau N°6 :	Inhibition des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par l'amphotéricine B et les antibiotiques seuls et combinés.....	57
Tableau N°7 :	Valeurs des FICI et type d'interaction entre l'amphotéricine B et les antibiotiques vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> .....	57
Tableau N°8 :	Inhibition des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par le voriconazole et les antibiotiques seuls et combinés.....	60
Tableau N°9 :	Valeurs des FICI et type d'interaction entre le voriconazole et les antibiotiques vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> .....	59

## Liste des abréviations

AmB : Amphotéricine B

BHIB : *Brain Heart Infusion Broth*

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité optique

FICI : Indices des Concentrations Fractionnaires Inhibitrices

MOPS : *3-(N-morpholino) propan sulfonic acid*

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium

PBS : *Phosphate-buffered saline*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SCMI : Concentration Minimale Inhibitrice Sessile

Vor : Voriconazole

# Sommaire

<b>Première partie : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>1</b>
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes.....</b>	<b>11</b>
<b>A. Etude de la population mucoviscidosique de l'ouest Algérien .....</b>	<b>12</b>
1. Région couverte par l'étude.....	12
2. Critères d'inclusion .....	13
3. Collecte de données.....	13
4. Analyse des données .....	14
<b>B. Etude microbiologique .....</b>	<b>14</b>
1. Prélèvements du mucus bronchique .....	14
2. Isolement et purification des microorganismes.....	14
3. Identification des souches .....	15
4. Détermination du profil de résistance des souches de <i>Candida</i> sp. et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique.....	15
4.1. Antibiogramme des bactéries à Gram négatif co-isolées avec <i>Candida</i> sp. d'un même mucus bronchique .....	15
4.2. Profilage moléculaire des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> co-isolées avec <i>Candida</i> sp. d'un même mucus bronchique par ERIC-PCR .....	16
4.2.1. Extraction et amplification de l'ADN bactérien.....	16
4.2.2. Réaction de la PCR.....	16
4.2.3. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	17
4.2.4. Analyse de la similarité génétique.....	17
4.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques et des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>C. albicans</i> et de <i>P. aeruginosa</i> co-isolées d'un même mucus bronchique .....	17
5. Evaluation du potentiel des souches co-isolées d'un même mucus bronchique à former des biofilms mono et multi-espèces <i>in vitro</i> .....	19

5.1. Formation <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces ( <i>C. albicans</i> / <i>P. aeruginosa</i> ).....	19
5.2. Quantification de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces .....	19
6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques et des antibiotiques vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> et de <i>P. aeruginosa</i> co- isolées d'un même mucus bronchique .....	20
7. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms mono et multi-espèces formés par <i>C. albicans</i> et <i>P. aeruginosa</i> co-isolés d'un même mucus bronchique.....	21
8. Inhibition des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> et <i>P. aeruginosa</i> co-isolés d'un même mucus bronchique .....	22
8.1. Inhibition par des combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques .....	22
8.2. Inhibition des biofilms mono et multi-espèces par des solutions salines hypertoniques.....	23
<b>Troisième partie : Résultats et discussion.....</b>	<b>24</b>
<b>A. Etude de la population mucoviscidosique de l'ouest Algérien .....</b>	<b>26</b>
<b>B. Etude microbiologique.....</b>	<b>33</b>
1. Détermination des altérations mixtes levures/bactéries dans les mucus bronchiques .....	33
2. Identification des levures et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique .....	35
3. Antibiogramme des souches de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>A. xylosoxidans</i> co-isolées avec <i>C. albicans</i> d'un même mucus bronchique.....	37
3.1. Profilage moléculaire des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par ERIC-PCR.....	39
4. Etude du profil de résistance des souches de <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> co-isolées d'un même mucus bronchique.....	41
4.1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules planctoniques de <i>Candida albicans</i> .....	41
4.2. Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> en mode planctonique.....	42

5. Formation des biofilms mono et multi-espèces <i>in vitro</i> par les souches de <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> co-isolées d'un même mucus bronchique.....	45
5.1. Biomasses des biofilms mono et multi-espèces.....	45
5.2. CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> co-isolées avec <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> d'un même mucus bronchique.....	47
5.3. CMI des antibiotiques vis-à-vis des cellules sessiles de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> co-isolées avec <i>C. albicans</i> d'un même mucus bronchique .....	48
5.4. SCMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des souches de <i>C. albicans</i> seules et associées à <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> .....	51
5.5. SCMI des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> seules et associées à <i>C. albicans</i> .....	52
5.6. Activités métaboliques des biofilms mono-espèces et multi espèces formés <i>in vitro</i> .....	54
6. Inhibition des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. xylosoxidans</i> co-isolés d'un même mucus bronchique.....	55
6.1. Inhibition par des combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques .....	55
6.2. Inhibition par des solutions salines hypertoniques .....	61
<b>Quatrième partie : Conclusion générale.....</b>	<b>63</b>
<b>Cinquième partie : Références bibliographiques.....</b>	<b>68</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>85</b>

---

## **Première partie**

# **Synthèse bibliographique**

---

La mucoviscidose ou fibrose kystique est une maladie génétique autosomique récessive, due à une mutation du gène CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sur le bras long du chromosome 7 au niveau du locus 7q31. Elle est considérée comme étant la maladie la plus courante dans la population caucasienne avec la prévalence la plus élevée en Europe, en Amérique du Nord et en Australie **(Elborn, 2016)**.

Cette maladie touche environ 70000 patients dans le monde et près de 1000 nouveaux cas de mucoviscidose sont diagnostiqués chaque année **[(Spoonhower et Davis., 2016); (Lascano-Vaca et coll., 2020)]**. Cette fréquence varie selon l'origine géographique et ethnique des patients. En effet, en Europe, selon les régions, un enfant pour 1800 à 3500 naissances vivantes est atteint de mucoviscidose, alors qu'elle est moins fréquente chez les personnes de race noire, avec une incidence d'environ 1 cas sur 14000 chez les Afro-Américains **(Feuillet-Fieux et coll., 2004)**.

Cette maladie est beaucoup plus rare parmi les populations d'Asie et d'Afrique. En Asie occidentale, l'incidence de la mucoviscidose varie entre 1 sur 2500 et 1 sur 16000 naissances vivantes **(Hamouda et coll., 2020)**. Toutefois, dans les pays du Maghreb, elle est largement méconnue en raison de la rareté ou de l'absence de données épidémiologiques.

En effet, même si la Tunisie est le premier pays du Maghreb à avoir instauré le diagnostic de la mucoviscidose en 1990, l'incidence globale de la mucoviscidose dans ce pays reste mal estimée **(El Makhzen et coll., 2024)**.

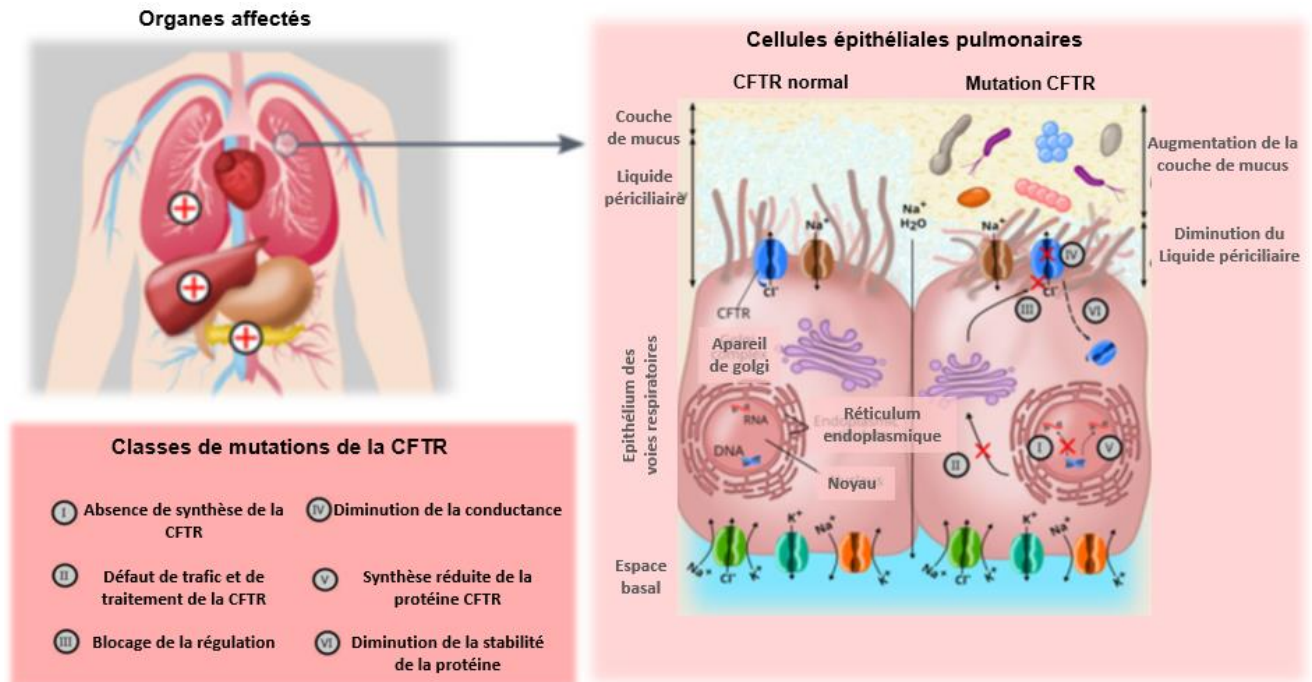
Au Maroc, l'épidémiologie de la mucoviscidose est peu documentée et le nombre de porteurs de la maladie n'est pas connu **(Ratbi et coll., 2008)**. Les informations sur la mucoviscidose en Libye sont également limitées. 31 personnes ont été diagnostiquées positives à cette maladie entre 2008, année de création du premier centre de mucoviscidose, et décembre 2010 **(Repetto et coll., 2011)**. En Algérie, l'incidence exacte de cette maladie n'est pas connue de manière précise et le nombre de patients recensés correspond aux cas colligés dans les services hospitaliers de la capitale et des grandes villes du pays.



En effet, après les premiers travaux sur cette maladie, menés à Alger par Benallégué et Grangaud en 1969 (**Radoui, 2012**), les études sur la mucoviscidose en Algérie n'ont repris qu'en 2006 par l'équipe de **Boukari** qui a montré que sur une période de 15 ans, 45 cas seulement sont observés. Par ailleurs, en 2010, 19 patients ont été recensés dans l'ouest de l'Algérie (**Radoui, 2012**).

La caractérisation génétique de la mutation CFTR a été également recherchée dans la population Algérienne par **Loumi et coll., (2008)** qui ont mis en évidence l'existence de la mutation Delta F 508 chez 38 patients et par **Sediki et coll., (2014)** qui ont identifié 14 mutations différentes dans un échantillon de 24 patients appartenant à des familles non apparentées. Récemment, une étude descriptive sur 51 enfants mucoviscidosiques de l'ouest Algérien, présentant des signes cliniques digestifs et hépatobiliaires, a été réalisée par **Boutrid et coll., (2021)**.

La mucoviscidose est causée par des mutations du gène qui code pour une protéine transmembranaire conductrice de chlorure, appelée régulateur de conductance transmembranaire fibrose Kystique (CFTR), qui régule le transport des anions (sécrétion de chlorure et inhibition de l'absorption de sodium) et la clairance mucociliaire dans les voies respiratoires. Ces mutations entraînent soit une absence de production ou de ciblage de la protéine CFTR à la membrane plasmique, soit la formation d'une protéine CFTR déformée non fonctionnelle (**Figure N°1**).



**Figure N° 1 : Schéma représentant les six classes d'altérations de la CFTR et les organes affectés (Santos-Fernandez et coll., 2023)**

Plus de 2000 mutations de la CFTR sont répertoriées dont 1300 sont associées à la maladie, classées en six catégories selon leurs effets : (I) absence de synthèse de CFTR ; (II) défauts de trafic et de traitement de la CFTR ; (III) régulation défectueuse ; (IV) diminution de la conductance ; (V) réduction de la synthèse de la protéine CFTR et (VI) une diminution de la stabilité des protéines (**Butnariu et coll., 2021**).

Lorsque l'une de ces altérations survient, le transport du chlorure est inhibé ce qui induit une perturbation du flux de l'eau à travers les tissus entraînant ainsi une augmentation de la quantité et de la densité du mucus sécrété (**Elborn, 2016**).

Il convient de noter que le dysfonctionnement mucociliaire implique qu'un patient atteint de mucoviscidose ne peut pas éliminer efficacement les bactéries inhalées, ce qui le rend dix fois plus susceptible de développer une inflammation des voies respiratoires inférieures par rapport à un individu sain. Pour la plupart des patients mucoviscidosiques, la maladie pulmonaire constitue le principal problème en termes de symptômes, de traitement et la cause de décès la plus probable. D'autres cellules épithéliales sont

concernées par le dysfonctionnement mucociliaire telles que celles du pancréas, du foie, des glandes sudoripares et du canal déférent (Davies et coll., 2007).

Les poumons des patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par une variabilité microbienne qui évolue avec l'âge. Bien que *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* soient prédominants chez les jeunes enfants, 60 à 70 % des patients atteints de mucoviscidose présentent une colonisation chronique à *Pseudomonas aeruginosa* à l'âge de 20 ans (O'Brien et Fothergill, 2017) (Figure N°2).

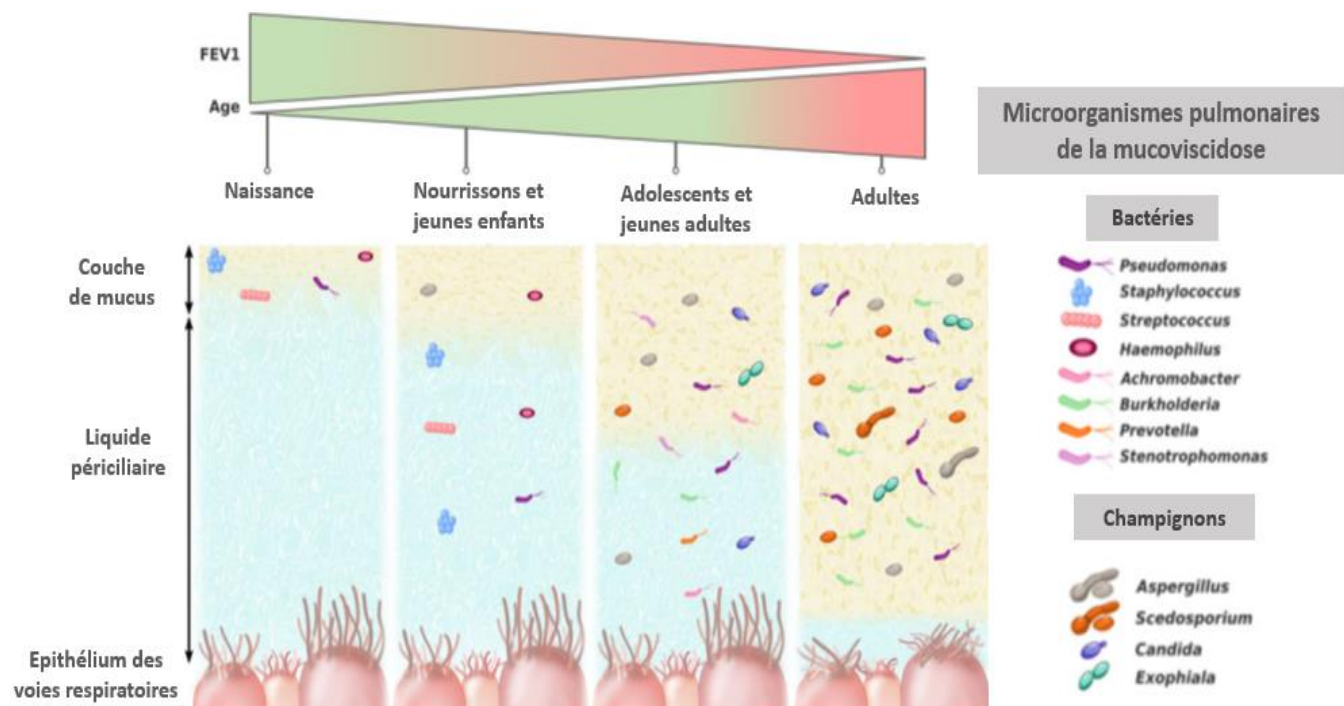


Figure N° 2 : Evolution du microbiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose au cours de la progression de la maladie (Santos-Fernandez et coll., 2023)

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est de loin le microorganisme le plus couramment isolés chez les patients mucoviscidosiques ou 60% d'entre eux présentent une colonisation chronique par cette bactérie. Ce taux peut atteindre 80% chez les patients de plus de 18 ans **(Høiby, 2000)**.

Dès l'enfance, les patients mucoviscidosiques présentent, de façon intermittente, une colonisation pulmonaire par *P. aeruginosa* qui peut évoluer en une infection chronique où la même lignée bactérienne persiste pendant des décennies malgré un traitement antibiotique. Ces infections sont associées à une morbidité et une mortalité très élevées chez cette population **(Jelsbak et coll., 2007)**.

Selon **Olivier et coll., (2009)**, la présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les voies respiratoires des enfants atteints de mucoviscidose au cours des cinq premières années de leur vie augmente le risque de mortalité d'un facteur de 2,6 comparé à celui observé chez les enfants avec la même maladie mais non colonisés par cette bactérie.

En effet, dans la mucoviscidose, les lésions épithéliales causées par *P. aeruginosa* favorisent la colonisation des voies respiratoires par d'autres espèces bactériennes et fongiques. De nombreuses études ont rapportées que des bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* et des espèces émergentes telles que *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* sont souvent co-isolées avec *P. aeruginosa* **[(Sajjan et coll., 2001) ; (Lyczak et coll., 2002) ; (Menetrey et coll., 2020)]**.

Des travaux antérieurs ont rapporté que dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose, les bactéries sont entourées d'un gel d'alginate. Il s'agit d'une matrice de polymère impliquée dans la viscosité des sécrétions bronchiques dont la production est liée au phénotype mucoïde qui affecte le gène mucA de certaines bactéries Gram négatives et plus particulièrement l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* **[(Martin et coll., 1993) ; (Drenkard et Ausubel, 2002) ; (Li et coll., 2005)]**. Pour cela, *P. aeruginosa* à phénotype mucoïde est considérée comme un indicateur de l'infection chronique dans le cas de la mucoviscidose et sa présence dans les poumons entraîne des lésions tissulaires et une détérioration de la fonction respiratoire **(Lee et coll., 2005)**.

Des champignons filamenteux du genre *Aspergillus* et *Scedosporium* ainsi que des levures du genre *Candida* ont été également retrouvés dans les voies respiratoires de

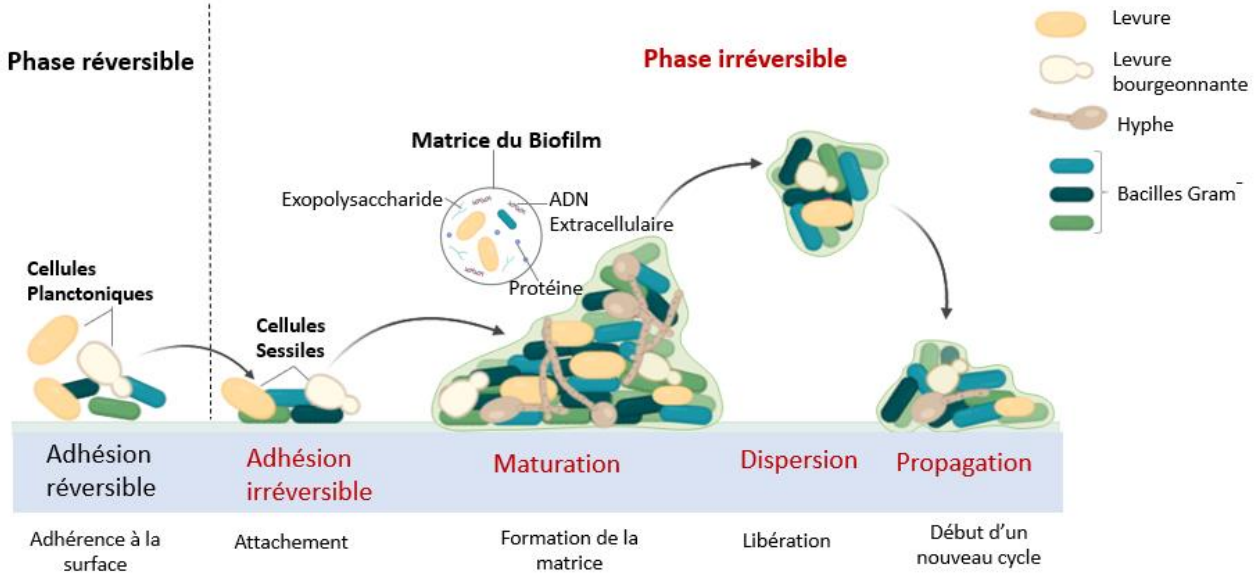
patients atteints de mucoviscidose colonisés par *P. aeruginosa* [(Chotirmall et Mc Elvaney, 2014) ; (Blanchard et Waters, 2019)].

Par ailleurs, *Pseudomonas aeruginosa* est souvent présente dans les infections polymicrobiennes avec la levure *Candida albicans*. Ces deux agents pathogènes opportunistes colonisent les poumons des patients atteints de mucoviscidose et forment des biofilms constitués de microcolonies engainées dans l'alginate (Fourie et coll., 2016). Ces derniers semblent être le principal facteur déclencheur d'une réponse inflammatoire exacerbée pouvant causer des dommages durables dans la structure et la fonction pulmonaire [(Burmolle et coll., 2010) ; (Bhagirath et coll., 2016)].

Ces biofilms ont la capacité de croître rapidement en raison des conditions environnementales propices à leur développement telles que la disponibilité des nutriments, le pH, la température et la présence d'autres microorganismes concurrents [(Pompilio et coll., 2021) ; (Ponde et coll., 2021)].

Les biofilms sont des communautés microbiennes hétérogènes dynamiques structurées, avec un arrangement spatial optimal qui facilite l'apport des nutriments et l'élimination des déchets. Les microorganismes sont enrobés dans une matrice extracellulaire autoproduite et fixés sur des surfaces abiotiques ou biotiques comme les muqueuses et les tissus vivants (Jørgensen et coll., 2015).

La formation des biofilms mono ou multi-espèces nécessite le passage obligé par différentes phases (Costerton, 1999) (Figure N°3) :



**Figure N°3 : Cycle de formation d'un biofilm polymicrobien créé avec BioRender.com**

Les bactéries pionnières de *Pseudomonas aeruginosa* adhèrent d'une manière réversible à la muqueuse pulmonaire par des liaisons de faibles énergies (interactions de Van Der Waals, acido-basiques et électrostatiques). Cette étape est suivie par une adhésion irréversible qui fait appel à des interactions spécifiques de type protéines/ligands entre les bactéries et la surface colonisée. Pour les bactéries Gram négatives, ces interactions impliquent des adhésines de surface présentes sur les pilis, les curlis, la capsule et le glycocalix (Van Houdt, 2005). Il en résulte la formation d'un film basal bactérien auquel les levures de *Candida albicans* viennent adhérer, on parle alors de co-agrégation et la formation d'une microflore mixte. Cette dernière se multiplie et sécrète une matrice exopolymérique aboutissant à un réseau complexe tridimensionnel caractérisé par un changement dans la morphologie de *C. albicans* de la forme blastospore à la forme hyphe donnant lieu à la phase de maturation. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, telles que la limitation de la disponibilité en oxygène dans les biofilms épais, l'apparition de forces de cisaillement dues aux flux hydrodynamiques ou à la diminution de la concentration et de la nature des nutriments disponibles, des

microorganismes peuvent se détacher du biofilm et coloniser de nouveaux sites, c'est la phase de dispersion **(Rumbaugh et Sauer, 2020)**.

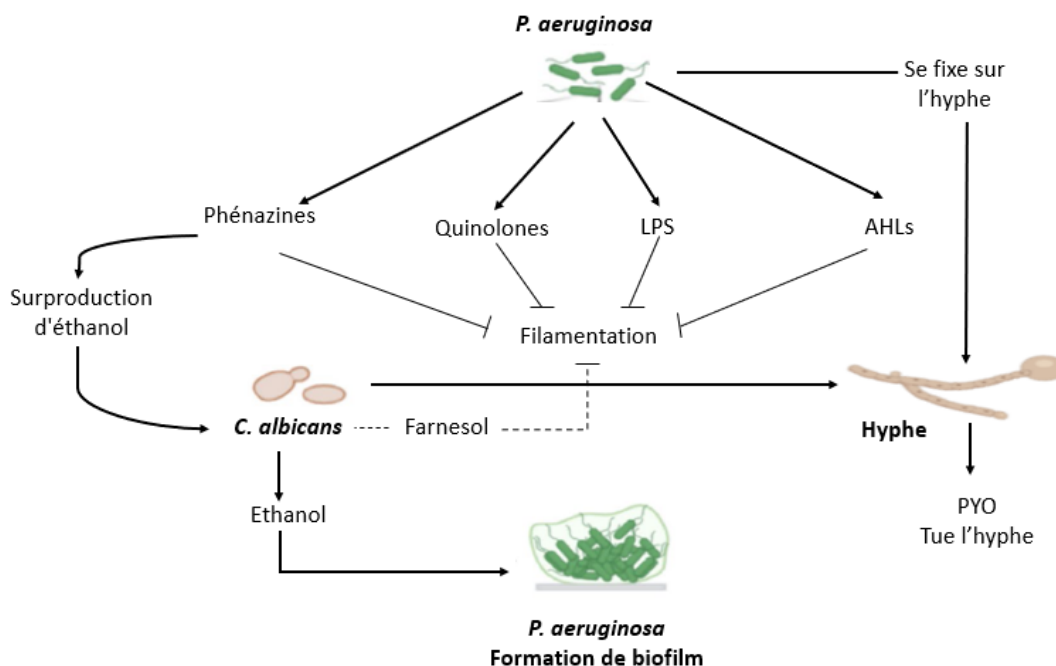
Au sein d'un biofilm, les nombreuses interactions microbiennes observées (échanges génétiques, métaboliques, molécules de signalisation) influencent la croissance, la virulence et la survie des microorganismes constitutifs de cette communauté **[(Wongsuk et coll., 2016) ; (Ponde et coll., 2021)]**. Ainsi, l'organisation en biofilm entraîne une modification phénotypique et génotypique des cellules microbiennes et leur assure une protection physique et une résistance aux différents traitements **(Madsen et coll., 2012)**. Les interactions inter-espèces au sein d'un biofilm polymicrobien peuvent aboutir également à une résistance accrue des microorganismes aux agents antimicrobiens **(Peters et coll., 2012)**.

Dans un biofilm polymicrobien, les populations bactériennes et fongiques peuvent ajuster leur comportement en réponse à la détection des molécules du quorum-sensing produites par ces différentes espèces.

Le quorum sensing (QS) est un système de communication intercellulaire impliquant la production, la sécrétion et la détection par les microorganismes de molécules signales appelées auto-inducteurs. Il permet aux microorganismes d'adapter leur comportement par régulation de l'expression de certains gènes en réponse à la concentration en molécules signales. Pour les bactéries Gram négatives comme *P. aeruginosa*, trois systèmes de QS sont identifiés, deux basés sur des acyl homosérines lactones (AHL) et un sur une quinolone (*Pseudomonas Quinolone Signal*, PQS). En revanche, pour *Candida albicans*, modèle le plus étudié pour les cellules eucaryotes, deux molécules sont impliquées dans ce processus, le farnésol et le tyrosol **[(De Kievit et Iglewski, 2000) ; (Polke et coll., 2018)]**.

Les acyl homosérines lactones favorisent la production de protéines d'adhésion de surface par *Pseudomonas aeruginosa* qui interviennent dans son adhérence aux hyphes de *Candida albicans* **[(Morales et Hogan, 2010) ; (Ovchinnikova et coll., 2012)]**. Alors que le *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS), régule la motilité en essaim de *P. aeruginosa*, inhibe la formation de biofilms de *C. albicans* et induit la production de divers facteurs de virulence tels que les composés phénaziniques dont le représentant

majeur est la pyocyanine (PYO) qui inhibe la transition de la morphologie de levure à celle d'hyphes chez *C. albicans* [(Reen et coll., 2011) ; (Phelan et coll., 2014) ; (Fourie et coll., 2016)]. De plus, *P. aeruginosa* secrète un lipopolysaccharide (LPS) qui réduit la filamentation et l'activité métabolique du biofilm de *Candida albicans* (Bandara et coll., 2013). En parallèle, *C. albicans* produit le farnésol qui inhibe la production de pyocyanine, un facteur de virulence chez *P. aeruginosa* et l'éthanol qui stimule l'adhésion et la formation du biofilm de *P. aeruginosa* [(Morales et coll., 2013) ; (Chen et coll., 2014) ; (Lopez-Medina et coll., 2015)] (Figure N°4).



**Figure N°4 : Interactions entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* (Gourari-Bouzouina et coll., 2024)**

Rappelons que la mucoviscidose est caractérisée par un épaissement du mucus qui recouvre les parois des voies respiratoires et une diminution de la clairance mucociliaire ce qui offre un environnement favorable à la colonisation microbienne, permettant aux microorganismes de persister et de former des biofilms polymicrobiens dans les voies respiratoires inférieures (Muthig et coll., 2010). Parmi ces microorganismes, les bactéries Gram négatives, avec une prédominance de *Pseudomonas aeruginosa* et les levures, principalement *Candida albicans* sont le plus couramment retrouvés (O'Brien et Fothergill, 2017). Cependant, cette colonisation simultanée est liée à des issues



cliniques plus graves, incluant un déclin accéléré de la fonction pulmonaire et une aggravation de la progression de la maladie (**Dhamgaye et coll., 2016**).

Pour améliorer la prise en charge des infections microbiennes chez les patients atteints de mucoviscidose, il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies qui prennent en compte la composition unique des biofilms de chaque patient ainsi que les interactions entre les différents microorganismes qui les composent.

En Algérie, la fréquence de cette maladie reste inconnue, car il n'existe ni étude épidémiologique ni registre médical national. De plus, à ce jour, aucune étude microbiologique n'a été effectuée sur les infections pulmonaires impliquant à la fois des bactéries Gram négatives et des levures du genre *Candida*. C'est pourquoi nous avons entrepris cette étude qui a porté sur la :

- Description de la population de patients pédiatriques atteints de mucoviscidose dans l'ouest Algérien par une caractérisation clinique, pathologique, socio-économique et microbiologique ;
- Recherche des altérations mixtes (*Candida albicans*/bactéries Gram négatives) sur des mucus bronchiques impliqués dans les infections pulmonaires ;
- Détermination de la sensibilité des souches de *C. albicans* et les bactéries Gram négatives co-isolées d'un même mucus bronchique à différents antimicrobiens ;
- Mise en évidence du potentiel de formation des biofilms mono et multi-espèces par les levures de *C. albicans* et les bactéries Gram négatives co-isolées d'un même mucus bronchique, *in vitro* ;
- Evaluation de l'effet inhibiteur de différents antifongiques et antibiotiques seuls et combinés ainsi que des solutions salines hypertoniques vis-à-vis des biofilms mono et multi-espèces.

---

# **Deuxième partie**

## **Matériel et méthodes**

---

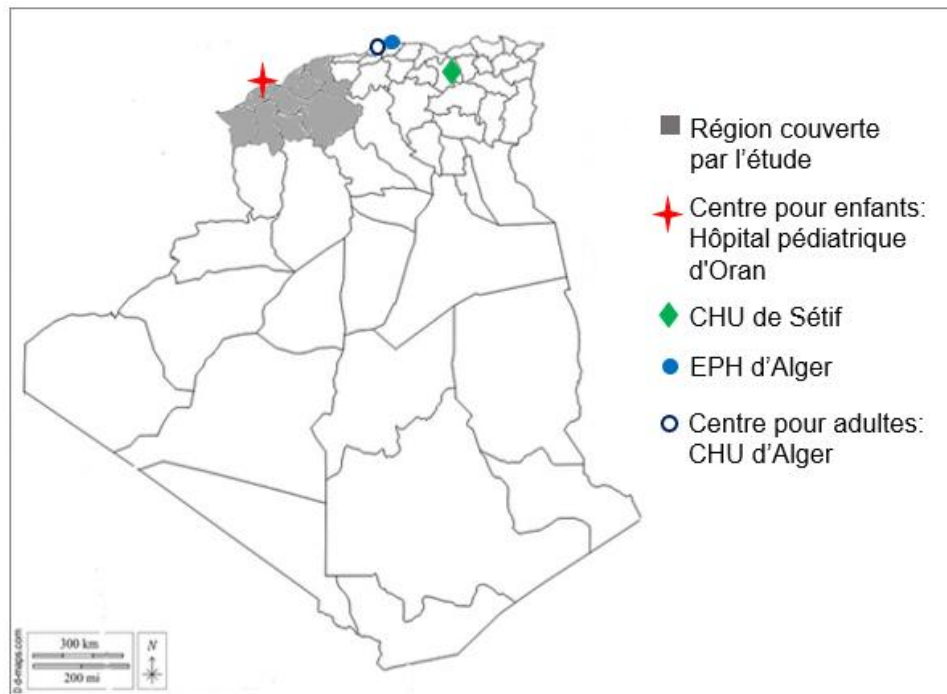
Ce travail de thèse est réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen.

### A. Etude de la population mucoviscidosique de l'ouest Algérien

Il s'agit d'une étude à la fois descriptive, analytique et prospective, dont le but consiste à évaluer les altérations polymicrobiennes (fongiques et bactériennes) chez des enfants atteints de mucoviscidose et suivis au service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé en pédiatrie (EHS) Pr. BOUKHROUFA Abdelkader d'Oran.

#### 1. Région couverte par l'étude

Actuellement, l'Algérie compte quatre centres de référence pour la mucoviscidose, le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif, qui couvre la région est de l'Algérie, le Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) et l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) d'Alger qui couvrent la région centre, et l'Etablissement Hospitalier Spécialisé en pédiatrie (EHS) d'Oran, qui couvre la région ouest où nous avons réalisé notre travail (**Figure N°5**).



**Figure N°5 : Localisation des centres de référence pour la mucoviscidose en Algérie**

Notre étude couvre neuf wilayas de la région sanitaire de l'ouest Algérien à savoir Ain Témouchent, Chlef, Mascara, Mostaganem, Oran, Relizane, Saida, Tiaret et Tlemcen soit un total de 7 200 158 habitants ce qui représente 16,1% de la population nationale qui est de 44,6 millions d'habitants (**Office Nationale des Statistiques, 2020**).

## **2. Critères d'inclusion**

Ce travail porte sur 34 enfants âgés de moins de 15 ans, demeurant dans l'ouest Algérien, présentant un ou plusieurs signes phénotypiques de la mucoviscidose et dont le diagnostic est confirmé par deux tests de la sueur positifs (**Radoui, 2012**).

Cette étude est examinée et approuvée par le comité d'éthique de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen.

## **3. Collecte de données**

L'enquête consiste à renseigner un questionnaire préétabli, inspiré des dossiers médicaux des enfants atteints de la mucoviscidose et suivis au service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques de l'EHS d'Oran (**Annexe I**). Un consentement éclairé des tuteurs légaux des patients est également obtenu.

Le questionnaire porte principalement sur des données :

- démographiques (âge, sexe, origine, adresse, antécédents familiaux),
- sociales (éducation, statut professionnel des parents),
- cliniques (paramètres anthropométriques, signes pulmonaires, digestifs, infectieux),
- biologiques (paramètres nutritionnels),
- bactériologiques des expectorations,
- prise en charge thérapeutique (différentes actions thérapeutiques instaurées),
- suivi des patients (nombre d'hospitalisations),
- morbidité (principales complications liées à la mucoviscidose), mortalité (âge du décès, causes).

#### **4. Analyse des données**

Le trouble de la croissance est évalué en utilisant les courbes de Sempé, tandis que l'Indice de Masse Corporelle (IMC) est calculé en se référant aux courbes de corpulence établies selon les références françaises et celles de l'*International Obesity Task Force* (IOTF) (Kéké et coll., 2015).

Une analyse statistique des résultats obtenus est réalisée par le test T de Student, ANOVA à un facteur et le test de Tukey à l'aide du logiciel *IBM Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) version 26.0, en considérant qu'une valeur  $p < 0,05$  est statistiquement significative.

#### **B. Etude microbiologique**

##### **1. Prélèvements du mucus bronchique**

Entre avril 2019 et mars 2020, des mucus bronchiques sont récupérés chez des enfants atteints de mucoviscidose et suivis au service de pneumologie et d'allergologie de l'EHS pédiatrique Pr BOUKHROUFA Abdelkader d'Oran.

Les mucus bronchiques sont prélevés le matin à jeûn après un rinçage abondant de la bouche avec du sérum physiologique. Ces derniers sont induits par une kinésithérapie de drainage et récupérés par un kinésithérapeute. Une fois collectés dans des pots stériles étiquetés, ils sont immédiatement transportés au laboratoire dans une glacière pour des analyses microbiologiques.

##### **2. Isolement et purification des microorganismes**

Après une dilution au  $\frac{1}{2}$  des mucus bronchiques récupérés dans le sérum physiologique, 200 $\mu$ L sont prélevés et répartis à volume égal dans deux tubes stériles, l'un contenant 900 $\mu$ L de milieu Sabouraud liquide destiné à la recherche des levures et l'autre 900 $\mu$ L de bouillon nutritif pour la recherche des bactéries. Les tubes sont agités au vortex puis incubés à 37°C pendant 24 heures.

A partir des échantillons présentant un trouble, des boîtes de Pétri contenant la gélose Sabouraud pour l'isolement des levures, sontensemencées par stries puis incubées à 35°C pendant 24 à 48 heures voire 72 heures. Pour l'isolement des bactéries, deux

milieux de culture sélectifs sont utilisés, le milieu Mac Conkey pour les bactéries à Gram négatif et le milieu Chapman pour les bactéries à Gram positif.

La purification des levures et des bactéries à Gram positif et à Gram négatif isolées est réalisée par passages successifs sur les milieux sélectifs correspondants à partir d'une colonie pure. Chaque souche pure reçoit un code et est conservée à +4°C sur une gélose inclinée en tube.

Il est important de noter que seules les souches de *Candida* sp. et les bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique sont retenues pour la suite de notre travail.

### **3. Identification des souches**

L'identification des levures isolées et purifiées est réalisée par croissance sur milieu Chrom-Agar *Candida* (Sigma), par galeries API® *Candida* (Biomerieux) et par le système Vitek 2. En ce qui concerne les bactéries, l'identification est basée sur l'utilisation des galeries API 20E® et API 20NE® (Biomerieux) et du système Vitek2.

### **4. Détermination du profil de résistance des souches de *Candida* sp. et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique**

#### **4.1. Antibiogramme des bactéries à Gram négatif co-isolées avec *Candida* sp. d'un même mucus bronchique**

Les tests d'antibiogrammes sont effectués par la technique de diffusion en milieu gélifié selon le protocole standard de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M100S, 2016)*. Des disques imprégnés de concentrations déterminées d'antibiotiques sont déposés à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose Müller-Hinton préalablementensemencée par un inoculum de 10<sup>8</sup> UFC/mL de la souche à tester. Ces boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 20 à 24 heures.

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

Treize antibiotiques sont utilisés, la ticarcilline (TIC), la ticarcilline + acide clavulanique (TCC), la piperacilline (PIP), la piperacilline + tazobactam (PTZ), le ceftazidime (CAZ), la

cefepime (FEP), l'aztréonam (ATM), l'imipénème (IPM), le meropenem, la gentamicine (GEN), l'amikacine (AK), la tobramycine (TOB) et la ciprofloxacine (CIP).

Un contrôle de qualité est réalisé en utilisant la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 appartenant au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » (LapSab).

Les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines sont déterminés à partir de l'antibiogramme seul en cas d'absence de résistance aux antibiotiques testés et par la recherche de la surexpression de bêta-lactamases de la classe C de Ambler (AmpC) ou l'acquisition d'enzymes comme les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) et les carbapénémases, en présence d'une résistance à la ceftazidime ou l'imipénème.

La mise en évidence de ces mécanismes de résistance est basée, d'une part, sur la comparaison des diamètres d'inhibition et les tests de synergie sur gélose Müller-Hinton et Müller-Hinton additionnée de cloxacilline à 1000mg/L. D'autre part, sur la recherche de métallobêta-lactamases par imipénème avec l'EDTA (**Bergès et coll., 2007**).

#### **4.2. Profilage moléculaire des souches de *Pseudomonas aeruginosa* co-isolées avec *Candida* sp. d'un même mucus bronchique par ERIC-PCR**

Cette technique est réalisée au laboratoire Gene Life Sciences de Sidi Bel Abbès (Algérie).

##### **4.2.1. Extraction et amplification de l'ADN bactérien**

A partir d'une culture bactérienne pure, l'ADN est extrait suivant une méthode standard d'extraction appropriée puis amplifié par *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR) en utilisant deux amorces oligonucléotidiques ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') et ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (**Versalovic et coll., 1991**).

##### **4.2.2. Réaction de la PCR**

La PCR est réalisée dans un thermocycleur en suivant les conditions suivantes :

- Une première étape de dénaturation initiale à +94°C pendant 5 minutes ;
- 30 cycles de dénaturation à +94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à +52°C pendant 1 minute et d'extension à +72°C pendant 5 minutes ;
- Une étape finale d'extension à +72°C pendant 20 minutes.

#### **4.2.3. Électrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits de la PCR sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans un tampon Tris 40mM, Acide acétique 20mM et EDTA 1mM (TAE) à pH 8. Les bandes obtenues sont visualisées par coloration au ROTI®GelStain Red et observées sous lumière UV.

#### **4.2.4. Analyse de la similarité génétique**

La détermination de la similarité génétique entre les souches est basée sur l'indice de Dice-Cophen qui mesure la distance génétique entre deux bactéries en comparant leurs profils de bandes d'ADN. La matrice de similarité est générée en utilisant la formule suivante :  $\text{Dice-Cophen} = 2a / (2a + b + c)$

a : nombre de bandes communes entre deux souches ;

b : nombre de bandes présentes dans la première souche et absentes dans la deuxième ;

c : nombre de bandes présentes dans la deuxième souche et absentes dans la première.

L'analyse de la similarité est effectuée en utilisant l'algorithme UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) qui permet de construire un dendrogramme à partir de la matrice de similarité. Les souches bactériennes les plus similaires sont regroupées dans des clusters.

Les distances sont exprimées en pourcentage de similarité. Plus les valeurs sont faibles, plus les souches bactériennes sont proches les unes des autres en termes de similarité moléculaire.

#### **4.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques et des antibiotiques vis-à-vis des souches de *C. albicans* et de *P. aeruginosa* co-isolées d'un même mucus bronchique**

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des antifongiques et des antibiotiques vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et de *Pseudomonas aeruginosa* co-isolées d'un même mucus bronchique sont déterminées par la technique de microdilution sur microplaque 96 puits selon les protocoles standards de *Clinical and Laboratory Standards Institute* publiés en 2008 pour les levures (**CLSI-M27-A3, 2008**) et en 2016 pour les bactéries (**CLSI-M100S, 2016**).



Les deux protocoles recommandent le milieu *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) tamponné à pH 7 par le morpholine-propane-sulfonic acid (MOPS) (Sigma).

Les concentrations cellulaires de départ sont fixées à  $3 \times 10^3$  cellules/mL pour les levures et à  $10^6$  cellules/mL pour les bactéries.

Nous avons testé deux antifongiques systémiques, l'amphotéricine B (AmB) et le voriconazole (Vor) et six antibiotiques, l'imipénème (IPM), le ceftazidime (CAZ), l'amikacine (AK), la gentamicine (GEN), la ciprofloxacine (CIP) et la colistine (COL). Les solutions mères des antifongiques et des antibiotiques sont préparées en extemporané à une concentration de 1,6mg/mL par dissolution de l'amphotéricine B dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), du voriconazole dans de l'eau distillée stérile et des antibiotiques dans du tampon phosphate stérile (pH 7,4 ; 10mM) ou de l'eau distillée stérile.

Dans les puits de la microplaque, nous introduisons 100µL de la suspension levurienne ou bactérienne auxquels nous ajoutons 100µL de l'agent antimicrobien à tester à des concentrations finales comprises entre 0,03 et 16µg/mL pour les antifongiques et entre 0,125µg/mL et 256µg/mL pour les antibiotiques.

Après homogénéisation, les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures pour les levures et 37°C pour les bactéries pendant 18 à 24 heures.

Les CMI sont déterminées à l'œil nu pour l'amphotéricine B et les antibiotiques. Pour le voriconazole les CMI<sub>50</sub> sont déterminées par dénombrement des cellules viables sur cellule de Thoma. La CMI correspond à la plus faible concentration d'antimicrobien ou aucune croissance n'est visible dans les puits à l'œil nu.

*Candida albicans* ATCC 10231 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont utilisés comme contrôles de qualité interne.

## 5. Evaluation du potentiel des souches co-isolées d'un même mucus bronchique à former des biofilms mono et multi-espèces *in vitro*

### 5.1. Formation *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces (*C. albicans*/*P. aeruginosa*)

La formation des biofilms mono-espèces *in vitro* par *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* est effectuée dans des microplaques en polystyrène à fond rond selon les protocoles de **Pierce et coll., (2008)** et **Christensen et coll., (1985)** respectivement.

Des cultures jeunes de 24 heures sur milieu Sabouraud pour *C. albicans* et sur milieu BHIB pour *P. aeruginosa* sont centrifugées à +4°C pendant 5 minutes à 3000g et pendant 15 minutes à 1000g respectivement. Après deux lavages avec du tampon phosphate salé (PBS) à pH 7,4 ; 10mM, les surnageants sont éliminés et les culots resuspendus dans le milieu RPMI 1640 tamponné à pH7 avec du MOPS à 0,165mol/L à raison de 10<sup>6</sup>cellules/mL pour les deux microorganismes.

100µL de chaque suspension cellulaire sont répartis dans les puits de deux microplaques qui sont ensuite scellées et placées dans une étuve à 35°C pour les levures et 37°C pour les bactéries pendant 48h.

Pour ce qui est de la formation des biofilms multi-espèces *C.albicans/P. aeruginosa*, nous avons suivi le protocole **d'Ibarra-Trujillo et coll., (2012)**. Chaque puits d'une microplaque à fond rond est inoculé avec 75µL de la suspension bactérienne et 75µL de la suspension levurienne. Les microplaques sont scellées puis incubées à 37°C pendant 48 heures. A la fin du temps d'incubation, le milieu est retiré et les cellules non fixées sont éliminées par 3 lavages avec du PBS, puis les biomasses des biofilms formés sont quantifiées.

### 5.2. Quantification de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces

Les biomasses des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans* et *P. aeruginosa* co-isolés d'un même mucus bronchique sont déterminées par la technique de **Christensen et coll., (1985)** basée sur la coloration au Crystal violet.

Les puits d'une microplaque contenant des biofilms de 48 heures sont lavés avec du PBS stérile en vue d'éliminer les cellules non adhérentes à la surface des puits. La microplaque est séchée en position inversée pendant 15 minutes à température

ambiante puis 100µL de méthanol à 99% sont ajoutés aux différents puits pour fixer les biofilms formés. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, 100µL de la solution de Crystal Violet sont additionnés et la microplaque est réincubée pendant 20 minutes à température ambiante. L'excès du Crystal violet est éliminé et 150µL d'acide acétique (33%) sont ajoutés dans tous les puits pour solubiliser le colorant lié aux cellules adhérentes **(Stepanović et coll., 2000)**

La biomasse des biofilms formés est mesurée par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 570nm dans un lecteur de microplaques **(Biochrom Asys UVM340)**.

Selon les valeurs des densités optiques, les souches sont classées en non formatrices de biofilms ( $DO \leq DOc$ ), faiblement formatrices de biofilms ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ), modérément formatrices de biofilms ( $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ) et fortement formatrices de biofilms ( $DO > 4 \times DOc$ ) **(Kodori et coll., 2021)**.

(DOc = DO de contrôle négatif)

#### **6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques et des antibiotiques vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* et de *P. aeruginosa* co-isolées d'un même mucus bronchique**

Les CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* et les CMI de la ceftazidime, l'imipénem, l'amikacine, la gentamicine, la ciproflaxacine et la colistine vis-à-vis des cellules sessiles de *P. aeruginosa* sont déterminées selon le protocole de **Pierce et Coll., (2008)**.

Cette méthode est basée sur la réduction du XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-caboxanilide) en formazan par les cellules viables au sein d'un biofilm.

Pour nos expériences, nous avons utilisé un autre indicateur de viabilité des cellules, le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium), un composé de couleur jaune qui est réduit en formazan de couleur pourpre par des cellules viables au métabolisme actif **(Riss et coll., 2004)**.

Les biofilms mono et multi-espèces de *C. albicans* et de *P. aeruginosa* sont formés dans les puits d'une microplaque en polystyrène à fond rond selon les mêmes protocoles décrits précédemment.

Après une incubation de 48 heures à 37°C, les surnageants sont écartés et les biofilms mono et multi-espèces matures formés sont lavés deux fois avec du PBS stérile pH7,4 ; 10mM. 100µL de solution d'antimicrobiens sont ajoutés à des concentrations croissantes finales allant de 0,125 à 64µg/mL pour les antifongiques et de 1 à 512µg/mL pour les antibiotiques.

Après incubation de 24 heures à 37°C, les microplaques sont lavées avec du PBS stérile pH7,4 ; 10mM et 20µL de MTT sont ajoutés dans tous les puits ensuite réincubées à 37°C pendant 2 à 3 heures. 100µL d'isopropanol acidifié sont additionnés dans les puits des microplaques qui sont réincubées pendant 10 minutes à température ambiante. 75µL du contenu de chaque puits sont transférés dans de nouvelles microplaques et les absorbances sont lues dans un lecteur de microplaques **Biochrom Asys UVM340** à une longueur d'onde de 570nm.

Les SCMI sont évaluées à 80% d'inhibition selon la formule suivante :

$$\text{SCMI} = [1 - (\text{DO}_{570\text{nm}} \text{ des biofilms} / \text{DO}_{570\text{nm}} \text{ du contrôle positif})] \times 100$$

### **7. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms mono et multi-espèces formés par *C. albicans* et *P. aeruginosa* co-isolés d'un même mucus bronchique**

Afin d'évaluer l'activité métabolique des biofilms formés par les souches de *C. albicans* et de *P. aeruginosa* co-isolées d'un même mucus bronchique, nous avons appliqué le protocole de **Villar-Vidal et coll., (2011)**. Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la réduction du MTT, dont la concentration est évaluée par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 570nm dans le milieu extracellulaire permettant ainsi de quantifier les cellules viables au sein des biofilms.

Selon la valeur des densités optiques, les microorganismes sont classés en six catégories distinctes :

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

## 8. Inhibition des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans* et *P. aeruginosa* co-isolés d'un même mucus bronchique

### 8.1. Inhibition par des combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques

Nous avons utilisé le protocole de **Tobudic et coll., (2009)** appelé aussi technique du carré-échiquier-damier pour tester les activités de plusieurs molécules thérapeutiques seules et combinées vis-à-vis des biofilms mixtes formés *in vitro* par les souches de *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans les puits d'une microplaque contenant des biofilms mixtes (*Candida albicans/Pseudomonas aeruginosa*), 50µL d'un antibiotique sont déposés le long de l'axe des abscisses et 50µL d'un antifongique le long de l'axe des ordonnées. Les SCMI sont déterminées selon le protocole décrit précédemment (**Pierce et coll., 2008**).

L'interaction de la combinaison antifongique/antibiotique est classée en fonction de l'Indice de Concentration Fractionnaire Inhibitrice (FICI), calculé selon la formule suivante :  $FICI = \frac{Ac}{Aa} + \frac{Bc}{Ba}$ , où

- Ac : CMI de l'antibiotique combiné ;
- Aa : CMI de l'antibiotique seul ;
- Bc : CMI de l'antifongique combiné ;
- Ba : CMI de l'antifongique seul.

Selon la valeur du FICI, les interactions sont regroupées en synergiques (FICI ≤ 0,5), indifférentes (0,5 > FICI ≤ 4) et antagonistes (FICI > 4) (**Katragkou et coll., 2015**).

## **8.2. Inhibition des biofilms mono et multi-espèces par des solutions salines hypertoniques**

La mesure de l'effet de la solution saline hypertonique sur la biomasse des biofilms formés *in vitro* est réalisée en suivant la méthode de **Michon et coll., (2014)**.

A partir de cultures jeunes, des suspensions levuriennes et bactériennes sont préparées à des concentrations respectives de  $10^6$ cellules/mL et  $5 \times 10^5$ cellules/mL dans le milieu RPMI 1640 tamponné avec du MOPS à pH 7,4 additionné de 0%, 1%, 3%, 5%, 7%, 8% et 10%, de NaCl.

100µL de chaque suspension (levures et bactéries) sont introduits dans les puits d'une microplaque. Cette dernière est scellée puis placée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

Les biomasses des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans* et *P. aeruginosa* co-isolés d'un même mucus bronchique sont évaluées par la méthode de **Christensen et coll., (1985)** décrite précédemment.

---

# **Troisième Partie**

## **Résultats et discussion**

---

La mucoviscidose est une maladie héréditaire autosomique récessive diagnostiquée dans le monde entier. Bien que l'espérance de vie des personnes atteintes de cette maladie ait augmenté considérablement, elle demeure une cause de mortalité chez les nourrissons et les jeunes enfants dans de nombreuses régions, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire **(Da Silva Filho et coll., 2021)**.

Les infections pulmonaires causées par des bactéries Gram négatives et la levure *C. albicans* sont fréquentes chez les patients atteints de mucoviscidose, souvent sous forme d'infections mixtes. Les bactéries Gram négatives, comme *P. aeruginosa*, sont associées à une inflammation chronique des voies respiratoires et à une détérioration de la fonction pulmonaire, tandis que *Candida albicans* peut former des biofilms dans les voies respiratoires, aggravant ainsi les symptômes **(Fourie et coll., 2016)**.

La coexistence de ces micro-organismes dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose représente un défi pour le diagnostic et le traitement des infections pulmonaires chez ces patients.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris ce travail au service de pneumologie et d'allergologie de l'Hôpital pédiatrique d'Oran et qui a porté, d'une part, sur la description de la population d'enfants atteints de mucoviscidose dans l'ouest Algérien. D'autre part, sur la recherche des altérations mixtes (*Candida albicans*/bactéries Gram négatives) dans leurs mucus bronchiques afin d'améliorer leur prise en charge.



**A. Etude de la population mucoviscidosique de l'ouest Algérien**

Cette étude descriptive a porté sur des enfants de l'ouest Algérien atteints de mucoviscidose et suivis au service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé en pédiatrie (EHS) Pr. BOUKHROUFA Abdelkader d'Oran.

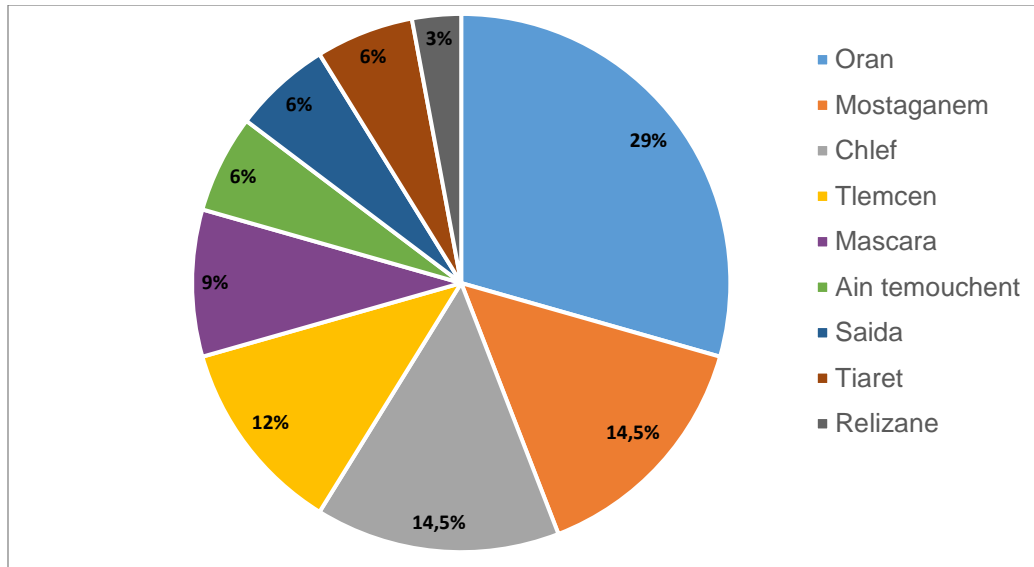
Trente-quatre (34) patients âgés entre 3 mois et 12 ans, diagnostiqués de mucoviscidose par deux tests de la sueur positifs sont inclus dans cette étude.

Les questionnaires sont renseignés à partir des dossiers des patients qui contiennent des informations longitudinales sur chaque patient à savoir, le bilan de santé annuel pour l'état vital de chaque patient, la prise en charge thérapeutique, les consultations, les hospitalisations et les données sociodémographiques.

Afin d'évaluer l'effet de la mucoviscidose sur l'état général des patients, 34 enfants en bonne santé dont 17 garçons et 17 filles, âgés de 2 mois à 12 ans sont sélectionnés au hasard et pour lesquels nous avons mesuré le poids, la taille et l'indice de masse corporelle (IMC).

L'analyse des questionnaires renseignés pour chaque patient a montré que sur les 34 enfants atteints de mucoviscidose inclus dans ce travail, 16 (47%) sont de sexe masculin et 18 (53%) de sexe féminin. Le sex-ratio est estimée à 0,9 ce qui indique que cette maladie affecte aussi bien les garçons que les filles (**Lascano-Vaca et coll., 2020**). L'âge moyen est de  $4,47 \pm 3,28$  ans, avec un intervalle allant de 3 mois à 12 ans.

La répartition des patients selon leur ville d'origine est représentée sur la **figure N°6**. Nous constatons que la ville d'Oran occupe la première place avec dix enfants atteints de la mucoviscidose suivie de la ville de Mostaganem et de Chlef avec cinq patients. Les villes de Tlemcen et de Mascara occupent la troisième et la quatrième place avec quatre et trois patients respectivement. Les villes de Ain Temouchent, Saida et Tiaret arrivent en cinquième place avec deux patients et en fin la ville de Relizane avec un seul patient.



**Figure N°6 : Répartition des enfants atteints de mucoviscidose selon la ville d'origine**

Les caractéristiques de la population étudiée sont regroupées dans le **tableau N°1**. Nous remarquons que la consanguinité dans les familles concerne 19 couples soit un taux de 55,8%. Ce dernier est comparable à celui retrouvé dans la région centre de l'Algérie (50%) (**Boukari et coll., 2006**) et en Tunisie (59%) (**Boussetta et coll., 2018**). Par contre, il reste inférieur à celui rapporté au Soudan (71%) par **Ibrahim et coll., (2014)**. Ces taux élevés de consanguinité sont liés aux habitudes socio-culturelles dans ces pays. 58,8% des patients présentent des antécédents familiaux liés à la mucoviscidose parmi lesquels quatre familles ont deux enfants atteints de mucoviscidose confirmée, sept patients ont au moins un ou deux frères ou sœurs décédés au cours des 6 premiers mois de leur vie, en raison de complications digestives, nutritionnelles et/ou respiratoires.

Tableau N°1 : Caractéristiques longitudinales des enfants mucoviscidoseux de l'ouest Algérien suivis à l'EHS d'Oran

Caractéristiques des patients inclus dans cette étude	n = 34
<b>Taille</b>	96,95 ± 25,54 cm
<b>Poids</b>	14,19 ± 6,5 kg
<b>IMC</b>	14,24 ± 2,07 kg/m <sup>2</sup>
<b>Indice de Waterlow</b>	84,62 ± 19,1%
<b>Insuffisance pondérale</b>	19 (55,8%)
<b>Degré de malnutrition</b>	
Pas de malnutrition	21 (61,8%)
Malnutrition modérée	6 (17,6%)
Malnutrition sévère	7 (20,6%)
<b>Retard de croissance</b>	10 (29,4%)
<b>Consanguinité des parents</b>	
Pas de consanguinité	15 (44,1%)
Cousin germain (1 <sup>er</sup> degré)	11 (32,4%)
Cousin éloigné	8 (23,5%)
<b>Antécédents familiaux</b>	
Non	20 (58,8%)
Oui	14 (41,2%)
<b>Niveau intellectuel des parents</b>	
Primaire	3 (8,8%)
Moyen	14 (41,2%)
Secondaire	11 (32,4%)
Université	6 (17,6%)
<b>Le niveau socio-économique des parents</b>	
Inférieur (inférieur au salaire minimum)	2 (5,9%)
Moyen inférieur (salaire minimum)	23 (67,6%)
Moyen (2 x le salaire minimum)	6 (17,6%)
Moyen-Haut (3 x le salaire minimum)	3 (8,8%)
<b>Sécurité sociale</b>	
Oui	16 (47,1%)
Non	18 (52,9%)

IMC : Indice de Masse Corporelle.

Indice de Waterlow : rapport entre le poids de l'enfant et le poids attendu pour sa taille, exprimé en pourcentage.

Classification de la malnutrition selon Gomez (1956), basée sur le pourcentage du poids attendu pour l'âge.

Variables qualitatives : Nombre (pourcentage).

Variables continues : Moyenne ± écart-type.

Une différence significative de l'indice de masse corporelle (IMC) entre les enfants atteints de mucoviscidose et les enfants sains est observée ( $p=0,039$ ). En effet, l'âge moyen des enfants atteints de mucoviscidose est de  $4,47 \pm 3,28$  ans avec un IMC moyen de  $14,24 \pm 2,07$  kg/m<sup>2</sup>, un poids moyen de  $14,19 \pm 6,5$  kg et une taille moyenne de  $96,95 \pm 25,54$  cm. En revanche, la population témoin dont l'âge moyen est de  $5,5 \pm 4,2$  ans, présentent un IMC moyen de  $16,9 \pm 1,5$  kg/m<sup>2</sup>, un poids moyen de  $18,9 \pm 8,8$  kg et une taille moyenne de  $103 \pm 26$  cm.

De plus, 38,2% des enfants atteints de mucoviscidose souffrent de malnutrition et 29,4% présentent un retard de croissance. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Boutrid et coll., (2021)**.

L'âge moyen du diagnostic pour les enfants inclus dans notre travail est de  $1,2 \pm 1,5$  ans. Il est à noter qu'en 2006, l'âge moyen de diagnostic en Algérie était de  $2,5 \pm 2,6$  ans (**Boukari et coll., 2006**). En Tunisie, l'âge moyen de diagnostic de cette maladie est de  $8,5 \pm 14,4$  mois (**Boussetta et coll., 2018**).

Un retard considérable dans le diagnostic de la mucoviscidose en Algérie est constaté par rapport aux pays développés ou un dépistage prénatal ou néonatal est réalisé (**Brouard et coll., 2001**). Ce retard de diagnostic peut s'expliquer par la non disponibilité du test de la sueur, principal outil de diagnostic dans notre pays, qui n'existe que dans les villes d'Oran et de Sidi Bel Abbés au niveau de la région ouest.

Les caractéristiques cliniques des patients et les comorbidités sont regroupées dans le **tableau N°2**.

Il ressort de ces données que les principales manifestations cliniques observées chez la population étudiée sont les affections respiratoires, avec une congestion bronchique et une toux chronique. Dans la population étudiée, 35% des enfants présentent un hippocratisme c'est-à-dire une déformation des doigts et des ongles de la main. Cette déformation évolue avec l'âge des enfants atteints de mucoviscidose. Le taux de l'hippocratisme digital, passe de 18,2% chez les moins de deux ans à 50% chez les plus de six ans. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Boukari et coll., (2006)** et de **Boussetta et coll., (2018)**.

**Tableau N°2 : Caractéristiques cliniques des enfants mucoviscidosiques de l'ouest Algérien**

	<b>&lt; 2 ans n = 11</b>	<b>2 - 6 ans n = 9</b>	<b>6 - 12 ans n = 14</b>
<b>Maladies respiratoires</b>			
Toux chronique	11 (100%)	9 (100%)	14 (100%)
Congestion bronchique	11 (100%)	8 (88,9%)	14 (100%)
Hippocratisme digital	2 (18,2%)	3 (33,3%)	7 (50%)
<b>Maladies digestives</b>			
Douleurs abdominales	0	2 (22,2%)	5 (35,7%)
Diarrhée chronique	7 (63,6%)	5 (55,6%)	10 (71,4%)
Insuffisance exocrine	11 (100%)	9 (100%)	14 (100%)
Carence en vitamines liposolubles	11 (100%)	9 (100%)	14 (100%)
<b>Comorbidités</b>			
Obstruction intestinale distale	0	1 (11,1%)	0
Prolapsus rectal	0	0	1 (7,1%)
Dénutrition	5 (45,4%)	1 (11,1%)	7 (50%)
Anorexie	4 (36,4%)	2 (22,2%)	6 (42,9%)
Déformation thoracique	3 (27,3%)	3 (33,3%)	6 (42,9%)
Bronchopneumonie sévère	4 (36,4%)	3 (33,3%)	3 (21,4%)
Asthme	1 (9,1%)	1 (11,1%)	2 (14,3%)

Par ailleurs, tous les patients présentent des troubles digestifs, une insuffisance exocrine, une carence en vitamines liposolubles et 64,7% d'entre eux ont une diarrhée chronique. Pour pallier à ces troubles digestifs, les enfants sont placés sous extraits pancréatiques **(Boutrid et coll., 2021)**.

Pour les comorbidités, nous constatons que deux patients l'un âgé de 4 ans, l'autre de 10 ans souffrent d'obstruction intestinale distale et de prolapsus rectal respectivement. 38,2% des patients souffrent de dénutrition, 35,3% d'anorexie, 29,4% de bronchopneumonie sévère et 4 patients (11,8%) d'asthme. Une augmentation des cas de déformation thoracique est également observée chez ces patients, qui passe de 27,3% chez les moins de deux ans à 42,9% chez les plus de six ans.

Le nombre de décès observé lors de ce travail est de 3 enfants soit un taux de 8,8% avec un âge moyen de  $9 \pm 2,6$  ans. Les causes du décès sont dominées par les exacerbations pulmonaires et une insuffisance respiratoire.

En ce qui concerne le niveau socio-économique, 74% des familles appartiennent aux classes inférieure et moyenne inférieure, avec un revenu mensuel ne dépassant pas 40.000 DA/mois soit deux fois le Salaire National Minimum Garanti (SNMG) établi par le gouvernement Algérien depuis avril 2021. En outre, seulement 50% des parents ont un niveau scolaire secondaire ou universitaire et près de 53% n'ont pas de couverture sociale et la mucoviscidose n'est pas classée avec les maladies chroniques en Algérie.

Selon **Crowley et coll., (2020)**, le faible niveau socio-économique est associé à une détérioration significative de la fonction pulmonaire et de l'état nutritionnel ce qui peut expliquer les résultats de santé des 34 enfants atteints de mucoviscidose inclus dans cette étude.

Bien que le traitement de la mucoviscidose soit basé, dans les pays développés, sur l'administration de modulateurs de la CFTR, la prise en charge de cette maladie, repose dans les pays en développement, sur un traitement de base comprenant des enzymes pancréatiques, des compléments nutritionnels, des agents mucolytiques (solution saline hypertonique) et des antibiotiques par voie orale, par inhalation ou par injection intraveineuse selon les besoins **(Castellani et coll., 2018)**.

Les enfants atteints de mucoviscidose et suivis au centre de l'EHS spécialisé en pédiatrie d'Oran reçoivent une antibiothérapie curative pour contrôler l'exacerbation broncho-pulmonaire. En effet, 24 patients (70,6%) hospitalisés pour une infection pulmonaire, ont été traités par la ceftazidime et l'amikacine en intraveineuse. 19 (55,8%) ont reçu une aérosolthérapie qui correspond à une inhalation à long terme de colimycine. Par ailleurs, deux patients (5,8%) sont placés sous oxygénothérapie en raison d'une insuffisance respiratoire et une supplémentation orale en NaCl est prescrite à sept patients. Des sirops polyvitaminés et des extraits pancréatiques sont administrés à tous les patients. Il est important de signaler qu'aucune transplantation pulmonaire n'est réalisée.

Des physiothérapeutes réalisent des séances de physiothérapie respiratoire pour tous les patients avec une formation des parents afin qu'ils puissent reproduire les mêmes mouvements à domicile.

Ce traitement de base, estimé à environ 4500 DA/mois, soit le quart du salaire minimum, reste onéreux principalement pour les familles qui ne bénéficient pas de couverture sociale.

Cette partie de notre travail a fait l'objet d'une publication internationale dans une revue de la catégorie A IF : 3.1 (**Bendoukha et coll., 2023, DOI : 10.1002/ppul.26939**)

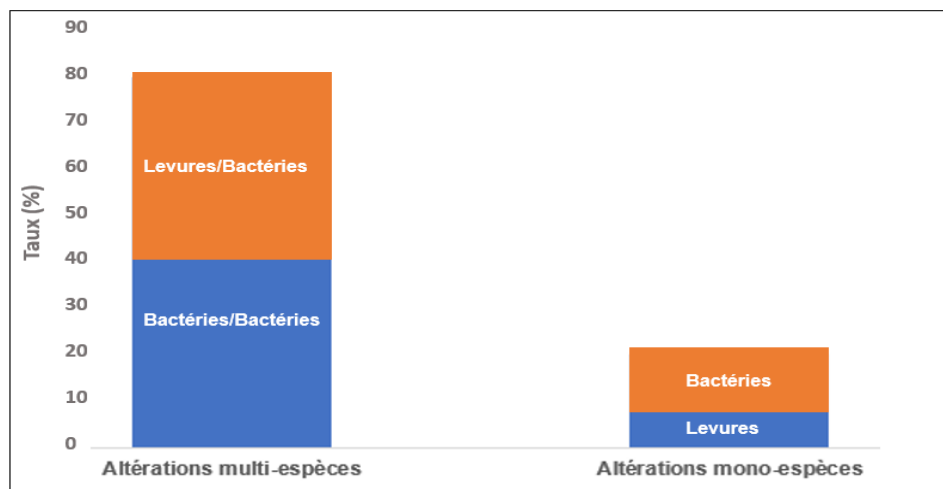
## B. Etude microbiologique

### 1. Détermination des altérations mixtes levures/bactéries dans les mucus bronchiques

Entre avril 2019 et mars 2020, 67 mucus bronchiques sont récupérés chez 34 enfants atteints de mucoviscidose, suivis au service de pneumologie et d'allergologie de l'hôpital pédiatrique d'Oran, parmi lesquelles 64 ont donné une culture positive soit un taux d'altération globale de 96%. Ce taux est comparable à celui retrouvé en Australie par **Frayman et coll., (2017)** soit 98%.

Les altérations multi-espèces sont majoritaires avec un taux de 80%. Ce taux est nettement supérieur à celui rapporté en Suède par **Haiko et coll., (2019)** qui n'était que de 32,6%. Quant aux altérations mono-espèces, elles ne représentent que 20%.

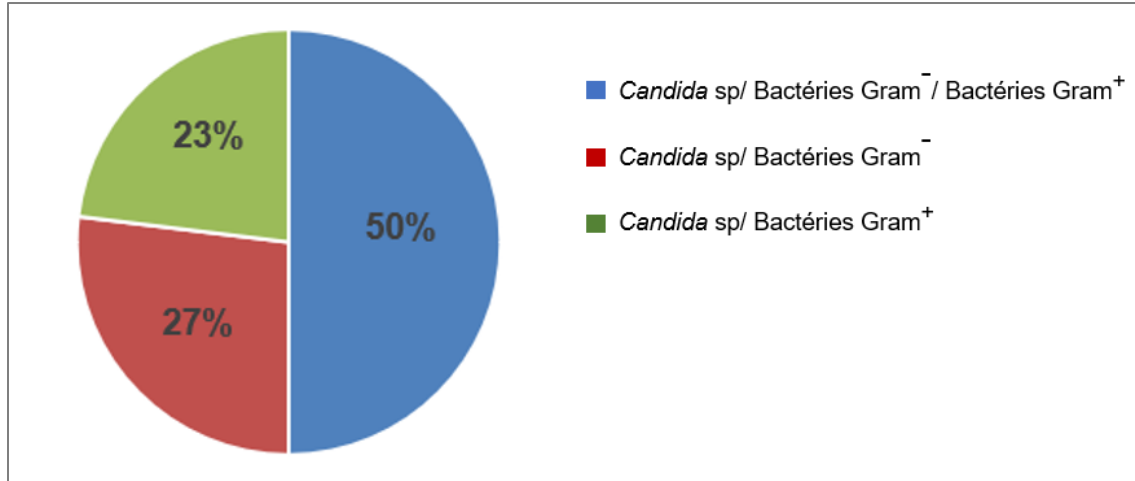
La détermination des genres des microorganismes responsables de ces altérations a montré que 51% des altérations mixtes sont causées par des levures et des bactéries en même temps, tandis que 49% sont provoquées par différentes espèces bactériennes. En revanche, pour les altérations mono-espèces, 69,2% sont d'origine bactérienne et 30,8% d'origine fongique (**figure N°7**).



**Figure N°7 : Taux des altérations mono et multi-espèces**

Les résultats de l'analyse microbiologique des altérations polymicrobiennes levures/bactéries sont représentés sur la **figure N°8**.

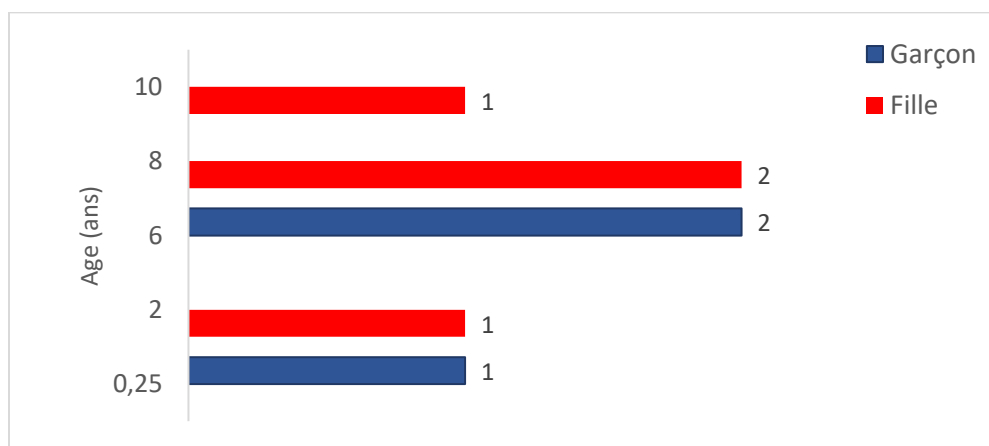




**Figure N°8 : Répartition des altérations multi-espèces levures/bactéries**

Au total, 26 associations sont isolées des mucus bronchiques des enfants atteints de mucoviscidose de l'ouest algérien. Nous constatons que les altérations levures/bactéries Gram négatives/bactéries Gram positives sont prédominantes avec un taux de 50% (N=13), suivies des altérations levures/bactéries Gram négatives, qui font l'objet de ce travail avec un taux de 27% (N=7). Enfin les associations levures/bactéries Gram positives sont retrouvées avec un taux de 23% (N=6) (**Gourari-Bouzouina et coll., 2024**).

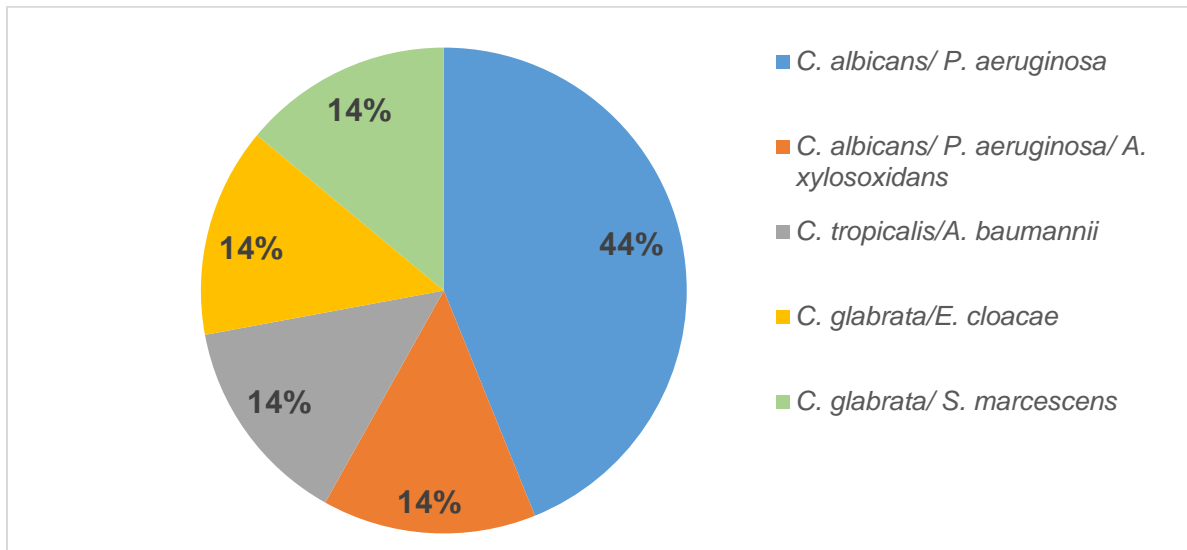
Les 7 altérations mixtes levures/bactéries Gram négatives sont retrouvées chez 4 filles âgées de 2, 8 et 10 ans et 3 garçons âgés de 3 mois et 6 ans (**figure N°9**)



**Figure N°9 : Répartition des altérations levures/bactéries à Gram négatif selon le sexe et l'âge des enfants mucoviscidosiques**

## 2. Identification des levures et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique

Les résultats de l'identification des levures et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique sont représentés sur la **figure N°10**.



**Figure N°10 : Identification des levures et des bactéries à Gram négatif co-isolées d'un même mucus bronchique**

Sept levures appartenant toutes au genre *Candida* dont quatre *Candida albicans*, deux *Candida glabrata* et une *Candida tropicalis*, sont isolées. Nous constatons que l'espèce *Candida albicans* occupe la première place avec un taux de 57% suivie des espèces *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* avec des taux respectifs de 28,5 et 14,5%.

*Candida albicans* est l'espèce dominante dans nos isolats cliniques, ceci est en accord avec les travaux de **Schwarz et coll., (2018a)** qui ont montré que cette espèce est souvent isolée des expectorations de patients atteints de mucoviscidose avec des prévalences allant de 33,8 % à 77,9 %.

Ces levures cohabitent dans sept mucus bronchiques avec huit bactéries à Gram négatif. L'identification de ces dernières par galeries API 20E et 20NE et par Vitek2 a montré que *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus retrouvée dans nos isolats cliniques avec

un taux de 50%, suivie des espèces *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae* représentant 12,5% chacune.

La dominance de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose a déjà été rapportée par **Haiko et coll., (2019)**. En effet, la présence de *P. aeruginosa* dans les voies respiratoires de ces patients est utilisée comme indicateur positif de la gravité de la maladie (**Nixon et coll., 2001**). Ce type d'infection accélère la détérioration de la fonction pulmonaire et augmente le coût du traitement [(**Döring et coll., 2000**) ; (**Emerson et coll., 2002**)].

L'espèce *Achromobacter xylosoxidans* est retrouvée avec un taux de 14%. Cette bactérie cohabite avec *P. aeruginosa* dans un même mucus bronchique. Ce taux est comparable à celui rapporté par **Lambiase et coll., (2011)** qui ont montré qu'environ 17,6% des patients atteints de mucoviscidose présentent au moins une culture positive à *Achromobacter xylosoxidans*, dont 11,3% étaient co-colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*.

Au total sept associations levures/bactéries à Gram négatif sont isolées ou l'espèce *Candida albicans* cohabite avec *Pseudomonas aeruginosa* dans 3 mucus bronchiques soit un taux de 44% et avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Achromobacter xylosoxidans* dans 1 mucus (14%). Pour les 3 autres associations, elles sont retrouvées avec un taux de 14% chacune et dans lesquelles une levure du genre *Candida* cohabite avec une bactérie à Gram négatif, il s'agit de *Candida tropicalis*/*Acinetobacter baumannii*, *Candida glabrata*/*Serratia marcescens* et *Candida glabrata*/*Enterobacter cloacae*.

Les altérations mixtes impliquant *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* sont majoritaires dans nos isolats cliniques (4 sur 7). Ces deux espèces, souvent isolées chez les patients atteints de mucoviscidose sont considérées comme colonisateur de leurs voies respiratoires inférieures pour *C. albicans* (**Ziesing et coll., 2016**) et comme indicateur positif de la gravité de la maladie pour *P. aeruginosa* (**Nixon et coll., 2001**). C'est pourquoi, seules les associations dans lesquelles *C. albicans* cohabite avec *P. aeruginosa* sont retenues pour la suite de notre travail en l'occurrence, *C. albicans*<sup>11</sup>/*P. aeruginosa*<sup>12</sup>/*A. xylosoxidans*<sup>1</sup>, *C. albicans*<sup>12</sup>/*P. aeruginosa*<sup>13</sup>, *C. albicans*<sup>13</sup>/*P. aeruginosa*<sup>15</sup> et *C. albicans*<sup>14</sup>/*P. aeruginosa*<sup>17</sup>.

### 3. Antibiogramme des souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique

Le **tableau N°3** regroupe les résultats de l'antibiogramme des bactéries à Gram négatif co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique.

Nous constatons que toutes les souches de *P. aeruginosa* sont résistantes à la ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, la pipéracilline, la céfépime et l'aztréonam. Cependant, 100% des souches sont sensibles aux aminosides et la ciprofloxacine, 75% à la ceftazidime et 50% à l'imipénème et au méropénème. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par **Gailiene et coll., (2007)**, où les pourcentages de sensibilité de *P. aeruginosa* étaient de 78,9% pour la ceftazidime, 73,6% pour l'imipénème, 70,9% pour méropénème, 54,1% pour la gentamicine et 52,5% pour la ciprofloxacine.

En revanche, *A. xylosoxidans* est résistante à la ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, la pipéracilline, l'aztréonam, la céfépime, la gentamicine et la ciprofloxacine alors qu'elle est sensible à l'association pipéracilline + tazobactam, la ceftazidime, l'imipénème et au méropénème. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de **Lambiase et coll., (2011)** qui ont montré que cette espèce isolée chez des enfants atteints de mucoviscidose suivis au centre régional de la mucoviscidose de Naples (Italie) était résistante à tous ces antibiotiques.

La recherche de carbapénémases chez les souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* co-isolées avec *C. albicans* a mis en évidence l'existence de deux phénotypes :

- Le phénotype bêta-lactamase de classe A pour les souches Pa12, Pa15, Pa17 et Ax1
- Le phénotype bêta-lactamase de classe B (métallo-bêta-lactamases), pour les souches Pa12 et Pa13. Ces deux souches sont résistantes aux carbapénèmes.

Selon une méta-analyse de 110 études réalisées dans 25 pays, il a été constaté que la résistance aux carbapénèmes des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients mucoviscidosiques était présente avec une prévalence de 43% (**Saadh et coll., 2022**).

De plus, le phénotype mucoïde est retrouvé chez la souche multirésistante de *P. aeruginosa* (Pa13).

Tableau N°3 : Antibiogramme de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique des enfants atteints de mucoviscidose

Souches	Code	TIC	TCC	PIP	PTZ	CAZ	FEP	IPM	MEM	ATM	CIP	TOB	AK	GEN
<i>P. aeruginosa</i> 12	Pa12	R	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> 13	Pa13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> 15	Pa15	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> 17	Pa17	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
<i>A.Xylosoxidans</i> 1	Ax1	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	I	I	R

R : résistant, S : sensible, I : intermédiaire

TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline + acide clavulanique, PIP : piperacilline, PTZ : piperacilline + tazobactam, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, IPM : imipénème, MEM : méropènème, ATM : aztréonam, CIP : ciprofloxacine, TOB : tobramycine, AK : amikacine, GEN : gentamicine.

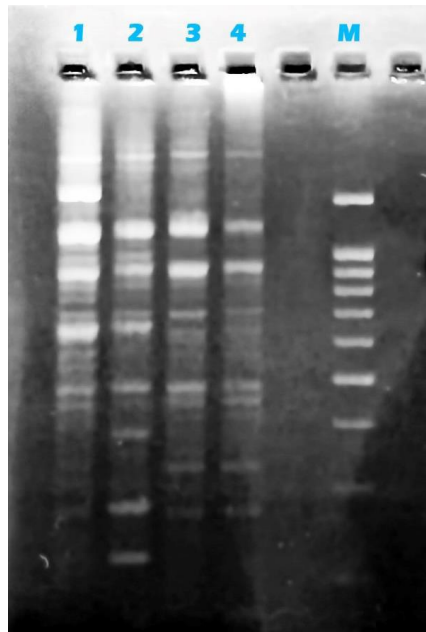
### 3.1. Profilage moléculaire des souches de *Pseudomonas aeruginosa* par ERIC-PCR

Le typage moléculaire des souches de *P. aeruginosa* co-isolées avec *C. albicans* dans les mucus bronchiques est effectué par la technique d'*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR).

L'ERIC-PCR est un outil de typage de l'ADN approprié, peu coûteux, rapide, reproductible et discriminant pour une surveillance épidémiologique efficace et pour la détermination de la diversité génétique des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées du mucus bronchique de patients atteints de mucoviscidose (Syrmis et coll., 2004).

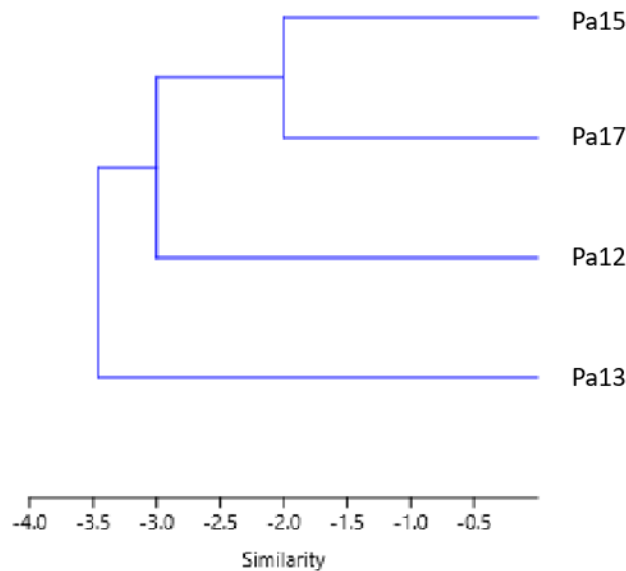
Les profils électrophorétiques des quatre souches de *P. aeruginosa* sur gel d'agarose sont représentés sur la **photo N°1**.

Le puits M correspond à un marqueur de taille de 100pb et les puits numérotés de 1 à 4 aux produits de ERIC-PCR des souches de *P. aeruginosa* étudiées.



**Photo N°1 : Profils électrophorétiques des produits de l'ERIC-PCR sur gel d'agarose 1,5%**

Les résultats obtenus révèlent la présence de trois groupes distincts, un premier groupe comprenant deux souches et deux autres groupes ne comprenant qu'une seule souche. L'analyse du dendrogramme représenté sur la **figure N°11** met en évidence une grande similarité entre les souches Pa15 et Pa17 comparées aux autres souches étudiées.



**Figure N°11 : Dendrogramme des produits de l'ERIC-PCR des souches de *P. aeruginosa* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique**

Les souches Pa15 et Pa17 qui présentent le taux le plus élevé de similarité sont isolées des mucus bronchiques d'une fille de Chlef âgée de 8 ans et d'un garçon de Tlemcen âgé de 6 ans.

Il est important de noter que les mucus bronchiques, récupérés directement du site de l'infection par massage sans utilisation de dispositifs médicaux correspondent à la flore microbienne présente dans les poumons des patients sans aucune contamination (**Grant et coll., 2012**). Par conséquent, la similarité génétique observée entre les souches Pa15 et Pa17 est probablement liée au fait que ces enfants ont séjournés plusieurs fois pendant les mêmes périodes au service de pneumologie et d'allergologie de l'hôpital pédiatrique d'Oran.

Selon **Renders et coll., (1996)**, des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* génétiquement similaires ont été obtenus chez quatre patients atteints de mucoviscidose aux Pays-Bas.

L'espèce *P. aeruginosa* est une cause majeure des infections pulmonaires chroniques chez les enfants et les adultes atteints de mucoviscidose. Les techniques moléculaires complètent les données phénotypiques et permettent une meilleure compréhension de la diversité bactérienne (Jarych et coll., 2021).

#### 4. Etude du profil de résistance des souches de *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolées d'un même mucus bronchique

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

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des souches de *Candida albicans* co-isolées avec les bactéries à Gram négatif d'un même mucus bronchique sont regroupés dans le **tableau N°4**.

**Tableau N°4 : CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis de *C. albicans***

Souches (nombre)	CMI de l'AmB (µg/mL)		Souches (nombre)	CMI <sub>50</sub> Vor (µg/mL)
	24 h	48 h		
<i>C. albicans</i> ATCC10231	0,5	0,5	<i>C. albicans</i> ATCC10231	0,06
1	0,5	0,5	1	0,06
3	0,125	0,125	3	0,03



Les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de *C. albicans* sont de 0,125µg/mL pour trois souches et de 0,5µg/mL pour une souche après 24 heures d'incubation à 37°C, ces niveaux de CMI restent inchangés après 48 heures d'incubation. Pour le voriconazole, les CMI<sub>50</sub> mesurées après 24 heures d'incubation à 37°C vis-à-vis de ces mêmes souches, sont 0,03µg/mL pour trois souches et de 0,06µg/mL pour une souche.

Selon les recommandations du **CLSI 2008**, les quatre levures de *C. albicans* co-isolées avec *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* sont sensibles à ces deux antifongiques.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Lepesqueur et coll., (2020)** qui ont montré que des souches de *C. albicans* isolées de patients atteints de mucoviscidose au Brésil étaient sensibles à l'amphotéricine B, la flucytosine et le fluconazole.

La sensibilité de *Candida* sp., isolé de dispositifs médicaux, a été rapportée également dans de nombreuses études en Algérie [(**Seddiki et coll., 2015**) ; (**Hassaine-Lahfa et coll., 2017**) ; (**Touil et coll., 2018**)] ainsi qu'en Pologne par **Grela et coll., (2019)**.

Selon **Schwarz et coll., (2018b)**, il est rare que les levures du genre *Candida* soient identifiées comme responsables d'une infection pulmonaire aiguë chez les enfants atteints de mucoviscidose, il est donc recommandé de commencer le traitement antifongique par un dérivé azolé et de le modifier ensuite si besoin.

#### **4.2. Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* en mode planctonique**

Le **tableau N°5** rassemble les valeurs des CMI des antibiotiques testés vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique.

Tableau N° 5 : CMI des antibiotiques testés vis-à-vis de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* co-isolés avec *C. albicans*

Souches	CMI (µg/mL)					
	Ceftazidime	Imipénème	Colistine	Ciprofloxacine	Amikacine	Gentamicine
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	2	1	0,5	0,25	2	1
Pa12	8	8	0,5	0,5	4	2
Pa13	64	16	0,5	0,5	2	1
Pa15	2	1	0,5	0,25	2	1
Pa17	2	1	0,5	0,25	2	1
Ax1	8	1	0,5	2	32	32

Les CMI varient de 2 à 64µg/mL pour la ceftazidime, 1 à 16µg/mL pour l'imipénème, 0,25 à 2µg/mL pour la ciprofloxacine, 2 à 32µg/mL pour l'amikacine et 1 à 32µg/mL pour la gentamicine. Elles sont de 0,5µg/mL pour la colistine vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa*.

Selon les normes fixées par le **CLSI (2016)**, toutes les souches sont sensibles à la colistine, la souche Pa12 est résistante à l'imipénème et Pa13 est résistante à l'imipénème et la ceftazidime.

Ces résultats confirment ceux de l'antibiogramme. Les souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes aux antibiotiques sont souvent isolées des mucus bronchiques de patients mucoviscidosiques (**Sherrard et coll., 2017**).

En Espagne, 11,6% de l'ensemble des isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de mucoviscidose sont résistants à l'imipénème (**Ballestero et coll. 1996**),

Nous constatons également que 25% des souches de *P. aeruginosa* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique sont multirésistantes. Ce taux est élevé comparé à ceux rapportés par **Gailiene et coll., (2007)** en Lituanie et par **Lambiase et coll., (2011)** en Italie qui n'étaient que de 9,85% et de 19,5% respectivement.

Les quatre enfants mucoviscidosiques chez qui ces souches sont isolées présentent une colonisation chronique à *P. aeruginosa* malgré l'antibiothérapie qu'ils reçoivent par voie intraveineuse et aérosols.

Rappelons que dans le cas de la mucoviscidose, la colonisation chronique est définie par l'isolement de *P. aeruginosa* à trois reprises à plus d'un mois d'intervalle sur une période de six mois (**Radoui, 2012**).

De ce fait, en pratique les stratégies thérapeutiques de la mucoviscidose dépendent largement du statut du patient vis-à-vis de cette espèce. En effet, les traitements qui visent à prévenir les infections à *P. aeruginosa*, devraient non seulement améliorer considérablement la durée et la qualité de vie de ces patients mais aussi de réduire de manière significative les coûts des soins (**Mogayzel et coll., 2014**).

Actuellement, le traitement standard pour éradiquer l'infection précoce ou chronique à *P. aeruginosa* est basée sur l'inhalation d'antibiotiques tels que la tobramycine (**Yu et coll., 2012**). D'autres stratégies peu coûteuses, telle que l'utilisation non homologuée de la gentamicine nébulisée qui s'est révélée efficace dans la prise en charge de l'infection précoce à *P. aeruginosa* (**Van Stormbroek et coll., 2019**). Cependant, ces traitements ne sont souvent pas disponibles ou abordables dans les pays en développement comme le nôtre.

Par ailleurs, la souche d'*Achromobacter xylosoxidans* co-isolée avec *P. aeruginosa* et *C. albicans* d'un même mucus bronchique, est résistante à la ciprofloxacine et la gentamicine, avec des CMI de 2µg/mL et 32µg/mL respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Lambiase et coll., (2011)**, qui ont rapporté que 22,4% des isolats d'*A. xylosoxidans* sont multirésistants.

De plus, en **2020**, **Papalia et ses collaborateurs** ont montré qu'*A. xylosoxidans* était résistante aux fluoroquinolones, aux aminosides et la majorité des β-lactamines. Les carbapénèmes étaient les antibiotiques les plus efficaces ; cependant, l'émergence d'isolats résistants a été constatée. Par conséquent, la prescription d'antibiotiques pour les patients atteints de mucoviscidose doit être adaptée en fonction du profil de sensibilité des isolats individuels d'*A. xylosoxidans*.

Le phénomène de multi-résistance observée chez la souche d'*A. xylosoxidans* est probablement lié à l'administration répétée d'antibiotiques pour traiter les infections causées par *P. aeruginosa* (Amoureux et coll., 2013).

## 5. Formation des biofilms mono et multi-espèces *in vitro* par les souches de *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolées d'un même mucus bronchique

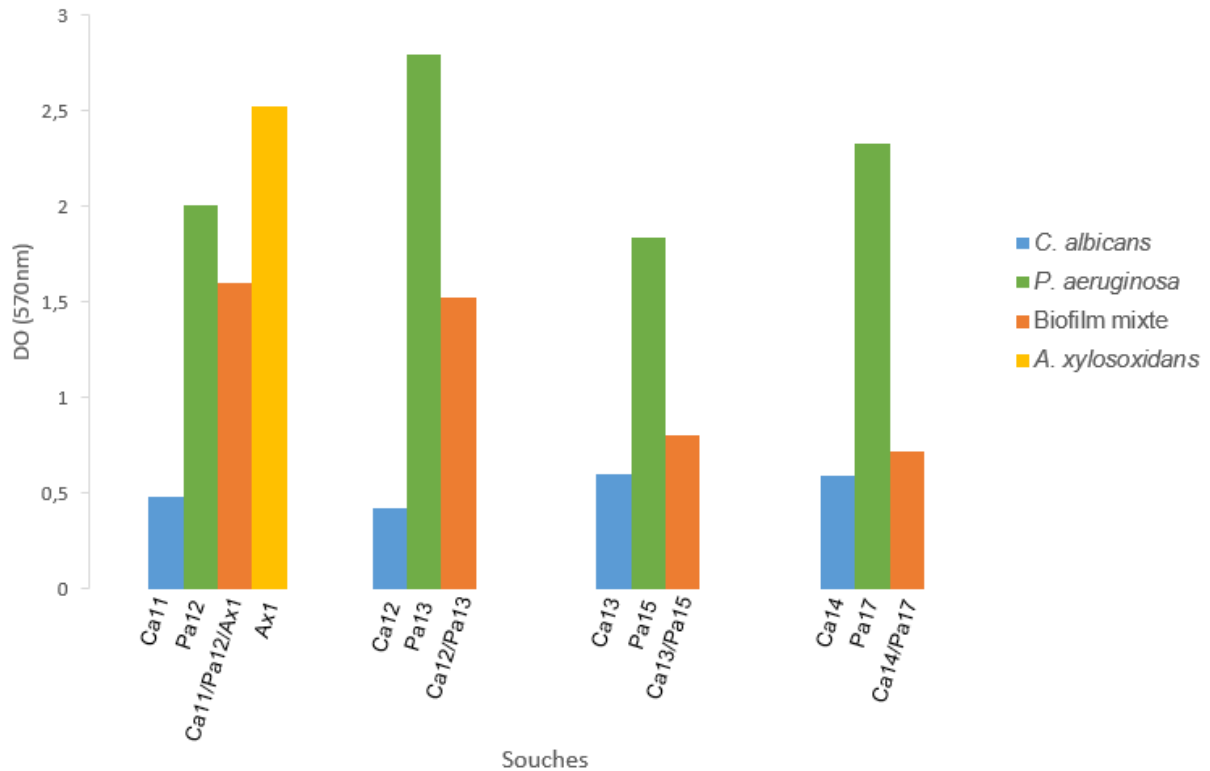
Dans un premier temps, nous avons quantifié les biomasses des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par les souches co-isolées d'un même mucus bronchique par la technique de coloration au crystal violet. Dans un deuxième temps, nous avons mesuré l'activité métabolique de ces mêmes microorganismes dans les biofilms formés par la méthode de réduction du MTT.

### 5.1. Biomasses des biofilms mono et multi-espèces

La **figure N°12** regroupe les résultats de la quantification de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolés d'un même mucus bronchique.

Les densités optiques des biofilms mono-espèces formés par les souches de *C. albicans* varient de 0,424 à 0,601. Selon la classification de **Kodori et coll., (2021)**, les souches Ca11 et Ca12 sont faiblement formatrices de biofilms, tandis que Ca13 et Ca14 sont modérément formatrices de biofilms. En revanche, les souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* forment des biofilms avec des biomasses nettement supérieures à celles des biofilms fongiques. Les densités optiques lues à 570nm sont comprises entre 1,841 et 2,796 pour les souches de *P. aeruginosa* et est de 2,512 pour *A. xylosoxidans*. Toutes ces souches sont fortement formatrices de biofilms (**Kodori et coll., 2021**).

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Rasamiravaka et coll., (2015)** qui ont montré que 80% des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose sont formatrices de biofilms.



**Figure N°12 : Biomasses des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* quantifiées par la méthode du crystal violet**

Concernant les quatre associations étudiées, les biofilms multi-espèces présentent des biomasses significativement supérieures à celles des biofilms formés par *C. albicans* seule ( $p=0,008$ ) et significativement inférieures à celles des biofilms formés par *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* seules ( $p=0,006$ ).

L'augmentation significative de la biomasse des biofilms de *C. albicans* en co-culture avec *P. aeruginosa* a déjà été rapporté par l'équipe de Kasetty (**Kasetty et coll., 2021**).

La diminution de la biomasse des biofilms multi-espèces comparée à celle des biofilms bactériens mono-espèces pourrait s'expliquer par la présence du farnésol, molécule du quorum sensing produite par *Candida albicans*.

Dans un biofilm mixte et afin de résister au stress oxydatif, *Candida albicans* produit du farnésol qui présente un effet délétère sur *Pseudomonas aeruginosa* [(Westwater et coll., 2005) ; (Cugini et coll., 2007)]. En effet, le farnésol est capable d'inhiber la motilité d'essaimage de *Pseudomonas aeruginosa*, médiée par la pyocyanine et la rhamnolipide ainsi que la synthèse de protéines responsables de sa virulence (McAlester et coll., 2008).

### 5.2. CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* co-isolées avec *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* d'un même mucus bronchique

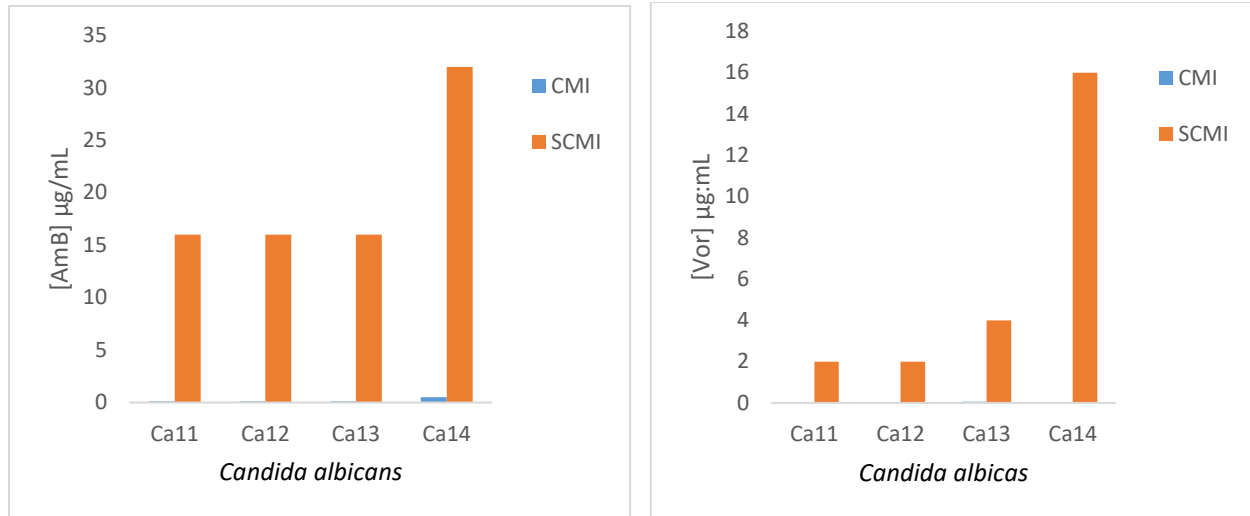
La figure N°13 présente les CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans*.

Les CMI observées sont comprises entre 16 et 32µg/mL pour l'amphotéricine B et entre 2 et 16µg/mL pour le voriconazole.

Les niveaux des CMI des deux antifongiques testés vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* sont significativement supérieurs à ceux obtenus en mode planctonique ( $p=0,001$ ). Cette augmentation est de 128 fois pour l'amphotéricine B et 533 fois pour le voriconazole. L'accroissement des SCMI par rapport aux CMI met en évidence le potentiel des souches isolées à former des biofilms (Ramage et coll., 2002).

Ces résultats corroborent ceux de Bojsen et coll., (2014), qui ont montré qu'en mode sessile, les levures du genre *Candida* sont jusqu'à mille fois plus résistantes aux antifongiques que leurs homologues planctoniques.

La résistance des levures en mode biofilm peut être due à plusieurs mécanismes, notamment la réduction de la pénétration des antifongiques à travers la matrice extracellulaire, la surexpression des gènes de résistance, l'augmentation de l'expression des pompes à efflux et également la modification du métabolisme microbien (Cavalheiro et Teixeira, 2018).



**Figure N°13 : CMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* co-isolées avec *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* d'un même mucus bronchique**

### **5.3. CMI des antibiotiques vis-à-vis des cellules sessiles de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique**

Les CMI de la ceftazidime, l'imipénème, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et la colistine vis-à-vis des cellules sessiles de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* sont représentées sur la **figure N°14**.

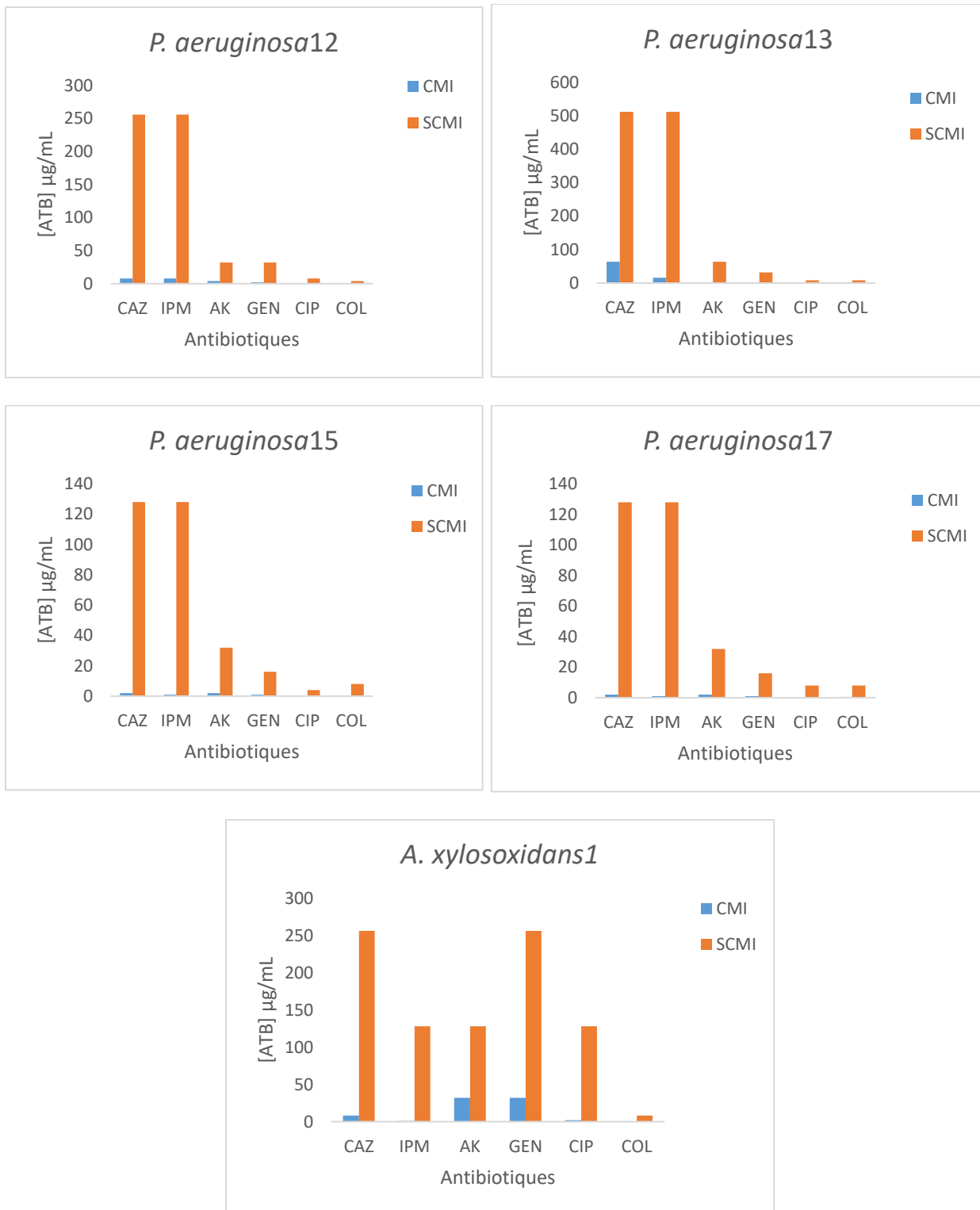


Figure N°14 : CMI des antibiotiques vis-à-vis des cellules sessiles de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans*



Nous constatons que les SCMI s enregistrées pour les antibiotiques testés vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* varient de 128 à 512 µg/mL pour la ceftazidime et l'imipénème, 32 à 64 µg/mL pour l'amikacine et la gentamicine, 16 à 32 µg/mL pour la ciprofloxacine et 4 à 8 µg/mL pour la colistine. En ce qui concerne la souche *A. xylosoxidans*, les SCMI s sont de 256 µg/mL pour la ceftazidime et la gentamicine, 128 µg/mL pour l'imipénème, l'amikacine et la ciprofloxacine et 8 µg/mL pour la colistine.

Une augmentation significative des niveaux des SCMI s par rapport aux CMI s est observée pour tous les antibiotiques testés ( $p= 0,001$ ). Les SCMI s de la ceftazidime et de l'amikacine, antibiotiques utilisés à l'EHS d'Oran pour le traitement des enfants inclus dans ce travail, ont augmenté d'un facteur de 32 envers les souches de *P. aeruginosa* Pa12 et Pa13 respectivement. Aussi, une hausse des SCMI s de l'imipénème d'un facteur de 128 vis-à-vis de Pa15, Pa17 et Ax1 est observée.

L'accroissement des CMI s des cellules sessiles de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolées avec *C. albicans* par rapport à leurs homologues planctoniques confirme que les souches isolées sont formatrices de biofilms (**Ramage et Coll., 2002**).

Dans le cas de la mucoviscidose, *P. aeruginosa* est responsable de l'évolution de l'infection précoce (phase libre ou planctonique) vers une infection respiratoire impliquant la formation d'un biofilm (**Sousa et Pereira, 2014**).

Nous constatons également que les niveaux de SCMI s les plus élevés de tous les antibiotiques testés vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* isolées sont enregistrés pour la souche Pa13 qui présente le phénotype mucoïde. Ce phénotype se traduit par une surproduction d'alginate, l'un des facteurs de virulence de cette espèce (**Blanco-Cabra et coll., 2020**).

Cette souche est isolée chez une fille de 8 ans qui selon les critères établis par **Radoui (2012)**, souffrait d'une colonisation chronique à *P. aeruginosa*. Malheureusement, cette patiente est décédée au cours de la même année d'une exacerbation et d'une insuffisance pulmonaires.

#### 5.4. SCMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des souches de *C. albicans* seules et associées à *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans*

Les résultats des SCMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des souches de *C. albicans* seules et associées à *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* sont représentés sur la **figure N°15**.

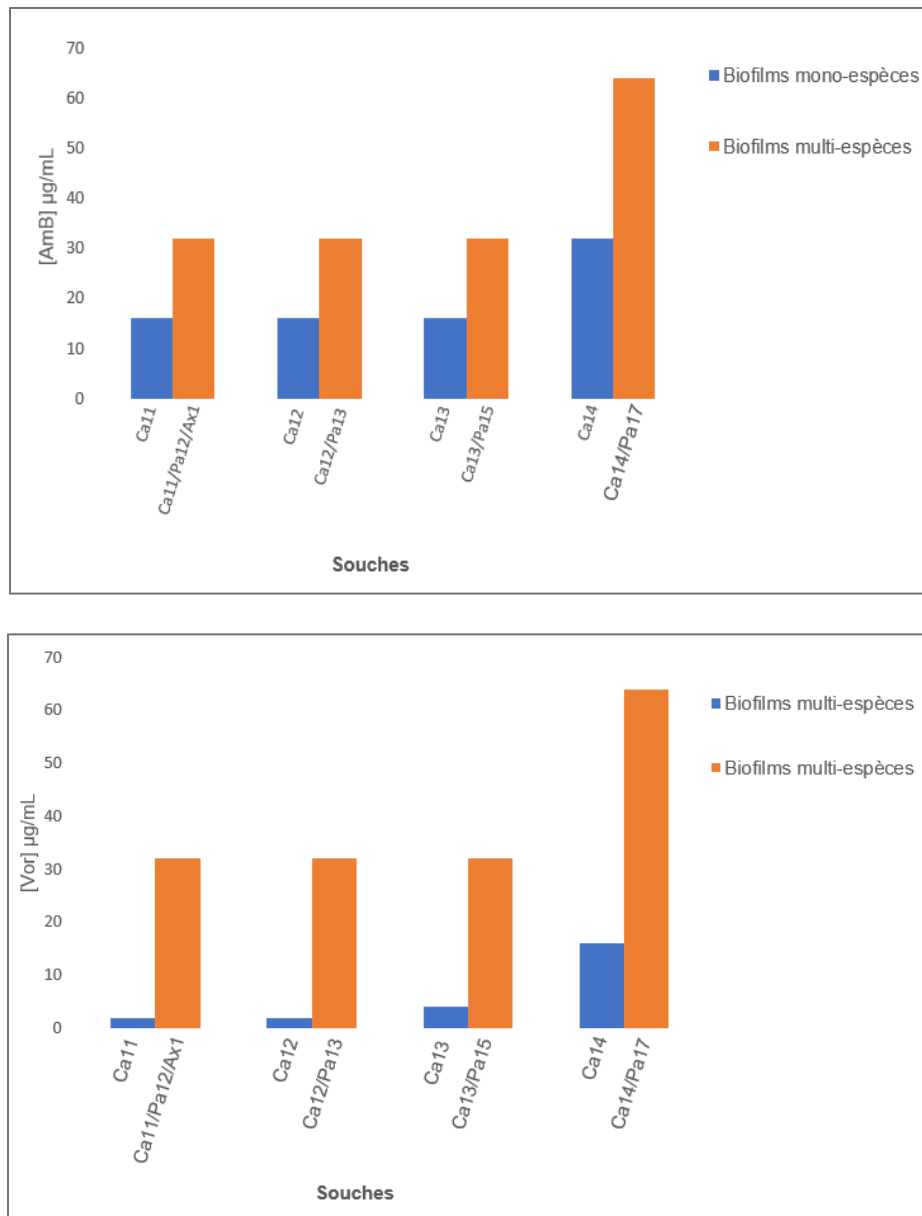


Figure N°15 : SCMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des cellules sessiles de *C. albicans* seules et associées à *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans*

Les SCMI de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des souches de *C. albicans* seules sont comprises entre 16 et 32 $\mu$ g/mL et entre 2 et 16 $\mu$ g/mL respectivement. Alors qu'elles varient de 32 à 64 $\mu$ g/mL vis-à-vis des souches de *C. albicans* associées à *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* pour les deux antifongiques.

Nous observons une augmentation des SCMI d'un facteur de 2 pour l'amphotéricine B et de 16 pour le voriconazole vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans*. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux d'**Alam et coll., (2023)** qui ont montré que la présence de *P. aeruginosa* dans un biofilm mixte avec *C. albicans*, réduit significativement les SCMI des antifongiques polyéniques notamment l'amphotéricine B.

#### **5.5. SCMI des antibiotiques vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* seules et associées à *C. albicans***

Les résultats des SCMI des antibiotiques vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* seules est associées à *C. albicans* sont représentés sur la **figure N°16**.

Nous remarquons que pour le biofilm formé par l'association Ca11/Pa12/Ax1, les SCMI de l'imipénème, de l'amikacine et de la ciprofloxacine ont doublé comparées aux SCMI des biofilms mono-espèces formés par chaque espèce seule, tandis que celles de la colistine, elles ont augmenté d'un facteur de 16. Les SCMI de la ceftazidime et de la gentamicine sont restées inchangées.

Pour l'association Ca12/Pa13, les SCMI de la ceftazidime et de l'imipénème sont restées stables, tandis qu'elles ont augmenté d'un facteur de 4 pour l'amikacine et la gentamicine et d'un facteur de 16 pour la ciprofloxacine et la colistine. Pour les deux autres associations, Ca13/Pa15 et Ca14/Pa17, l'accroissement des SCMI est de 2 fois pour la ceftazidime et l'imipénème, de 4 fois pour l'amikacine, de 8 fois pour la gentamicine et de 16 fois pour la ciprofloxacine et la colistine.

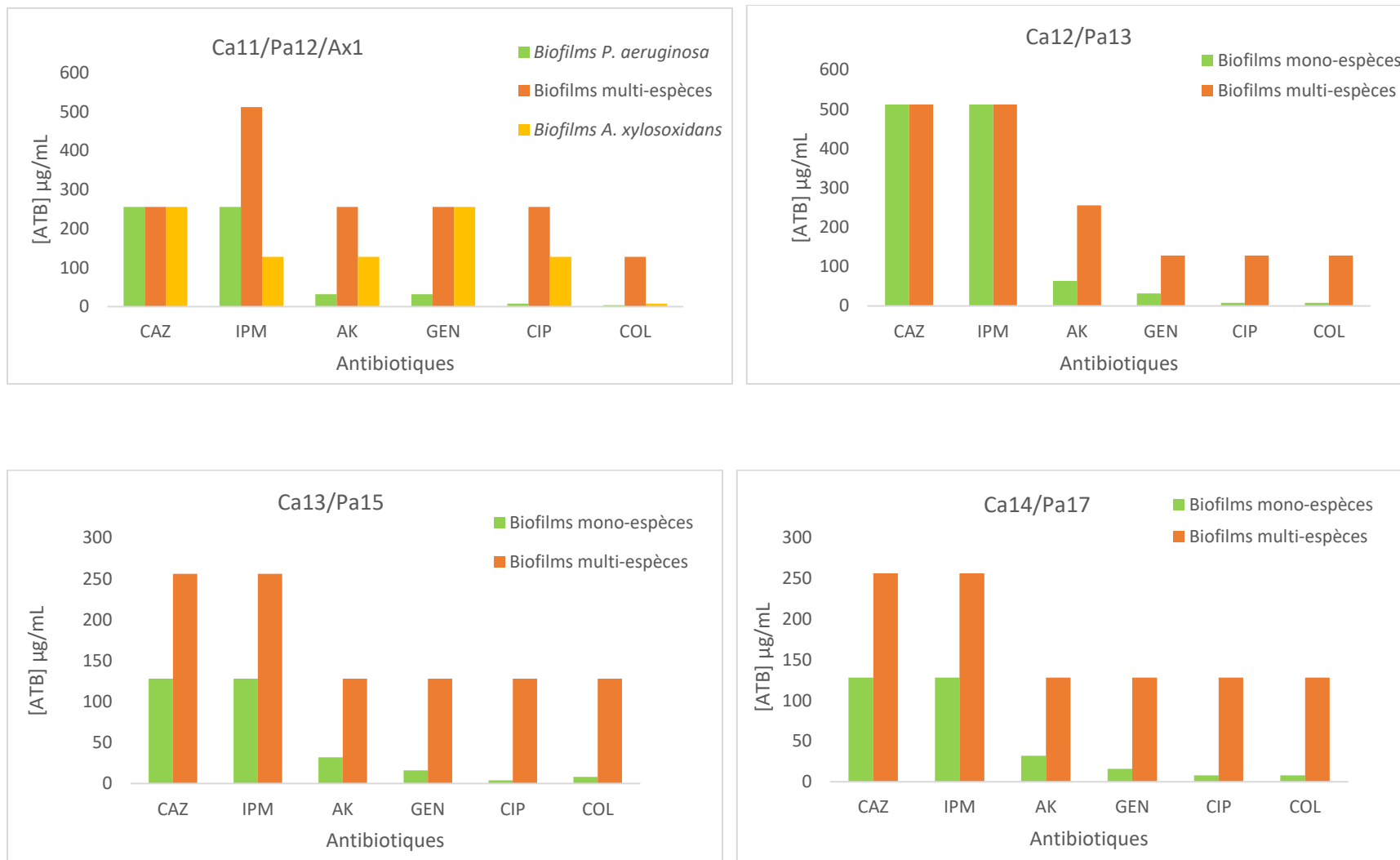


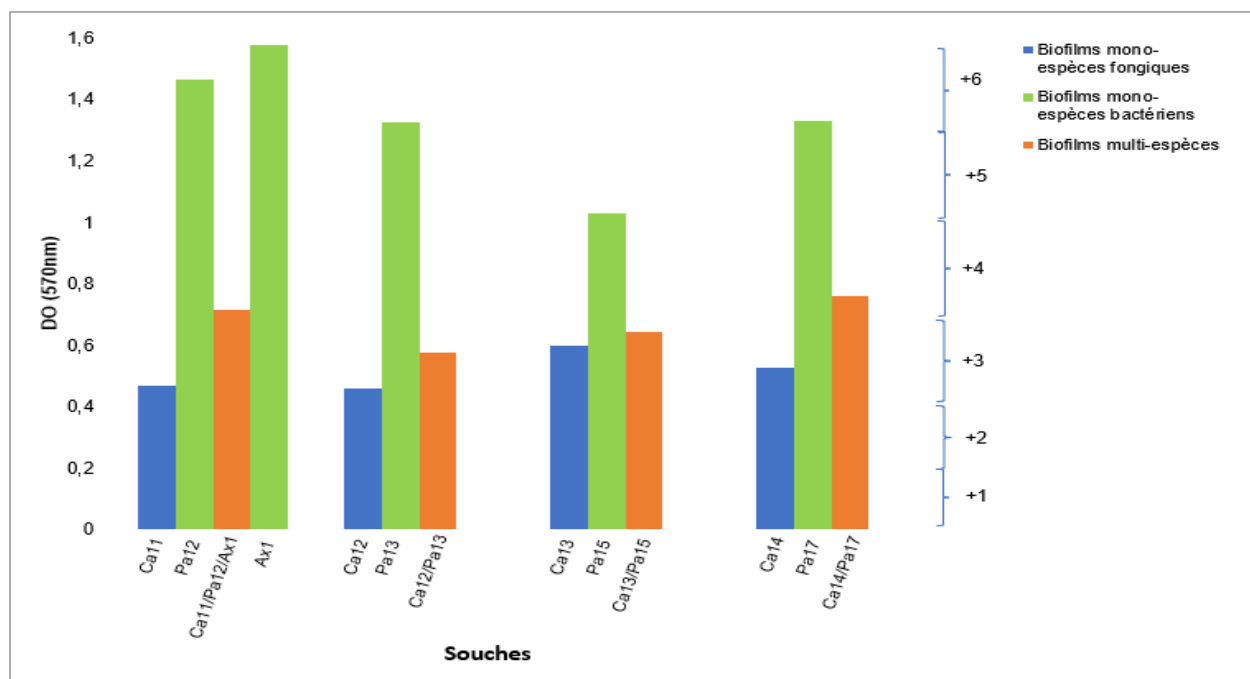
Figure N°16 : SCMI des antibiotiques vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* seules et associées à *C. albicans*

### 5.6. Activités métaboliques des biofilms mono-espèces et multi-espèces formés *in vitro*

Les résultats relatifs aux activités métaboliques de *C. albicans*, de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* au sein des biofilms mono et multi-espèces matures formés *in vitro* sont regroupés sur la **figure N°17**.

La densité optique lue à 570nm renseigne sur le potentiel des microorganismes à former des biofilms mono ou multi-espèces ( $DO \geq 0,2$ ). Elle permet également de classer les souches en quatre catégories différentes à savoir, la catégorie +1 (non formatrices de biofilms), la catégorie +2 (faiblement formatrices de biofilms), la catégorie +3 et +4 (modérément formatrices de biofilms) et la catégorie +5 et +6 (fortement formatrices de biofilms) [(Valentin et coll., 2007) ; (Villar-Vidal et coll., 2011)].

Pour les biofilms mono-espèces, les densités optiques enregistrées varient de 0,458 à 0,597 pour les souches de *C. albicans*, de 1,03 et 0,718 pour les souches de *P. aeruginosa*. Pour *A. xylosoxidans*, la densité optique est de 1,578



**Figure N°17 : Activités métaboliques des biofilms mono et multi-espèces obtenus par réduction du MTT**

La répartition des souches par catégorie nous a permis de classer les souches de *C. albicans* dans la catégorie +3 (modérément formatrices de biofilms), les souches de *P. aeruginosa* dans les catégories +5 et +6 (hautement formatrices de biofilms) et la souche d'*A. xylosoxidans* dans la catégorie +6 (hautement formatrices de biofilms).

Pour les biofilms multi-espèces, une nette diminution de l'activité métabolique est observée pour toutes les associations étudiées par rapport à celles mesurées pour les biofilms mono-espèces formés par *P. aeruginosa*. Cette réduction de l'activité métabolique est de 62,5% ; 57,2% ; 49% et 43,4% pour les associations Ca13/Pa15, Ca14/Pa17, Ca11/Pa12/Ax1 et Ca12/Pa13 respectivement.

Toutes les associations appartiennent aux catégories +3 et +4 (modérément formatrices de biofilms). Ce résultat va dans le même sens que celui de **Lopez-Medina et coll., (2015)** qui ont rapporté que *Candida albicans* réduit de manière significative l'activité métabolique de *Pseudomonas aeruginosa* dans un biofilm mixte.

## **6. Inhibition des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolés d'un même mucus bronchique**

### **6.1. Inhibition par des combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques**

#### **6.1.1. Amphotéricine B/antibiotiques**

L'amphotéricine B est combiné à cinq antibiotiques, la ceftazidime (CAZ), l'amikacine (AK), la gentamicine (GEN), la ciprofloxacine (CIP) et la colistine (COL).

Les SCMI des combinaisons amphotéricine B/antibiotiques vis-à-vis des biofilms mixtes sont regroupés dans le **tableau N°6**

La combinaison de l'amphotéricine B aux antibiotiques induit une baisse significative des SCMI des deux antimicrobiens vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés *in vitro* pour les quatre associations des microorganismes étudiées.

Nous remarquons que la SCMI de l'amphotéricine B a diminué d'un facteur de 4 pour la combinaison AmB/IPM, de 8 pour AmB/CAZ, AmB/GEN et AmB/CIP et de 16 pour AmB/COL.

La détermination du type d'interaction entre l'amphotéricine B et les antibiotiques est basée sur les valeurs calculées des Indices de Concentration Fractionnelle Inhibitrice (FICI). Les résultats obtenus sont regroupés sur le **tableau N°7**.

L'amphotéricine B a une interaction synergique avec quatre antibiotiques à savoir, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et la colistine, tandis qu'avec la ceftazidime, l'interaction est indifférente.

Des études antérieures ont déjà mis en évidence la synergie entre l'amphotéricine B et les antibiotiques. En effet, en **2017, Rodrigues et ses collaborateurs** ont montré que l'amphotéricine B avait une interaction synergique avec la polymixine B vis-à-vis des biofilms mixtes *C. albicans/P. aeruginosa* et récemment, **Benahmed et coll., (2023)** ont rapporté le même type d'interaction entre cet antifongique et la colistine sur des biofilms mixtes *C. parapsilosis/Enterobacter cloacae*.

Tableau N°6 : Inhibition des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par l'amphotéricine B et les antibiotiques seuls et combinés

Associations	AmB	CAZ	AMB/CAZ	AK	AmB/AK	GEN	AmB/GEN	CIP	AmB/CIP	COL	AmB/COL
Ca11/Pa12/Ax1	32	256	4/128	256	8/64	256	4/32	256	8/32	128	4/16
Ca12/Pa13	32	512	16/128	256	8/32	128	8/16	128	8/16	256	2/32
Ca13/Pa15	32	256	16/64	128	8/32	128	4/16	128	8/8	128	2/32
Ca14/Pa17	64	256	4/64	128	8/32	128	8/16	128	8/16	128	4/32

Tableau N°7 : Valeurs des FICI et type d'interaction entre l'amphotéricine B et les antibiotiques vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans*

Associations	FICI AMB/CAZ	Interaction	FICI AmB/AK	Interaction	FICI AmB/GEN	Interaction	FICI AmB/CIP	Interaction	FICI AmB/COL	Interaction
Ca11/Pa12/Ax1	0,625	Indifférente	0,5	Synergique	0,25	Synergique	0,375	Synergique	0,25	Synergique
Ca12/Pa13	0,75	Indifférente	0,5	Synergique	0,375	Synergique	0,375	Synergique	0,187	Synergique
Ca13/Pa15	0,75	Indifférente	0,5	Synergique	0,25	Synergique	0,312	Synergique	0,312	Synergique
Ca14/Pa17	0,31	Synergique	0,5	Synergique	0,25	Synergique	0,25	Synergique	0,312	Synergique



### 6.1.2. Voriconazole/antibiotiques

Les SCMI des combinaisons voriconazole/antibiotiques vis-à-vis des biofilms mixtes sont regroupées dans le **tableau N°8**.

Les antibiotiques testés sont l'amikacine (AK), la gentamicine (GEN), la ciprofloxacine (CIP) et la colistine (COL).

La combinaison du voriconazole aux antibiotiques induit une baisse significative des SCMI des deux antimicrobiens vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par les quatre associations étudiées.

La SCMI du voriconazole combiné à l'amikacine ou à la ciprofloxacine a diminué d'un facteur de 32 et d'un facteur de 16 lorsqu'il est combiné à la gentamicine ou la colistine.

Le calcul des FICI nous a permis de classer toutes les interactions du voriconazole et des antibiotiques testés en synergique (**tableau N°9**).

Une interaction de type synergique a été rapportée pour le voriconazole combiné à la colistine sur des biofilms mono-espèces de *Candida* sp. au CHU de Marseille (France) (**Yousfi et coll., 2019**). Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'effet de combinaisons Voriconazole/antibiotiques sur des biofilms multi-espèces hébergeant *Candida* sp. et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau N°8 : Inhibition des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par le voriconazole et les antibiotiques seuls et combinés

Associations	Vor	AK	Vor/AK	GEN	Vor/GEN	CIP	Vor/CIP	COL	Vor/COL
Ca11/Pa12/Ax1	32	256	2/64	256	2/64	256	1/32	128	2/8
Ca12/Pa13	32	256	1/32	128	2/32	128	2/16	256	4/32
Ca13/Pa15	32	128	8/32	128	2/32	128	2/8	128	4/16
Ca14/Pa17	64	128	16/16	128	16/32	128	8/16	128	16/32

Tableau N°9 : Valeurs des FICI et type d'interaction entre le voriconazole et les antibiotiques vis-à-vis des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans*

Associations	FICI Vor/AK	Interaction	FICI Vor/GEN	Interaction	FICI Vor/CIP	Interaction	FICI Vor/COL	Interaction
Ca11/Pa12/Ax1	0,312	Synergique	0,312	Synergique	0,156	Synergique	0,125	Synergique
Ca12/Pa13	0,281	Synergique	0,312	Synergique	0,187	Synergique	0,125	Synergique
Ca13/Pa15	0,5	Synergique	0,312	Synergique	0,125	Synergique	0,357	Synergique
Ca14/Pa17	0,5	Synergique	0,5	Synergique	0,25	Synergique	0,5	Synergique

Les meilleures combinaisons observées sont amphotéricine B/colistine et voriconazole/colistine. Les SCMI de la colistine passent de 256 à 32µg/mL vis à vis des biofilms multi-espèces Ca12/Pa13 lorsqu'elle est combinée à l'amphotéricine B ou au voriconazole.

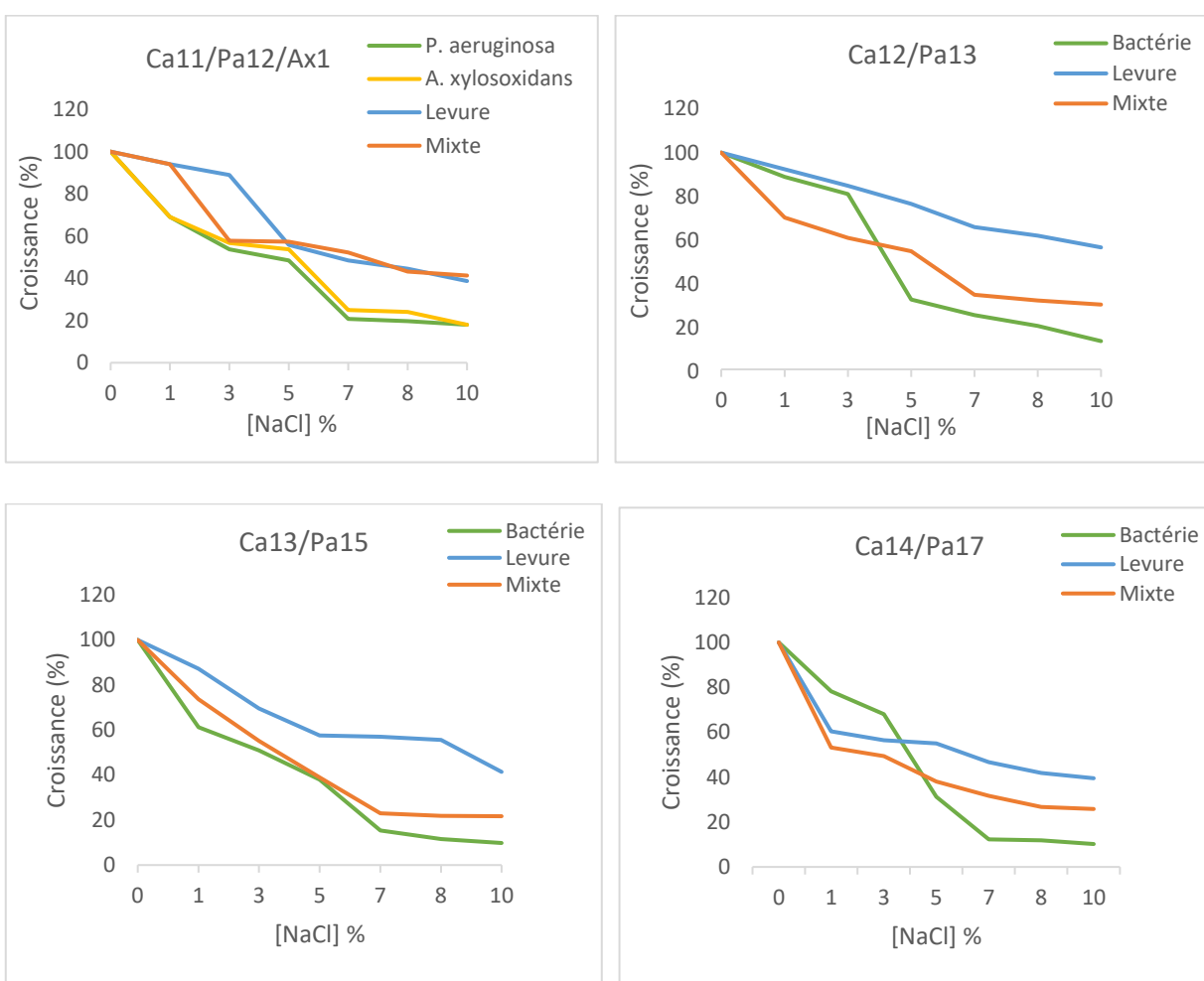
D'après **Sass et coll., (2022)**, les isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de mucoviscidose interagissent de manière synergique avec le voriconazole, inhibant le métabolisme des biofilms de plusieurs souches d'*Aspergillus fumigatus*. Cette interaction est généralement médiée par la pyoverdine, mais aussi par la pyocyanine ou la pyochéline, molécules produites par *P. aeruginosa*. Ces données suggèrent que lors d'une co-infection de champignons et de *P. aeruginosa*, de faibles concentrations de voriconazole pourraient suffire pour contrôler la croissance fongique.

L'utilisation de la colistine en combinaison avec des agents antifongiques est un excellent moyen de réduire la concentration d'antifongiques habituellement utilisée en milieu clinique (**Hsu et coll., 2017**). De ce fait, il serait souhaitable de proposer la combinaison voriconazole/colistine en pratique clinique pour la prise en charge des infections polymicrobiennes (fongiques et bactériennes) chez les enfants atteints de mucoviscidose.

## 6.2. Inhibition par des solutions salines hypertoniques

La nébulisation d'une solution saline hypertonique réduit les exacerbations pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose mais son effet antimicrobien reste peu exploré. Pour cela, nous avons jugé utile d'évaluer l'effet du NaCl sur les biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* selon la technique de Michon et coll., (2014).

Le NaCl est utilisé à des concentrations finales allant de 0 à 10%. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure N°18**.



**Figure N°18 : Inhibition des biofilms mono et multi-espèces par des solutions salines hypertoniques de NaCl**

Nous remarquons que pour les quatre associations étudiées, une diminution significative ( $p=0,004$ ) de la biomasse des biofilms mono et multi-espèces est observée.

Cette diminution est inversement proportionnelle à la concentration de NaCl. En effet, l'inhibition des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* atteint un maximum pour une concentration finale en NaCl de 7%, au-delà de cette concentration le taux d'inhibition reste inchangé pour toutes les associations testées. Pour une concentration en NaCl de 7%, le meilleur taux d'inhibition, estimé à 80%, est obtenu pour les biofilms multi-espèces. Cependant, pour les biofilms mono-espèces, le taux d'inhibition est de 90% et 60% pour les biofilms bactériens et fongiques respectivement.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux rapportés par **Michon et ses collaborateurs (2014)**, qui ont montré que pour des concentrations de NaCl supérieures ou égales à 3%, le taux d'inhibition des biofilms de *P. aeruginosa* isolés de patients atteints de mucoviscidose est de 69%. Une concentration de 10%, quant à elle, a montré une activité bactéricide sur 90% d'isolats.

De plus, l'effet du NaCl sur les biofilms dépend de la nature des microorganismes qui les composent. En effet, les solutions salines hypertoniques de NaCl ont une action plus marquée sur les biofilms mono-espèces formés par *P. aeruginos* ou *A. xylosoxidans* (fortement formatrices de biofilms) que ceux formés par *C. albicans*. Cette différence peut s'expliquer par la structure membranaire des levures de *C. albicans* qui les rend plus résistantes aux solutions salines hypertoniques.

Il est important de noter que l'administration régulière par nébulisation d'une solution saline à une concentration de 6% ou 7% à des patients mucoviscidosiques en Australie a amélioré significativement leurs fonctions pulmonaires avec une nette réduction des exacerbations (**Dwyà deser et Coll., 2023**).

---

**Quatrième partie**  
**Conclusion générale**

---

La mucoviscidose est une maladie systémique chronique souvent létale, due à une altération du gène CFTR qui code pour la protéine CFTR régulatrice des flux hydroélectrolytiques transmembranaires responsables de la qualité des sécrétions exocrines. Le dysfonctionnement de cette protéine provoque la formation d'un mucus épais et hypoxique et une stase des sécrétions pulmonaires ce qui rend les voies aériennes des patients mucoviscidosiques très vulnérables à une colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*, l'infection pulmonaire prédominante dont la présence influence l'évolution de la maladie et la chronicité entraîne une mortalité plus importante chez les patients infectés **(Høiby, 2000)**.

Il s'agit d'un germe opportuniste hautement infectieux qui est souvent associé à d'autres pathogènes tels que *Candida albicans* entraînant ainsi la formation de biofilms polymicrobiens hautement résistants aux traitements habituels et au système immunitaire de l'hôte.

En Algérie, la fréquence de la mucoviscidose est inconnue. Les premières études ont été publiées en 1969, et depuis, peu de recherches ont été menées. La plupart des études ont décrit les mutations CFTR et les signes cliniques chez les patients algériens, mais aucune étude épidémiologique ou microbiologique sur les infections pulmonaires causées par des bactéries Gram négatives et des levures du genre *Candida* n'a été réalisée.

C'est dans ce contexte, que nous avons entrepris cette étude au service de pneumologie et d'allergologie de l'Hôpital pédiatrique d'Oran. Notre objectif dans un premier temps, consiste à faire une caractérisation et une description de la population d'enfants atteints de mucoviscidose dans l'ouest Algérien. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les altérations mixtes impliquant à la fois les bactéries à Gram négatif et les levures de l'espèce *Candida albicans* dans le mucus bronchique de ces patients.

Cette étude a porté sur 34 enfants atteints de mucoviscidose dont 16 garçons et 18 filles âgés de 3 mois à 12 ans, pris en charge à l'hôpital pédiatrique d'Oran, le premier centre national de référence pour la mucoviscidose en service depuis 2008. Ce nombre qui correspond aux enfants mucoviscidosiques de neuf wilayas de l'ouest Algérie ne reflète pas la réalité. Cela s'explique par le fait que la mucoviscidose est sous-diagnostiquée

dans notre pays en raison de l'inaccessibilité des tests génétiques et de l'accès limité au test de la sueur dans les centres de santé publics.

En plus de cela, il y a un manque de campagnes de sensibilisation sur cette maladie auprès des professionnels de la santé et des familles des patients en particulier dans les zones rurales.

La caractérisation de cette population a montré que la consanguinité concerne 19 couples, soit 55,8% des familles. Parmi les patients, 56% souffrent d'insuffisance pondérale. Le diagnostic est souvent tardif, avec un âge moyen de  $1,2 \pm 1,5$  ans, contrairement aux pays développés où un dépistage néonatal est effectué.

Les principales manifestations cliniques chez tous les patients sont représentées par des affections respiratoires telles qu'une congestion bronchique et une toux chronique, ainsi que des troubles digestifs, une insuffisance exocrine et une carence en vitamines liposolubles. En termes de comorbidités, 38,2% des patients souffrent de malnutrition, 29,4% de bronchopneumonie sévère et 11,8% d'asthme. En conséquence, trois patients (8,8%) sont décédés à un âge moyen de  $9 \pm 2,6$  ans, principalement en raison d'une insuffisance respiratoire. Près de 74% des familles sont issues des classes inférieure et moyenne inférieure, seul 50% des parents ont un niveau d'éducation secondaire ou universitaire et 53% ne bénéficient pas de protection sociale. Il est important de noter que la mucoviscidose n'est pas considérée comme une maladie chronique en Algérie.

La mucoviscidose est une maladie qui réduit l'espérance de vie. En Algérie, la condition des enfants atteints de cette maladie se dégrade rapidement. Malgré les efforts des professionnels de la santé, la prise en charge demeure insuffisante comparée à celle des pays développés.

Le deuxième volet de cette étude a porté sur l'analyse microbiologique de 67 mucus bronchiques prélevés entre mars 2019 et avril 2020 chez 34 enfants de l'ouest Algérien atteints de mucoviscidose.

Sur un total de 67 mucus bronchiques prélevés, 64 se sont révélés positifs, soit un taux d'altération de 98%. Les altérations mixtes représentent 80%, avec 51% causées par des



levures et des bactéries dont 27% sont altérés par *Candida albicans* et des bactéries Gram négatives, dominées par *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

Quatre associations de *Candida albicans*/bactéries à Gram négatif sont identifiées. *C. albicans* cohabite avec *P. aeruginosa* dans trois associations et avec *P. aeruginosa* et *Achromobacter xylosoxidans* dans une association.

La caractérisation moléculaire des souches de *P. aeruginosa* par ERIC-PCR a montré que les souches Pa15 et Pa17 isolées des mucus bronchiques d'une fille de Chlef âgée de 8 ans et d'un garçon de Tlemcen âgé de 6 ans, présentent le taux le plus élevé de similarité (200%). Cette similarité génétique est probablement liée au fait que ces enfants ont séjournés ensemble plusieurs fois au service de pneumologie et d'allergologie de l'hôpital pédiatrique d'Oran.

De plus, les enfants atteints de mucoviscidose reçoivent une antibiothérapie curative pour contrôler les exacerbations broncho-pulmonaires, avec des traitements incluant la ceftazidime et l'amikacine sans aucun traitement antifongique. Or, les levures du genre *Candida* sont retrouvées dans nos prélèvements avec un taux 46,2%. De ce fait, il est important d'introduire un antifongique dans la prise en charge de ces enfants.

Toutes les souches de *P. aeruginosa* co-isolées avec *C. albicans* d'un même mucus bronchique sont fortement formatrices de biofilms, tandis que celles de *C. albicans* le sont faiblement à modérément.

L'activité métabolique des biofilms mixtes a diminué par rapport à celle des biofilms mono-espèces bactériens, indiquant que l'interaction entre *C. albicans* et *P. aeruginosa* est de type antagoniste. Deux souches de *P. aeruginosa* (Pa12 et Pa13) se sont révélées résistantes à l'imipénème et présentant un phénotype de métallobêta-lactamases. La souche Pa13 est à la fois multirésistante et mucoïde, avec les CMI et SCMI les plus élevées. *Achromobacter xylosoxidans* co-isolée avec *P. aeruginosa* et *C. albicans*, présente également une multirésistance à plusieurs bêta-lactamines, aminoglycosides et la ciprofloxacine. En revanche, toutes les souches de *Candida albicans* sont sensibles aux deux antifongiques testés, l'amphotéricine B et le voriconazole.

Une augmentation significative des niveaux des SCMI par rapport aux CMI a été observée pour tous les antimicrobiens testés. Elle atteint un facteur de 128 pour l'amphotéricine B et l'imipénème. La détermination des activités métaboliques des biofilms multi-espèces (*C. albicans*/*P. aeruginosa*) par réduction du MTT a permis de classer ces souches dans la catégorie modérément formatrice de biofilms.

Pour inhiber les biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. xylosoxidans* co-isolés d'un même mucus bronchique, nous avons testé différentes combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques. Les meilleures combinaisons étaient amphotéricine B/colistine et voriconazole/colistine. Pour augmenter l'efficacité des traitements antibiotiques, il serait bénéfique d'introduire des antifongiques, en particulier le voriconazole qui présente moins d'effets toxiques vis-à-vis des cellules animales hôtes que l'amphotéricine B.

Nous avons également testé l'efficacité des solutions salines hypertoniques et avons constaté qu'à une concentration de 7% de NaCl, nous obtenons le meilleur taux d'inhibition estimé à 90% pour les biofilms bactériens, 60% pour les biofilms fongiques et 80% pour les biofilms mixtes. La nébulisation de solutions salines hypertoniques est une approche thérapeutique relativement simple et accessible qui peut être utilisée pour aider à dégager les voies respiratoires, réduire la fréquence des exacerbations pulmonaires et améliorer la qualité de vie des patients atteints de mucoviscidose.

Le coût du traitement de base, environ 4500 DA par mois, est élevé pour les familles sans couverture sociale (53%). Par conséquent, il est essentiel d'inclure cette maladie dans la liste des maladies chroniques. Il est recommandé de généraliser le test de la sueur à l'échelle nationale et d'instaurer le dépistage néonatal afin de permettre un diagnostic précoce et une meilleure prise en charge de la mucoviscidose.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Faire une étude épidémiologique en vue de recenser tous les malades atteints de mucoviscidose en Algérie et de créer un registre national.
- Réaliser une étude descriptive de la population mucoviscidosique adulte en Algérie.
- Evaluer l'efficacité des associations d'antimicrobiens (antibiotiques/antifongiques) *in silico* et *in vivo*

---

## **Cinquième partie**

# **Références bibliographiques**

---

1. Alam, F., Blackburn, S.A., Davis, J., Massar, K., Correia, J., Tsai, H.-J., Blair, J.M.A., Hall, R.A., **2023**. *Pseudomonas aeruginosa* increases the susceptibility of *Candida albicans* to amphotericin B in dual-species biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 78, 2228–2241. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad228>
2. Amoureux, L., Bador, J., Siebor, E., Taillefumier, N., Fanton, A., Neuwirth, C., **2013**. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: first French data. *J. Cyst. Fibros.* 12, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.08.005>
3. Ballesteros, S., Fernández-Rodríguez, A., Villaverde, R., Escobar, H., **1996**. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8858455/>
4. Bandara, H.M.H.N., K Cheung, B.P., Watt, R.M., Jin, L.J., Samaranyake, L.P., **2013**. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide inhibits *Candida albicans* hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. *Mol. Oral Microbiol.* 28, 54–69. <https://doi.org/10.1111/omi.12006>
5. Benahmed, A., Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Tani, Z.Z.B.A.-K., Aissaoui, M., Kendil, W., Merabet, D.H., Lakhal, H., Boucherit, K., **2023**. *In vitro* evaluation of biofilm formation by *Candida parapsilosis* and *Enterobacter cloacae*. Scanning electron microscopy and efficacy of antimicrobial combinations study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 107, 116003. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116003>
6. Bendoukha, I., Boucherit-Otmani, Z., Baba Ahmed-Kazi Tani, Z.Z., Seghir, A., Madouni, M., Radoui, A.K., Boucherit, K., **2024**. Initial characteristics of cystic fibrosis in Algeria: Description of 34 pediatric cases. *Pediatr. Pulmonol.* 59, 1454–1461. <https://doi.org/10.1002/ppul.26939>
7. Bergès, L., Rodriguez-Villalobos, H., Deplano, A., Struelens, M.J., **2007**. For detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 812–813. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm001>

8. Bhagirath, A.Y., Li, Y., Somayajula, D., Dadashi, M., Badr, S., Duan, K., **2016**. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 16, 174. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0339-5>
9. Blanchard, A.C., Waters, V.J., **2019**. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 40, 727–736. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1698464>
10. Blanco-Cabra, N., Paetzold, B., Ferrar, T., Mazzolini, R., Torrents, E., Serrano, L., LLuch-Senar, M., **2020**. Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci. Rep.* 10, 9390. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66293-2>
11. Bojsen, R., Regenber, B., Folkesson, A., **2014**. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC Microbiol.* 14, 305. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0305-4>
12. Boukari, R., Smati, L., Nafissa, B., Redjala, O., Boufersaoui, A., Benhassine, F., Girodon, E., Baghriche, M., **2006**. E2/327 – Cystic fibrosis in Algeria: clinical spectrum and genotypic data. *Paediatr. Respir. Rev.* 7. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2006.04.083>
13. Boussetta, K., Khalsi, F., Bahri, Y., Belhadj, I., Tinsa, F., Messaoud, T.B., Hamouda, S., **2018**. Cystic fibrosis in Tunisian children: a review of 32 children. *Afr. Health Sci.* 18, 664–670. <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i3.24>
14. Boutrid, N., Rahmoune, H., Bouziane-Nedjadi, K., Service de Pédiatrie, Oran, Algérie, Radoui, A., Service de Pédiatrie, Oran, Algérie, **2021**. Digestive and hepatobiliary manifestations of children with cystic fibrosis in Oran, Algeria. *Batna J. Med. Sci.* 8, 36–41. <https://doi.org/10.48087/BJMSoa.2021.8107>
15. Brouard, J., Lecoq, I., Viel, J.F., Guillot, M., Laurans, M., Laroche, D., Travert, G., Duhamel, J.F., **2001**. Evaluation of diagnosis and follow-up in screened children with cystic fibrosis in Normandy. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 8 Suppl 3, 603–609. [https://doi.org/10.1016/s0929-693x\(01\)80015-4](https://doi.org/10.1016/s0929-693x(01)80015-4)

16. Burmølle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Moser, C., Kirketerp-Møller, K., Johansen, H.K., Høiby, N., Jensen, P.Ø., Sørensen, S.J., Bjarnsholt, T., **2010**. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 324–336. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x>
17. Butnariu, L.I., Țarcă, E., Cojocaru, E., Rusu, C., Moisă, Ștefana M., Leon Constantin, M.-M., Gorduza, E.V., Trandafir, L.M., **2021**. Genetic Modifying Factors of Cystic Fibrosis Phenotype: A Challenge for Modern Medicine. *J. Clin. Med.* 10, 5821. <https://doi.org/10.3390/jcm10245821>
18. Castellani, S., Di Gioia, S., di Toma, L., Conese, M., **2018**. Human Cellular Models for the Investigation of Lung Inflammation and Mucus Production in Cystic Fibrosis. *Anal. Cell. Pathol. Amst.* 3, 839-803. <https://doi.org/10.1155/2018/3839803>
19. Cavalheiro, M., Teixeira, M.C., **2018**. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front. Med.* 5, 28. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
20. Chen, A.I., Dolben, E.F., Okegbe, C., Harty, C.E., Golub, Y., Thao, S., Ha, D.G., Willger, S.D., O'Toole, G.A., Harwood, C.S., Dietrich, L.E.P., Hogan, D.A., **2014**. *Candida albicans* ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines. *PLoS Pathog.* 10, e1004480. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004480>
21. Chotirmall, S.H., McElvaney, N.G., **2014**. Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens? *Int. J. Biochem. Cell Biol., Cystic Fibrosis: From o-mics to cell biology, physiology, and therapeutic advances.* 52, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.001>
22. 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>

23. CLSI, **2016**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI document M100S, *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
24. CLSI, **2008**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
25. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., **1999**. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
26. Crowley, E.M., Bosslet, G.T., Khan, B., Ciccarelli, M., Brown, C.D., **2020**. Social complexity negatively influences lung function in cystic fibrosis after transfer to adult care. *Pediatr. Pulmonol.* 55, 24–26. <https://doi.org/10.1002/ppul.24523>
27. Cugini, C., Calfee, M.W., Farrow, J.M., Morales, D.K., Pesci, E.C., Hogan, D.A., **2007**. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 65, 896–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05840.x>
28. Da Silva Filho, L.V.R.F., Zampoli, M., Cohen-Cyberknoh, M., Kabra, S.K., **2021**. Cystic fibrosis in low and middle-income countries (LMIC): A view from four different regions of the world. *Paediatr. Respir. Rev.* 38, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2020.07.004>
29. Davies, J.C., Alton, E.W.F.W., Bush, A., **2007**. *Cystic fibrosis*. *BMJ*. 335, 1255–1259. <https://doi.org/10.1136/bmj.39391.713229.AD>
30. De Kievit, T.R., Iglewski, B.H., **2000**. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 68, 4839–4849. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000>
31. Dhamgaye, S., Qu, Y., Peleg, A.Y., **2016**. Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cell. Microbiol.* 18, 1716–1722. <https://doi.org/10.1111/cmi.12674>

32. Doring, G., Conway, S.P., Heijerman, H.G., Hodson, M.E., Hoiby, N., Smyth, A., Touw, D.J., **2000**. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur. Respir. J.* 16, 749–767.
33. Drenkard, E., Ausubel, F.M., **2002**. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* 416, 740–743. <https://doi.org/10.1038/416740a>
34. Dwyer, T.J., Elkins, M.R., Dentice, R., Forbes, S., Cooper, P., Jaffe, A., Bishop, J., Middleton, P.G., Wark, P., Bye, P.T.P., SALT-CF Study Group, **2023**. Saline at lower tonicity in cystic fibrosis (SALT-CF) trial comparing 0.9% versus 3% versus 6% nebulised saline. *Eur. Respir. J.* 62, 2100960. <https://doi.org/10.1183/13993003.00960-2021>
35. Elborn, J.S., **2006**. Practical Management of Cystic Fibrosis. *Chron. Respir. Dis.* 3, 161–165. <https://doi.org/10.1191/1479972306cd111rs>
36. El Makhzen, N., Daimi, H., Bouguenouch, L., Abriel, H., **2024**. The burden of cystic fibrosis in North Africa. *Front Genet.* 14, 129-5008. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1295008>
37. Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B., Gibson, R.L., **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 91–100. <https://doi.org/10.1002/ppul.10127>
38. Feuillet-Fieux, M.N., Ferrec, M., Gigarel, N., Thuillier, L., Sermet, I., Steffann, J., Lenoir, G., Bonnefont, J.P., **2004**. Novel CFTR mutations in black cystic fibrosis patients. *Clin Genet.* 65, 284–287. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00230.x>
39. Fourie, R., Ells, R., Swart, C.W., Sebolai, O.M., Albertyn, J., Pohl, C.H., **2016**. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* Interaction, with Focus on the Role of Eicosanoids. *Front. Physiol.* 7, 64. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00064>



40. Frayman, K.B., Armstrong, D.S., Grimwood, K., Ranganathan, S.C., **2017**. The airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 52, 1384–1404. <https://doi.org/10.1002/ppul.23782>
41. Gailiene, G., Pavilionis, A., Kareiviene, V., **2007**. The peculiarities of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to antibiotics and prevalence of serogroups. *Med. Kaunas Lith.* 43, 36–42.
42. Gourari-Bouzouina, K., Boucherit-Otmani, Z., Halla, N., Seghir, A., Baba Ahmed-Kazi Tani, Z.Z., Boucherit, K., **2024**. Exploring the dynamics of mixed-species biofilms involving *Candida* spp. and bacteria in cystic fibrosis. *Arch. Microbiol.* 206, 255. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03967-9>
43. Grant, L.R., Hammitt, L.L., Murdoch, D.R., O'Brien, K.L., Scott, J.A., **2012**. Procedures for collection of induced sputum specimens from children. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 54 Suppl 2, S140-145. <https://doi.org/10.1093/cid/cir1069>
44. Grela, E., Zdybicka-Barabas, A., Pawlikowska-Pawlega, B., Cytrynska, M., Wlodarczyk, M., Grudzinski, W., Luchowski, R., Gruszecki, W.I., **2019**. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Sci. Rep.* 9, 17029. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53517-3>
45. Haiko, J., Saeedi, B., Bagger, G., Karpati, F., Özenci, V., **2019**. Coexistence of *Candida* species and bacteria in patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 1071–1077. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03493-3>
46. Hamouda, S., Fredj, S.H., Hilioui, S., Khalsi, F., Ameer, S.B., Bouguila, J., Boussoffara, R., Besbes, H., Ajmi, H., Mattoussi, N., Messaoud, T., Mehrezi, A., Hachicha, M., Boughamoura, L., Sfar, M.T., Gueddiche, N., Abroug, S., Becheur, S.B., Barsaoui, S., Tebib, N., Samoud, A., Gandoura, N., Tinsa, F., Boussetta, K., **2020**. Preliminary national report on cystic fibrosis epidemiology in Tunisia: the actual state of affairs. *Afr. Health Sci.* 20, 444–452. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i1.51>

47. 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). *J. Mycol. Medicale*. 27, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.01.012>
48. Høiby, N., **2000**. Prospects for the prevention and control of pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. *Paediatr. Drugs*. 2, 451–463. <https://doi.org/10.2165/00128072-200002060-00004>
49. Hsu, L.-H., Wang, H.-F., Sun, P.-L., Hu, F.-R., Chen, Y.-L., **2017**. The antibiotic polymyxin B exhibits novel antifungal activity against *Fusarium* species. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 49, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.029>
50. 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*. *Rev. Iberoam. Micol.* 29, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.02.003>
51. Ibrahim, S.A., Fadl Elmola, M.A., Karrar, Z.A., Arabi, A.M.E., Abdullah, M.A., Ali, S.K., Elawad, F., Ali, T.E.A., Abdulrahman, M.B., Ahmed, S.O., Gundi, A.S., **2014**. Cystic fibrosis in Sudanese children: First report of 35 cases. *Sudan. J. Paediatr.* 14, 39–44.
52. Jarych, D., Augustynowicz-Kopec, E., Iwanska, A., Parniewski, P., Majchrzak, M., **2021**. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Sci. Rep.* 11, 15460. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95034-2>
53. Jelsbak, L., Johansen, H.K., Frost, A.-L., Thøgersen, R., Thomsen, L.E., Ciofu, O., Yang, L., Haagensen, J.A.J., Høiby, N., Molin, S., **2007**. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 75, 2214–2224. <https://doi.org/10.1128/IAI.01282-06>

54. Jørgensen, K.M., Wassermann, T., Johansen, H.K., Christiansen, L.E., Molin, S., Høiby, N., Ciofu, O., **2015**. Diversity of metabolic profiles of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* during the early stages of lung infection. *Microbiol. Read. Engl.* 161, 1447–1462. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000093>
55. Kasetty, S., Mould, D.L., Hogan, D.A., Nadell, C.D., **2021**. Both *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* Accumulate Greater Biomass in Dual-Species Biofilms under Flow. *mSphere*. 4,16-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00416-21>
56. Katragkou, A., McCarthy, M., Alexander, E.L., Antachopoulos, C., Meletiadis, J., Jabra-Rizk, M.A., Petraitis, V., Roilides, E., Walsh, T.J., **2015**. *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 470–478. <https://doi.org/10.1093/jac/dku374>
57. Kêkê, L.M., Samouda, H., Jacobs, J., di Pompeo, C., Lemdani, M., Hubert, H., Zitouni, D., Guinhouya, B.C., **2015**. Body mass index and childhood obesity classification systems: A comparison of the French, International Obesity Task Force (IOTF) and World Health Organization (WHO) references. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 63, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2014.11.003>
58. Kodori, M., Nikmanesh, B., Hakimi, H., Ghalavand, Z., **2021**. Antibiotic susceptibility and biofilm formation of bacterial isolates derived from pediatric patients with cystic fibrosis from Tehran, Iran. *Arch. Razi Inst.* 76, 397–406. <https://doi.org/10.22092/ari.2020.128554.1416>
59. Lambiase, A., Catania, M.R., del Pezzo, M., Rossano, F., Terlizzi, V., Sepe, A., Raia, V., **2011**. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 973–980. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1182-5>
60. Lascano-Vaca, Y., Ortiz-Prado, E., Gomez-Barreno, L., Simbaña-Rivera, K., Vasconez, E., Lister, A., Arteaga-Espinosa, M.E., Perez, G.F., **2020**. Clinical, genetic and microbiological characterization of pediatric patients with cystic

- fibrosis in a public Hospital in Ecuador. *BMC Pediatr.* 20, 111. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-2013-6>
61. Lee, B., Haagensen, J.A.J., Ciofu, O., Andersen, J.B., Høiby, N., Molin, S., **2005**. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5247–5255. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5247-5255.2005>
62. Lapesqueur, L.S.S., Tanaka, M.H., Lima, G. de M.G., Chiba, S.M., Mota, A.J., Santos, S.F., Koga-Ito, C.Y., **2020**. Oral prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species in cystic fibrosis patients. *Arch. Oral Biol.* 116, 104,772. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104772>
63. Li, Z., Kosorok, M.R., Farrell, P.M., Laxova, A., West, S.E.H., Green, C.G., Collins, J., Rock, M.J., Splaingard, M.L., **2005**. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 293, 581–588. <https://doi.org/10.1001/jama.293.5.581>
64. Lopez-Medina, E., Fan, D., Coughlin, L.A., Ho, E.X., Lamont, I.L., Reimann, C., Hooper, L.V., Koh, A.Y., **2015**. *Candida albicans* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence through suppression of pyochelin and pyoverdine biosynthesis. *PLoS Pathog.* 11, 1005129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005129>
65. Loumi, O., Ferec, C., Mercier, B., Creff, J., Fercot, B., Denine, R., Grangaud, J.P., **2008**. CFTR mutations in the Algerian population. *J. Cyst. Fibros.* 7, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2007.04.004>
66. Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., **2002**. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 194–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>
67. McAlester, G., O’Gara, F., Morrissey, J.P., **2008**. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 57, 563–569. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47705-0>

68. Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., **2012**. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
69. Martin, D.W., Schurr, M.J., Mudd, M.H., Govan, J.R., Holloway, B.W., Deretic, V., **1993**. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8377–8381. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8377>
70. Menetrey, Q., Dupont, C., Chiron, R., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., **2020**. High Occurrence of Bacterial Competition Among Clinically Documented Opportunistic Pathogens Including *Achromobacter xylosoxidans* in Cystic Fibrosis. *Front. Microbiol.* 11, 558-160. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.558160>
71. Michon, A.-L., Jumas-Bilak, E., Chiron, R., Lamy, B., Marchandin, H., **2014**. Advances toward the Elucidation of Hypertonic Saline Effects on *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE.* 9, 01-64. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090164>
72. Mogayzel, P.J., Naureckas, E.T., Robinson, K.A., Brady, C., Guill, M., Lahiri, T., Lubsch, L., Matsui, J., Oermann, C.M., Ratjen, F., Rosenfeld, M., Simon, R.H., Hazle, L., Sabadosa, K., Marshall, B.C., Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Clinical Practice Guidelines Committee, **2014**. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 11, 1640–1650. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201404-166OC>
73. Morales, D.K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L.E.P., Jacobs, N.J., Hogan, D.A., **2013**. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. 4, 526-512. <https://doi.org/10.1128/mBio.00526-12>

74. Morales, D.K., Hogan, D.A., **2010**. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.* 6, 1000-886. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000886>
75. Muthig, M., Hebestreit, A., Ziegler, U., Seidler, M., Müller, F.-M.C., **2010**. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med. Mycol.* 48, 56–63. <https://doi.org/10.3109/13693780802716532>
76. Nixon, G.M., Armstrong, D.S., Carzino, R., Carlin, J.B., Olinsky, A., Robertson, C.F., Grimwood, K., **2001**. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 138, 699–704. <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.112897>
77. O'Brien, S., Fothergill, J.L., **2017**. The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, fnx128. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx128>
78. Office Nationale des Statistiques, **2020**. Demographie Algerienne N°949.
79. Oliver, A., Alarcón, T., Caballero, E., Cantón, R., **2009**. Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27, 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.05.004>
80. Ovchinnikova, E.S., Krom, B.P., Mei, H.C. van der, Busscher, H.J., **2012**. Force microscopic and thermodynamic analysis of the adhesion between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Soft Matter.* 8, 6454–6461. <https://doi.org/10.1039/C2SM25100K>
81. Papalia, M., Steffanowski, C., Traglia, G., Almuzara, M., Martina, P., Galanternik, L., Vay, C., Gutkind, G., Ramírez, M.S., Radice, M., **2020**. Diversity of *Achromobacter* species recovered from patients with cystic fibrosis, in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 52, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.03.004>
82. Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., O'May, G.A., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E., **2012**. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 193–213. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>

83. Phelan, V.V., Moree, W.J., Aguilar, J., Cornett, D.S., Koumoutsis, A., Noble, S.M., Pogliano, K., Guerrero, C.A., Dorrestein, P.C., **2014**. Impact of a transposon insertion in *phzF2* on the specialized metabolite production and interkingdom interactions of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196, 1683–1693. <https://doi.org/10.1128/JB.01258-13>
84. Pierce, C.G., Uppuluri, P., Tristan, A.R., Wormley, F.L., Mowat, E., Ramage, G., Lopez-Ribot, J.L., **2008**. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.* 3, 1494–1500. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>
85. Polke, M., Leonhardt, I., Kurzai, O., Jacobsen, I.D., **2018**. Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. *Crit. Rev. Microbiol.* 44, 230–243. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1337711>
86. Pompilio, A., Scribano, D., Sarshar, M., Di Bonaventura, G., Palamara, A.T., Ambrosi, C., **2021**. Gram-Negative Bacteria Holding Together in a Biofilm: The *Acinetobacter baumannii* Way. *Microorganisms.* 9, 1353. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071353>
87. Ponde, N.O., Lortal, L., Ramage, G., Naglik, J.R., Richardson, J.P., **2021**. *Candida albicans* Biofilms and Polymicrobial Interactions. *Crit. Rev. Microbiol.* 47, 91–111. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
88. Radoui, A., **2012**. Childhood cystic fibrosis: epidemiological approach and clinical study in western Algeria. Faculté de médecine d'Oran, Oran, Algérie.
89. Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., **2002**. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459–5463. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>
90. Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M., **2015**. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Res. Int.* 759-348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>

91. Ratbi, I., Génin, E., Legendre, M., Le Floch, A., Costa, C., Cherkaoui-Deqqaqi, S., Goossens, M., Sefiani, A., Girodon, E., **2008**. Cystic fibrosis carrier frequency and estimated prevalence of the disease in Morocco. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 7, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2007.12.006>
92. Reen, F.J., Mooij, M.J., Holcombe, L.J., McSweeney, C.M., McGlacken, G.P., Morrissey, J.P., O’Gara, F., **2011**. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 413–428. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01121.x>
93. Renders, N., Belkum, A. van, Barth, A., Goessens, W., Mouton, J., Verbrugh, H., **1996**. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: phenotyping versus genotyping. *Clin. Microbiol. Infect.* 1, 261–265. [https://doi.org/10.1016/S1198-743X\(15\)60285-3](https://doi.org/10.1016/S1198-743X(15)60285-3)
94. Repetto, T., Mergni, G., Zuffo, S., Elgheriani, N., Ettumi, K., **2011**. 380 Cystic fibrosis in Libya: the experience of an international collaboration project. *J. Cyst. Fibros.* 1, 9-7. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(11\)60392-5](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(11)60392-5)
95. Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., **2004**. Cell Viability Assays. *Assay guidance manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
96. Rodrigues, M.E., Lopes, S.P., Pereira, C.R., Azevedo, N.F., Lourenço, A., Henriques, M., Pereira, M.O., **2017**. Polymicrobial Ventilator-Associated Pneumonia: Fighting In Vitro *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* Biofilms with Antifungal-Antibacterial Combination Therapy. *PloS One.* 12, 170-433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170433>
97. Rumbaugh, K.P., Sauer, K., **2020**. Biofilm dispersion. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
98. Saadh, M.J., Lohrasbi, A., Ghasemian, E., Hashemian, M., Etemad, A., Dargahi, Z., Kaviar, V.H., **2022**. The Status of Carbapenem Resistance in Cystic Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Yale J. Biol. Med.* 95, 495–506.



99. Sajjan, U., Thanassoulis, G., Cherapanov, V., Lu, A., Sjolín, C., Steer, B., Wu, Y.J., Rotstein, O.D., Kent, G., McKerlie, C., Forstner, J., Downey, G.P., **2001**. Enhanced susceptibility to pulmonary infection with *Burkholderia cepacia* in Cftr(-/-) mice. *Infect. Immun.* 69, 5138–5150. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5138-5150.2001>
100. Sass, G., Marsh, J.J., Shrestha, P., Sabino, R., Stevens, D.A., **2022**. Synergy Between *Pseudomonas aeruginosa* Filtrates And Voriconazole Against *Aspergillus fumigatus* Biofilm Is Less for Mucoid Isolates From Persons With Cystic Fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 817-315. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.817315>
101. Schwarz, C., Bouchara, J.-P., Buzina, W., Chrenkova, V., Dmeńska, H., de la Pedrosa, E.G.G., Cantón, R., Fiscarelli, E., Le Govic, Y., Kondori, N., Matos, T., Romanowska, E., Ziesing, S., Sedlacek, L., **2018a**. Organization of Patient Management and Fungal Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia.* 183, 7–19. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0205-x>
102. Schwarz, C., Hartl, D., Eickmeier, O., Hector, A., Benden, C., Durieu, I., Sole, A., Gartner, S., Milla, C.E., Barry, P.J., **2018b**. Progress in Definition, Prevention and Treatment of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia.* 183, 21–32. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0182-0>
103. Seddiki, S.M.L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Kunkel, D., **2015**. Fungal infectivities of implanted catheters due to *Candida* sp. Biofilms formation and resistance. *J. Mycol. Medicale.* 25, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.003>
104. Sediki, F.Z., Radoui, A., Cabet, F., Zemani-Fodil, F., Saidi-Mehtar, N., Boudjema, A., **2014**. Detection of CFTR mutations using PCR/ARMS in a sample of Algerian population. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 72, 549–554. <https://doi.org/10.1684/abc.2014.0989>
105. Sherrard, L.J., Tai, A.S., Wee, B.A., Ramsay, K.A., Kidd, T.J., Ben Zakour, N.L., Whiley, D.M., Beatson, S.A., Bell, S.C., **2017**. Within-host whole genome analysis

- of an antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain sub-type in cystic fibrosis. *PLoS ONE*. 12, 172-179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172179>
106. Sousa, A.M., Pereira, M.O., **2014**. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. *Pathog. Basel Switz*. 3, 680–703. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030680>
107. Spoonhower, K.A., Davis, P.B., **2016**. Epidemiology of Cystic Fibrosis. *Clin. Chest Med. Cystic Fibrosis*. 37, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.10.002>
108. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., **2000**. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 40, 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
109. Syrmis, M.W., O'Carroll, M.R., Sloots, T.P., Coulter, C., Wainwright, C.E., Bell, S.C., Nissen, M.D., **2004**. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J. Med. Microbiol.* 53, 1089–1096. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45611-0>
110. Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., Graninger, W., Presterl, E., **2009**. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 271–274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp429>
111. Touil, H.F.Z., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., **2018**. In vitro activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in an intensive care department. *J. Mycol. Medicale*. 28, 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.06.008>
112. Valentin, A., Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G., **2007**. In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. *Rev. Iberoam. Micol.* 24, 272–277. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(07\)70055-4](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(07)70055-4)
113. Van Houdt, R., Michiels, C.W., **2005**. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005>

114. Van Stormbroek, B., Zampoli, M., Morrow, B.M., **2019**. Nebulized gentamicin in combination with systemic antibiotics for eradicating early *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 54, 393–398. <https://doi.org/10.1002/ppul.24254>
115. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., **1991**. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831.
116. 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*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 660–665. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.06.009>
117. Westwater, C., Balish, E., Schofield, D.A., **2005**. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot. Cell.* 4, 1654–1661. <https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1654-1661.2005>
118. Wongsuk, T., Pumeesat, P., Luplertlop, N., **2016**. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 56, 440–447. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500759>
119. Yousfi, H., Ranque, S., Rolain, J.-M., Bittar, F., **2019**. In vitro polymyxin activity against clinical multidrug-resistant fungi. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 8, 66. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0521-7>
120. Yu, Q., Griffin, E.F., Moreau-Marquis, S., Schwartzman, J.D., Stanton, B.A., O'Toole, G.A., **2012**. In vitro evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived human airway epithelial cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2673–2681. <https://doi.org/10.1093/jac/dks296>
121. Ziesing, S., Suerbaum, S., Sedlacek, L., **2016**. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Med. Mycol.* 54, 781–786. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw035>

---

# **Annexes**

---

# Annexe N°1

## QUESTIONNAIRE POUR L'ENQUETE SUR LA MUCOVISCIDOSE

### IDENTIFICATION

---

Nom :

Prénom :

Sexe :  ♂  ♀

Date de naissance :

Lieu de naissance :

Adresse : Wilaya :

Numéro de téléphone :

Consanguinité des parents :

Nombre d'enfants dans la fratrie :

Nombre d'enfants atteints de mucoviscidose :

Décès dans la fratrie :

Antécédents familiaux de mucoviscidose :

/c'est qui ? :

Age au début des symptômes (année et mois) :

Age de diagnostic de la maladie (année et mois) :

Age au moment du diagnostic (année et mois) :

Age d'hospitalisation dans le service (année et mois) :

Niveau intellectuel des parents :

Niveau socio-économique :

### SYMPTOMES

---

#### Atteinte respiratoire et ORL

- Toux chronique.
- Encombrement bronchique
- Respiration sifflante, asthme
- Broncho-pneumopathies sévères ou récidivantes
- Sinusite chronique symptomatique
- Polyposes naso-sinusiennes

FEV1 (Forced Expiratory Volume) :

/Saturation Pulsée en O2 (SpO2) :

#### Atteinte digestive :

- Diarrhée chronique/stéatorrhée/malabsorption
- Syndrome d'obstruction intestinale distale
- Douleur abdominale
- Prolapsus rectal
- Hépatopathie chronique
- Diabète
- Coup de chaleur avec déshydratation hyponatrémique

## Annexe N°1

### Statut nutritionnel :

- Anorexie
- Retard de croissance/malnutrition

Alimentation :  Normale  Hypercalorique  Hyperprotidique

Niveau d'Activité physique :  Très actif  Actif  Faiblement actif  Sédentaire

### DONNEES A L'ADMISSION

---

Date :

Motif d'hospitalisation :

Poids du patient (DS) :

Taille du patient (DS) :

Rapport P/T (%) :

Indice de masse corporelle :

Atteinte respiratoire symptomatique :  oui ou  Non

Atteinte digestive symptomatique :  oui ou  Non

SaO<sub>2</sub>

### BILAN HEMATOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

---

FNS : GB : /mm<sup>3</sup>, Hb : g/dL, plq : /mm<sup>3</sup>

CRP :

Hémostase : TP %, TCK sec

Biochimie : Glycémie à g/L, Urée g/L, créatinine mg/L, protides g/L, albumine

Bilan hépatique : ASAT : UI/L, ALAT : UI/L.

Ionogramme sanguin : Na + mmol/L, K + mmol/L

### BILAN RADIOLOGIQUE

---

- TDM thoracique : dilatation des bronches
- EFR : VEMS (en % de la valeur théorique)
  - CVF (en % de la valeur théorique)
  - VEMS / CVF (%)
- Echo cœur : HTAP
- TDM des sinus : Pansinusite

### DIAGNOSTIC

---

- Teste de sueur : / Date : /Lieu :  
Technique : / Poids de la sueur (mg) : / Valeur (mmol/l) :
- Genetique : / Date : /Lieu :  
/ Mutation 1 : / Mutation 2:

### TRAITEMENT

---

- Kinésithérapie respiratoire :
- Aérosolthérapie au long cours (≥ 3 mois)
  - Sérum salé hypertonique
  - Antibiotiques inhalés
  - Corticoïdes inhalés
- Oxygénothérapie et ventilation au long cours (≥ 3 mois) :

## Annexe N°1

- Extraits pancréatiques
- Vitamines liposolubles
- Supplémentation orale au long cours ( $\geq 3$  mois)
- Nutrition entérale au long cours ( $\geq 3$  mois)
- Acide ursodesoxycolique
- Vaccinations *contre la grippe*.

### MICROBIOLOGIE

---

ECBC à l'inclusion

- Statut Vis-à-vis Pseudomonas :  Absence,  Primo-infection,  Colonisation intermittente,  
 Colonisation chronique

Nombre d'ECBC réalisés dans l'année :

ECBC 1 :

ECBC 2 :

ECBC 3 :

ECBC 4 :

Dernier ECBC

### EVOLUTION DE LA MALADIE

---

Suivi

Décédé

Age de décès en année

Nb d'hospitalisations

Dernier Poids [DS]

Dernière Taille [DS]

Dernier Poids / poids idéal pour la taille

Dernier Indice de corpulence

- Atteinte respiratoire symptomatique
- Déformation thoracique- Hippocratisme digital
- Atteinte digestive symptomatique
- Intolérance au glucose- Diabète
- Un hippocratisme digital
- Prise en charge psychologique
- Dépression
- Intervention chirurgicale /Type de chirurgie :
- Transplantation /Type de greffe :

## ملخص:

يُعتبر التليف الكيسي مرضًا نادرًا في الجزائر، والبيانات السريرية والديموغرافية غير مكتملة بسبب عدم وجود سجل طبي وطني. لهذا السبب، أجرينا هذه الدراسة على جزأين. الجزء الأول هو دراسة متعددة الجوانب لوصف مرضى التليف الكيسي في غرب الجزائر. والجزء الثاني مخصص للبحث عن الاصابات البكتيرية متعددة الميكروبات *C. albicans* / البكتيريا سالبة الجرام في مخاط القصبات الهوائية لهؤلاء المرضى. أظهرت النتائج أنه من بين 34 طفلاً (16 لداً و 18 بنتاً) مصابين بالتليف الكيسي تمت متابعتهم في مستشفى وهران للصحة النفسية المدرجين في هذه الدراسة، تم تشخيص 15 طفلاً فقط قبل سن 6 أشهر. وكان جميع المرضى يعانون من أعراض تنفسية وهضمية، و 33 منهم يعانون من احتقان القصبات الهوائية، و 10 منهم يعانون من التهاب القصبات الهوائية الحاد و 4 منهم يعانون من الربو. بالإضافة إلى ذلك، كان 25 طفلاً يعانون من وضع اجتماعي واقتصادي منخفض أو متوسط، و 18 طفلاً لم يكن لديهم ضمان اجتماعي. توفي ثلاثة مرضى بمتوسط عمر 9 سنوات بسبب قصور في الجهاز التنفسي. بالإضافة إلى ذلك، في الفترة الممتدة من أبريل 2019 إلى مارس 2020، من إجمالي 67 عينة من مخاط القصبات الهوائية، كانت 64 عينة إيجابية، مما يعطي نسبة اصابات 98%. بلغت نسبة الاصابات المختلطة 80%، منها 51% بسبب الخمائر والبكتيريا، منها 27% بسبب *Candida albicans* والبكتيريا سالبة الجرام، التي تهيم عليها *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

تم تحديد أربع ارتباطات بين *Candida albicans* / البكتيريا سالبة الجرام. تعايشت *C. albicans* مع بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* في ثلاثة اتحادات، ومع بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* وبكتيريا *Achromobacter xylosoxidans* في اتحاد واحد. في الوضع البلاكتوني، جميع سلالات *C. albicans* حساسة للأموفوتريسين B وفوريكونازول. في المقابل، كانت سلالات *P. aeruginosa* و *A. xylosoxidans* مقاومة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها (سيفتازيديم، إيميبينيم، أميكاسين، جنتاميسين، سيبروفلوكساسين وكوليسيتين). بالإضافة إلى ذلك، شكلت جميع السلالات المختبرة أغشية حيوية أحادية ومتعددة الأنواع في المختبر. كانت معدلات SCMs أعلى بما يصل إلى 128 مرة من معدلات CMIs. وأظهر علاج الأغشية الحيوية بمزيج من مضادات الفطريات والمضادات الحيوية تفاعلات تآزرية وغير متباينة مع انخفاض كبير في SCMs. كما أثبت محلول ملحي مفرط التوتر بنسبة 7% فعاليته في تثبيط الأغشية الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** التليف الكيسي، دراسة متعددة المراكز، *Candida albicans/ Pseudomonas aeruginosa*، تثبيط الأغشية الحيوية المختلطة، تركيبات مضادات الميكروبات، غرب الجزائر.

## Résumé :

La mucoviscidose est considérée comme étant une maladie rare en Algérie et les données cliniques et démographiques sont incomplètes en raison de l'absence d'un registre médical national. C'est pourquoi, nous avons entrepris ce travail qui a porté sur deux volets. Le premier consiste à faire une étude multicentrique visant à caractériser la population atteinte de mucoviscidose dans l'ouest algérien. Le deuxième volet, est consacré à la recherche des altérations polymicrobiennes *C. albicans*/bactéries à Gram négatifs dans les mucus bronchiques de ces patients.

Les résultats obtenus ont montré que sur les 34 enfants, dont 16 garçons et 18 filles, atteints de mucoviscidose suivis à l'EHS d'Oran inclus dans cette étude, 15 seulement ont été diagnostiqués avant l'âge de 6 mois. Tous les patients présentent des manifestations respiratoires et digestives, 33 un encombrement bronchique, 10 une bronchopneumonie sévère et 4 sont asthmatiques.

De plus, 25 enfants sont d'un niveau socio-économique faible à intermédiaire et 18 n'ont pas de couverture sociale. Trois patients sont décédés à un âge moyen de 9 ans à cause d'une insuffisance respiratoire.

Par ailleurs, d'avril 2019 à mars 2020, sur un total de 67 mucus bronchiques prélevés, 64 se sont révélés positifs, soit un taux d'altération de 98%. Les altérations mixtes représentent 80%, avec 51% causées par des levures et des bactéries dont 27% sont altérés par *Candida albicans* et des bactéries Gram négatives, dominées par *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

Quatre associations de *Candida albicans*/bactéries à Gram négatif sont identifiées. *C. albicans* cohabite avec *P. aeruginosa* dans trois associations et avec *P. aeruginosa* et *Achromobacter xylosoxidans* dans une association.

En mode planctonique, toutes les souches de *C. albicans* sont sensibles à l'amphotéricine B et au voriconazole. En revanche, les souches de *P. aeruginosa* et d'*A. xylosoxidans* sont résistantes à tous les antibiotiques testés (la ceftazidime, l'imipénème, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et la colistine). Par ailleurs, toutes les souches testées sont formatrices de biofilms mono et multi-espèces *in vitro*. En mode sessile, les SCMs sont jusqu'à 128 fois plus élevées que les CMIs. Le traitement des biofilms par des combinaisons d'antifongiques et d'antibiotiques a montré des interactions de type synergique et d'indifférente avec une réduction significative des SCMs. La solution saline hypertonique à 7% s'est montré également efficace pour l'inhibition des biofilms.

**Mots clés :** Mucoviscidose, étude multicentrique, *Candida albicans/ Pseudomonas aeruginosa*, inhibition biofilms mixtes, combinaisons d'antimicrobiens, ouest Algérien

## Abstract:

Cystic fibrosis is considered a rare disease in Algeria, and clinical and demographic data are incomplete due to the absence of a national medical registry. For this reason, we undertook this work, which has two parts. The first part is a multicenter study to characterize the population affected by cystic fibrosis in western Algeria. The second part focuses on investigating polymicrobial alterations of *C. albicans*/Gram-negative bacteria in the bronchial mucus of these patients.

Results showed that of the 34 children (16 boys and 18 girls) with cystic fibrosis followed at the Oran EHS included in this study, only 15 were diagnosed before the age of 6 months. All patients presented with respiratory and digestive manifestations, 33 with bronchial congestion, 10 with severe bronchopneumonia and 4 with asthma. In addition, 25 children were of low to intermediate socio-economic status, and 18 had no social security coverage. Three patients died at an average age of 9 years from respiratory failure.

Furthermore, from April 2019 to March 2020, out of a total of 67 bronchial mucus samples, 64 were positive, representing a 98% alteration rate. Mixed alterations accounted for 80%, with 51% caused by yeasts and bacteria, of which 27% were altered by *Candida albicans* and Gram negative bacteria, dominated by *Pseudomonas aeruginosa* (50%).

Four *Candida albicans*/Gram-negative bacteria associations have been identified. *C. albicans* cohabits with *P. aeruginosa* in three associations, and with *P. aeruginosa* and *Achromobacter xylosoxidans* in one association.

In planktonic mode, all *C. albicans* strains are sensitive to amphotericin B and voriconazole. In contrast, *P. aeruginosa* and *A. xylosoxidans* strains were resistant to all the antibiotics tested (ceftazidime, imipenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and colistin). In addition, all the strains tested form single and multi-species biofilms *in vitro*. In sessile mode, SCMs are up to 128 times higher than MICs. Treatment of biofilms with combinations of antifungals and antibiotics showed synergistic and indifferent interactions with a significant reduction in SCMs. Hypertonic saline at 7% was also shown to be effective in inhibiting biofilms.

**Key words:** Cystic fibrosis, multicenter study, *Candida albicans/ Pseudomonas aeruginosa*, mixed biofilm inhibition, antimicrobial combinations, western Algeria



