



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



Université Aboubekr-BELKAÏD-Tlemcen

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

Département de Biologie

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

Mémoire

Présenté par

M^{lle} Bouabdallah Amani

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Contribution à l'étude d'une collection de souches cliniques de levures *Candida albicans*

Soutenu le 19 septembre 2024, devant le jury composé de

Dr. Mezouar Dounia

Présidente

Université de Tlemcen

Dr. Kazi Tani-Baba Ahmed Zahira Zakia

Promoteur

Université de Tlemcen

Dr. Aissaoui Mohammed

Examineur

Université de Tamarrasset

Année universitaire 2023/2024

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Allah.

À ma chère maman, aucun mot ne pourra jamais rendre compte de l'immensité de mon amour pour toi. Ton encouragement et ton amour inconditionnels ont été les véritables piliers de ma réussite.

À mon cher père, je te remercie sincèrement d'avoir été à mes côtés tout au long de mes études. Je suis ici aujourd'hui grâce à ton soutien constant.

À ma sœur adorée « Maissaa », tu es une source inestimable de joie. Merci infiniment pour ta présence. Que Dieu t'accorde le bonheur et la réussite que tu mérites.

Bouabdallah Amani

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon encadreur Madame **Kazi Tani – Baba Ahmed Zahira Zakia**, Maître de conférences classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr-BELKAÏD-Tlemcen. Son encadrement rigoureux, sa patience contagieuse, sa grande disponibilité et ses conseils avisés ont été une véritable source de motivation pour réaliser ce mémoire.*

*Je remercie également vivement Mademoiselle **Mezouar Dounia**, Maître de conférences classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr-BELKAÏD-Tlemcen. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait l'honneur de présider le jury lors de ma soutenance.*

*Je remercie également Monsieur **Aissaoui Mohammed**, Maître de conférences classe B au faculté des sciences et technologies, Université Tamanrasset, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier toutes les techniciennes du laboratoire « **Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique** » de l'université Aboubekr-BELKAÏD-Tlemcen.*

Mes sincères remerciements à l'ensemble des professeurs pour leurs enseignements durant mon cursus universitaire.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو التعرف في البداية على مجموعة من سلالات *Candida* المعزولة من تجويف الفم لدى الأطفال الذين يعانون من نقص المناعة، والتابعة لمختبر "مضادات الفطريات: الفيزيوكيميائية، التركيب والنشاط البيولوجي"، وثانياً دراسة قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية في المختبر بالإضافة إلى ملامح مقاومتها للمضادات الفطرية. مكنت نتائج تحديد الهوية من تعيين جميع السلالات المدروسة إلى جنس *Candida albicans*. أظهرت دراسة الحساسية للمضادات الفطرية، بعد 24 ساعة من الحضارة عند 35 درجة مئوية، أن جميع السلالات كانت حساسة للأمفوتيري سين ب، حيث تراوح التركيز المتوسط بين 0.25 ميكروغرام/مل إلى 0.5 ميكروغرام/مل. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع السلالات أيضاً حساسية للكاسبوفونجين، حيث تراوح التركيز المتوسط بين 0.03 ميكروغرام/مل إلى 0.25 ميكروغرام/مل. أظهر القياس الكمي للكتلة الحيوية للأغشية الحيوية أن جميع سلالات *Candida albicans* المدروسة قادرة على تكوين أغشية حيوية في المختبر.

الكلمات المفتاحية : التجويف الفموي - *Candida albicans* - الأغشية الحيوية

Résumé

L'objectif de ce travail était d'identifier dans un premier temps une collection de souches de *Candida* isolées de la cavité buccale d'enfants immunodéprimés, appartenant au laboratoire « Antifongiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » et étudier dans un second temps, leurs capacités à former des biofilms *in vitro* ainsi que leurs profils de résistance aux antifongiques. Les résultats d'identification a permis d'assigner l'ensemble des souches étudiées au genre espèce *Candida albicans*. L'étude de la sensibilité aux antifongiques, après 24 heures d'incubation à 35°C, a révélé que toutes les souches étaient sensibles à l'amphotéricine B, avec des CMI variant de 0,25 µg/mL à 0,5 µg/mL. De plus, toutes les souches ont également montré une sensibilité à la caspofungine, avec des CMI de 0,03 µg/mL à 0,25 µg/mL. La quantification de la biomasse des biofilms a montré que toutes les souches de *Candida albicans* étudiées sont capables de former des biofilms *in vitro*.

Mots clés : cavité buccale, *Candida albicans*, biofilm

Summary

The objective of this work was to initially identify a collection of *Candida* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised children, belonging to the laboratory "Antifungals: Physico-Chemistry, Synthesis, and Biological Activity," and to subsequently study their ability to form biofilms *in vitro* as well as their antifungal resistance profiles. The identification results assigned all the studied strains to the species *Candida albicans*. The antifungal susceptibility study, after 24 hours of incubation at 35°C, revealed that all strains were sensitive to amphotericin B, with minimum inhibitory concentrations (MIC) ranging from 0.25 µg/mL to 0.5 µg/mL. Furthermore, all strains also showed sensitivity to caspofungin, with MIC values from 0.03 µg/mL to 0.25 µg/mL. The quantification of biofilm biomass showed that all studied strains of *Candida albicans* are capable of forming biofilms *in vitro*.

Keyword : oral cavity - *Candida albicans*- biofilms

Liste des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CLSI : *Clinical Laboratory Standards Institute*

DO : *Densité optique*

PBS : *phosphate-Buffered Saline*

RPMI : *Rowell Park Memorial Institute*

RAT : Rice Agar Tween

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Listes des figures

Figure 1. Formes morphologiques distinctes de <i>Candida albicans</i> (Whiteway et coll., 2007).....	2
Figure 2. Micrographies électroniques à balayage de biofilms de <i>Candida albicans</i> (Douglas,2003).....	4
Figure 3. Phases de formation du biofilm de <i>Candida albicans</i> (Talapko et coll., 2021).....	5
Figure N°4. CMI de l'amphotéricine B et caspofungine des souches de <i>Candida albicans</i> étudiées.....	12
Figure N°5. Biomasses des biofilms mono-espèce formés <i>in vitro</i> par les souches de <i>Candida albicans</i> étudiées.....	14

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	7
1. Souches étudiées.....	7
2. Identification des souches.....	7
3.1. Croissance sur CHROM-Agar™ <i>Candida</i>	7
2.2. Test de RAT.....	7
2.3. Test de blastèse (test de germination).....	7
2.4. Galerie API <i>Candida</i>	7
3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des cellules planctoniques	8
3.1. Préparation d'inoculum.....	8
3.2. Préparation d'antifongiques amphotéricine B et caspofungine.....	8
3.3. Détermination de CMI	8
4. Evaluation de la capacité des souches à former des biofilms.....	8
4.1. Préparation de l'inoculum.....	9
4.2. Formation des biofilms <i>in vitro</i>	9
4.3. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet...9	
Troisième partie : Résultats et discussion	11
1. Identification des souches.....	12
2. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricineB et de la Caspofungine vis-à-vis des souches de <i>Candida albicans</i> étudiées.....	12
3. Biomasses des biofilms formés <i>in vitro</i> par les souches de <i>Candida albicans</i> étudiées.....	13
Quatrième partie : Conclusion	16
Sixième partie : Références bibliographiques	18

Première partie

Synthèse bibliographique

La cavité buccale est un habitat naturel qui abrite plus de 700 espèces microbiennes différentes **(Paster et coll., 2005)**

Candida appartient au microbiote oral normal vivant sur la langue, les gencives, le palais et la salive d'individus sains sous forme de levures commensales mais sa colonisation peut provoquer des infections buccales ou oropharyngées **(Lortholar et coll., 2012)**.

Le genre *Candida* regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture **(Bretagne, 2005)**.

Les mycoses buccales sont extrêmement fréquentes, habituellement dues à la prolifération de l'espèce *Candida albicans* lorsque les conditions locales deviennent favorables à sa croissance. Les candidoses buccales ont le plus souvent une évolution bénigne et répondent bien aux traitements antifongiques locaux. Cependant, dans certaines situations d'immunodépression locale ou générale, l'infection peut évoluer sous une forme étendue, chronique et parfois systémique **(Agbo et Guedj, 2005)**

Candida albicans est une levure unicellulaire à paroi mince, sans capsule, de forme ovale à ronde, avec un ensemble de chromosomes diploïdes. Le génome diploïde de *Candida albicans* est constitué de 16 chromosomes **(Salomon et coll., 2004)**. Elle est dimorphique, pouvant exister sous deux formes blastospores ovales ou sous forme de pseudohyphes. Ce champignon possède des hyphes septés, mais peut également se présenter sous forme de levure **(Dowd, 2014)**.

La forme hyphale joue un rôle clé dans le processus d'infection et peut favoriser la pénétration des tissus et l'échappement aux cellules immunitaires **(Yang Lu et coll., 2014)**

Candida albicans se multiplie par bourgeonnement latéral **(Figure 1)**. Ce dernier se produit soit à côté de la cicatrice du bourgeon du cycle cellulaire précédent, soit à l'extrémité opposée de la cellule à partir de laquelle le bourgeon précédent s'est formé **(Sudbery et coll., 2004)**.

La figure 1 représente les formes morphologiques distinctes de *Candida albicans*. Dans la croissance sous forme de levure, une blastospore bourgeonne d'une nouvelle cellule et donne naissance à deux cellules distinctes (**Malcolm et Bachewich, 2007**)

La première division nucléaire se produit à travers le col du bourgeon mère dans les pseudohyphes et la levure, alors que dans les hyphes le noyau migre hors de la cellule mère et se divise à l'intérieur du tube germinatif. L'initiation du tube germinal a lieu avant le début du cycle cellulaire marqué par la duplication du corps du pôle du fuseau et la synthèse de l'ADN (**sudbery et coll., 2004**).

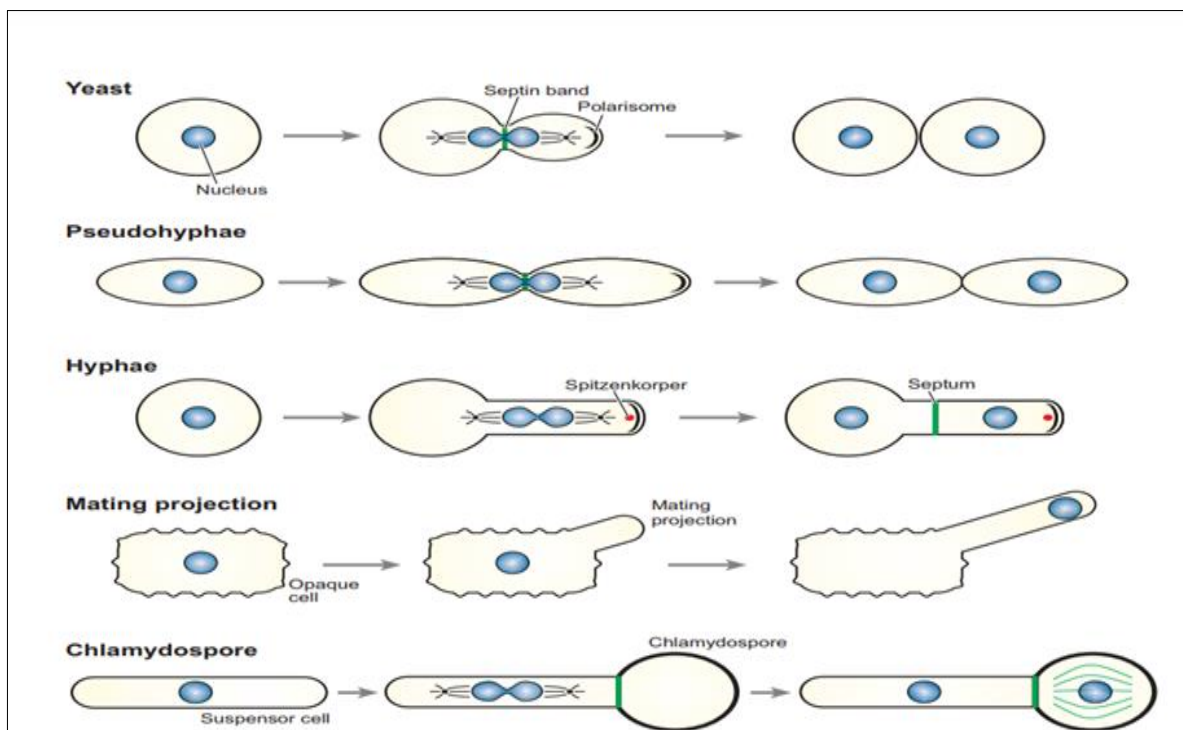


Figure 1. Formes morphologiques distinctes de *Candida albicans* (**Whiteway et coll., 2007**)

Lorsque *Candida albicans* est présent chez l'hôte, il se bat avec d'autres micro-organismes résidents pour obtenir les nutriments disponibles. Il doit également survivre à différentes températures, pH et stress environnementaux, en particulier lorsqu'il rencontre des cellules du système immunitaire. Chez les individus immunodéprimés, ou en cas de déséquilibre de la flore commensale et

d'augmentation des conditions prédisposantes, *Candida albicans* peut devenir un pathogène opportuniste **(Ifeanyi Elibe Mba, 2022)**.

Candida albicans utilise plusieurs gènes dont l'expression est requise pour la virulence **(Richard et William, 2001)**. L'un des facteurs les plus importants est le changement de phénotype. La forme levure est nécessaire à l'expansion clonale tandis que la forme hyphes invasive est nécessaire à la virulence **(Sudbery et coll., 2004)**.

Candida albicans se caractérise par sa capacité à modifier l'hydrophobie de la surface cellulaire, par exemple en modifiant la concentration et la longueur des fibrilles. Il en résulte une meilleure adhésion de l'organisme aux cellules de l'hôte et une meilleure agglutination des cellules lors de la formation de lésions **(Glee, 1995)**

En raison des modifications de la paroi cellulaire au cours de la croissance des hyphes et de la sécrétion d'enzymes lytiques telles que les protéases, les lipases et les phospholipases, les hyphes sont mieux équipés pour pénétrer dans les cellules de l'hôte **(Mayer et coll., 2013)**.

Les exoenzymes, telles que l'aspartyl protéinase sécrétée (SAP) et les phospholipases, dégradent les immunoglobulines et les protéines de la matrice extracellulaire, inhibent la phagocytose par les neutrophiles polymorphonucléaires et induisent des réactions inflammatoires **(Hube et Naglik, 2001)**

Les protéines de liaison au fibrinogène à la surface des cellules de *Candida albicans* lui permettent de se lier aux thrombocytes et de se rendre ainsi invisible aux mécanismes de défense de l'hôte **(Salomon et coll., 2004)**.

Un autre facteur de virulence est lié à l'acquisition du fer qui est un nutriment essentiel pour de nombreux micro-organismes et son absorption peut jouer un rôle particulier dans la promotion des infections **(Ramanan et Wang, 2000)**.

Les perturbations d'équilibre par exemple des variations de l'environnement local (modifications du pH ou changements nutritionnels), l'utilisation d'antibiotiques ou d'altérations du système immunitaire (causées par une infection ou un traitement immunosuppresseur) peuvent permettre à *Candida albicans* de proliférer rapidement et de provoquer une infection **(Fox et Nobile, 2013)**.

La majorité des maladies causées par ce pathogène sont associées à la formation de biofilms sur les surfaces de l'hôte ou des surfaces abiotiques (**Mathe et Van Dijck, 2013**). Le biofilm agit comme un réservoir de cellules pathogènes. Il est très résistant aux médicaments et au système immunitaire de l'hôte et peut être à l'origine de maladies graves (**Megha et Clarissa, 2016**).

Candida albicans forme des biofilms très structurés composés de plusieurs types de cellules (cellules rondes en forme de levure bourgeonnante, cellules pseudohyphales ovales et cellules hyphales allongées) encastées dans une matrice extracellulaire (**Figure 2**) (**Chandra et coll., 2001**).

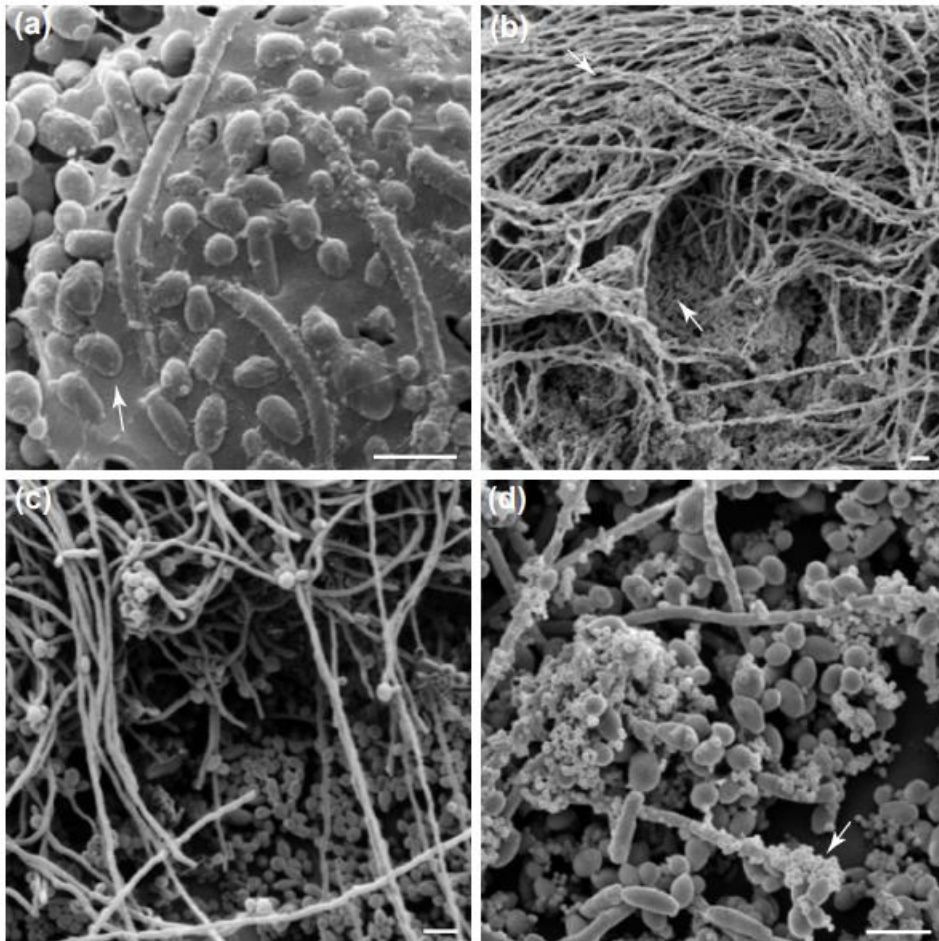


Figure 2. Micrographies électroniques à balayage de biofilms de *Candida albicans* (a) Biofilm mince formé dans des conditions d'écoulement sur un filtre en acétate. (b) Biofilm formé sur un disque de cathéter en PVC. (c) Biofilm formé sur un disque de cathéter en PVC. (d) Biofilm mixte de *Candida albicans* et *Staphylococcus* formé sur un disque de cathéter en PVC (**Douglas, 2003**)

La formation commence par l'adhésion de cellules de levure rondes à une surface solide. Celle-ci est la conséquence de modifications écologiques qui permettent la multiplication des cellules pour la formation de biofilms **(Bretagne, 2005)**

L'étape suivante du développement du biofilm consiste en une prolifération cellulaire et un début de filamentation des cellules adhérentes. Cette étape est suivie par la maturation du biofilm, qui aboutit à un réseau complexe de plusieurs couches de cellules polymorphes, des cellules hyphales, pseudohyphes et des cellules rondes de levure, enveloppées dans une matrice extracellulaire, ce qui donne au biofilm un aspect épais et structuré et lui confère une protection contre les lésions chimiques et physiques **(Douglas, 2003)**.

Un biofilm mature se forme généralement au bout de 24 heures et peut être visualisé à l'œil au-dessus de la surface solide, et au microscope comme une collection organisée de différents types de cellules. L'étape finale est appelée étape de dispersion, au cours de laquelle certaines cellules rondes de levure se dispersent du biofilm pour ensemençer de nouveaux sites **(Figure 3) (Megha et Clarissa, 2016)**

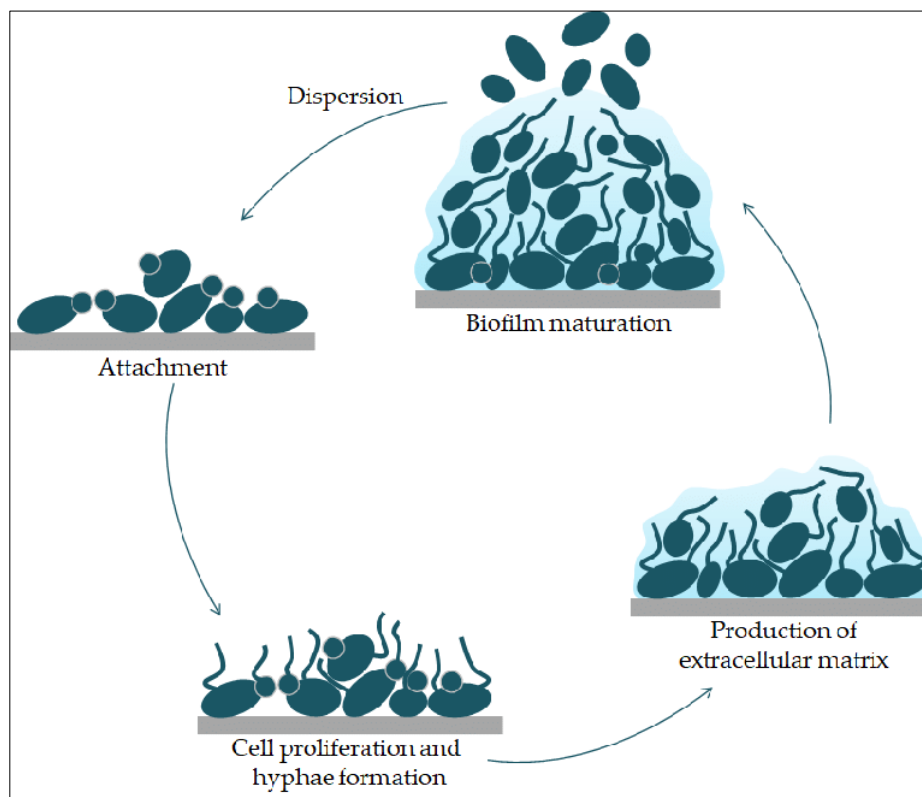


Figure 3. Phases de formation du biofilm de *Candida albicans* **(Talapko et coll., 2021)**

Deuxième partie

Matériel et méthodes

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

1. Souches étudiées

Nous avons utilisé une collection souches de *Candida albicans* isolées de cavité buccale d'enfants immunodéprimés. Ces souches sont entretenues par repiquage régulier et conservées à 4°C au laboratoire LapSab.

2. Identification des souches

L'identification des souches est réalisée par croissance sur CHROM-Agar™ *Candida*, par test de Blastèse ou test de filamentation des levures dans le sérum humain, la recherche de chlamydospores sur milieu RAT et Galerie API *Candida*.

2.1. Croissance sur CHROM-Agar™ *Candida*

Le CHROM-Agar Ident® est un milieu de culture sélectif utilisé pour l'isolement et la différenciation des espèces *Candida* à partir de cultures mixtes en se basant sur la coloration et morphologie des colonies. *Candida albicans* s'identifie par des colonies vertes. Des boîtes de Pétri contenant le milieu CHROM-Agar Ident® sont ensemencées par stries, puis incubé à 35°C pendant 48h (**de Jong et coll., 2021**)

2.2. Test de RAT

Une colonie provenant d'une pré-culture de 24heures est ensemencée par stries sur un milieu RAT (Riz, Tween80, Agar) incliné en tube. Une pique centrale en profondeur est réalisée. Les tubes sont incubés pendant 48h à une température de 28°C. Ensuite, une observation microscopique est réalisée (**Marcos Arias et coll., 2009**).

2.3. Test de blastèse (test de germination)

La souche à tester est ensemencée dans 1mL de sérum humain puis incubée à 35°C pendant 3-4 heures. Une observation au microscope optique (Grossissementx40) d'une goutte de cette suspension placée entre lame et lamelle est réalisée pour rechercher la présence de tubes germinatifs (**Chabasse et coll., 2010**).

2.4. Galerie API *Candida*

A partir d'une culture levurienne jeune de 18 à 24 heures, l'inoculum est ajusté à une concentration cellulaire de 10⁶ cellules/mL. Celui-ci est reparti dans chacune des

cupules de la galerie. Pour créer l'anaérobiose, de l'huile de paraffine est ajoutée dans les 5 premières cupules plus la dernière.

La galerie ainsi préparée est placée dans une étuve à 35°C pendant 18 à 24 heures. Les virages de couleur dans les cupules se traduisent par l'établissement d'un code à 4 chiffres pour chaque souche. L'identification se fait à l'aide du tableau d'identification fourni avec les galeries

3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des cellules planctoniques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées par la technique de microdilution selon les recommandations du *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI M27-A3, 2008)*. Le milieu utilisé est le Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) tamponné à pH 7 par l'acide morpholine propanesulfonic (MOPS).

3.1. Préparation d'inoculum

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

3.2. Préparation d'antifongiques amphotéricine B et caspofungine

Les solutions mères d'antifongiques sont préparées en solubilisant l'amphotéricine B dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la caspofungine dans l'eau distillée stérile. Les concentrations finales en antifongiques dans chaque puits sont comprises entre 0,06 et 16 μ g/mL pour l'amphotéricine B et 0,03 à 8 μ g/mL pour la caspofungine.

3.3. Détermination de CMI

Dans des microplaques à 96puits, 100 μ l d'inoculum sont introduits auxquels sont ajoutés 100 μ l de la solution d'amphotéricine B. En parallèle, 50 μ l d'inoculum sont introduits auxquels sont ajoutés 150 μ l de la solution caspofungine. Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures. Les CMI sont déterminées à l'œil nu pour l'amphotéricine B et par dénombrement des cellules viables sur cellule de Thoma pour caspofungine.

4. Evaluation de la capacité des souches à former des biofilms

La quantification de la biomasse de biofilm *Candida albicans* est effectuée par technique de coloration au Crystal violet décrit par **Christensen et coll., (1985)**.

4.1. Préparation de l'inoculum

Les souches de *Candida albicans* étudiées sont utilisées pour préparer des pré-cultures dans le milieu sabouraud liquide et incubées à 35°C pendant 24h. La suspension est centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé (PBS) à pH 7,4 et une concentration de 10mM. La concentration de l'inoculum est ajustée à 10^6 cellule/ml dans le milieu *Roswill Park Memorial Institute* (RPMI)

4.2. Formation des biofilms *in vitro*

Cent μ l de l'inoculum à 10^6 cellule/mL est repartis dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits. Le dernier puits contient le milieu RPMI seul et sert de témoin négatif et le premier puits contient l'inoculum seul et sert de témoin positif. Ensuite, la plaque est scellée puis mise à incuber à 35°C pendant 24 heures.

4.3. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet

Le cristal violet se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement, tels que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de matrice exopolymérique des biofilms (**Li et coll., 2003**).

Après la formation de biofilms de 24 heures, les puits sont lavés avec le PBS (pH7,4 10 mM) pour éliminer les cellules planctoniques et/ou les cellules non adhérentes. Pour la fixation des cellules adhérentes, 100 μ l de méthanol sont ajoutés aux différents puits de la microplaque puis mis à incuber pendant 15min à température ambiante. Les biofilms formés par l'adhérence sont colorés avec 100 μ l de cristal violet pendant 20min. L'excès de colorant est ensuite rincé par l'eau et la microplaque est ensuite remplie avec 150 μ l d'acide acétique (33%) pour libérer la coloration de cristal violet. La densité optique est lue à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (**BiochromAsys UVM340**).

Le niveau de formation des biofilms de *Candida albicans* sont classés selon les valeurs de l'absorbances décrit par **Marcos zambrano et coll., (2014)**

- Souche fortement formatrice de biofilms, $DO > 1.17$

- Souche modérément formatrice de biofilms, $0.44 < DO < 1.17$
- Souche faiblement formatrice de biofilms, $DO < 0.44$

Troisième partie

Résultats et discussion

1. Identification des souches

Le présent travail a porté sur une collection de 7 souches de levures *Candida* isolées de la cavité buccale d'enfants immunodéprimés et conservées au laboratoire LapSab.

La revification des souches suivie d'une identification par croissance sur milieu Chrom-Agartm *Candida*, test de blastèse, test de RAT et galerie API *Candida* a permis d'assigner toutes les souches au genre espèce *Candida albicans*.

Candida albicans est le principal agent causal de la candidose buccale. Il représente jusqu'à 95 % des cas (**Karzan et coll., 2023**). Il peut coloniser pratiquement tous les sites des muqueuses de la cavité orale (**Marie Laurent et coll., 2011**). Il est le plus souvent associée à la stomatite sous-prothétique (**Carlos Madrid et coll., 2013**). *Candida albicans* prolifère rapidement dans des environnements acides riches en glucides et amidon. Une hygiène buccodentaire insuffisante, constituent des facteurs de risque pour la mycose buccale (**Pacorel, 2015**).

2. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la Caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida albicans* étudiées

Les résultats relatifs aux concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la caspofungine vis-à-vis des souches de *Candida albicans* étudiées après 24 heures d'incubations à 35°C sont représentées sur la **figure N°4**.

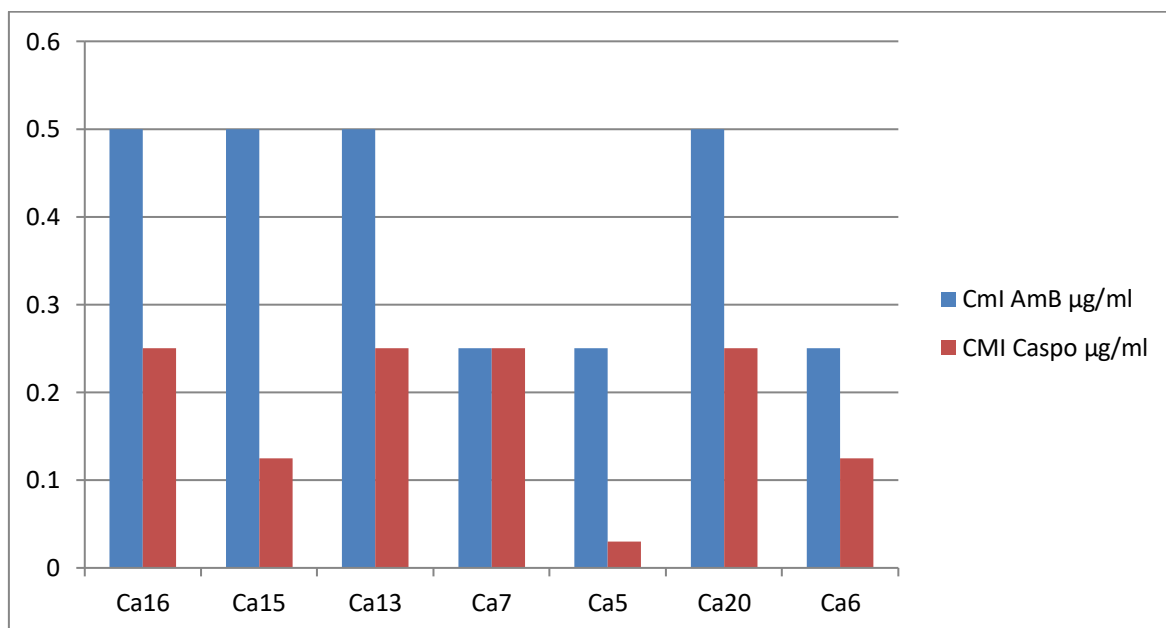


Figure N°4. CMI de l'amphotéricine B et caspofungine des souches de *Candida albicans* étudiées

Les résultats obtenus montrent que les CMI de l'amphotéricine B sont égal à 0,25 µg/mL pour les souches Ca5, Ca6 et Ca7 et à 0,5 µg/mL pour les souches Ca16, Ca15, Ca13 et Ca20. Selon les critères du ***Clinical Laboratory Standard Institute (2008)***, ces souches sont catégorisées sensibles à l'amphotéricine B.

Les résultats de CMI de caspofungine varient de 0,03µg/mL à 0,25µg/mL pour les 7 souches. Selon les critères du ***Clinical Laboratory Standard Institute (2008)***, ces souches sont catégorisées sensibles à la caspofungine.

Volpato Sanità et ses collaborateurs (2013) ont montré que tous les isolats cliniques de *Candida albicans* isolés de la cavité buccale étaient sensibles à l'amphotéricine B et à la caspofungine.

La résistance à l'amphotéricine B est très rare chez les *Candida albicans* (**Scorzoni et coll., 2017**). Une étude rapportée par **Lúcia Bosco et ses collaborateurs (2003)** ont montré que 23,1 % des *Candida albicans* isolées de la cavité buccale d'enfants atteints du sida étaient résistantes à l'amphotéricine B, tandis que 76.9% étaient sensibles à l'amphotéricine B.

Une étude menée par **Meriam Bouchekoua et ses collaborateurs (2017)** ont trouvés une souche de *Candida albicans* buccal résistante à la caspofungine.

3. Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les souches de *Candida albicans* étudiées

Les résultats relatifs à la quantification des biomasses des biofilms formés *in vitro* par les levures de *Candida albicans* étudiées après 24heures d'incubations à 35°C sont présentés sur la **Figure N°5**.

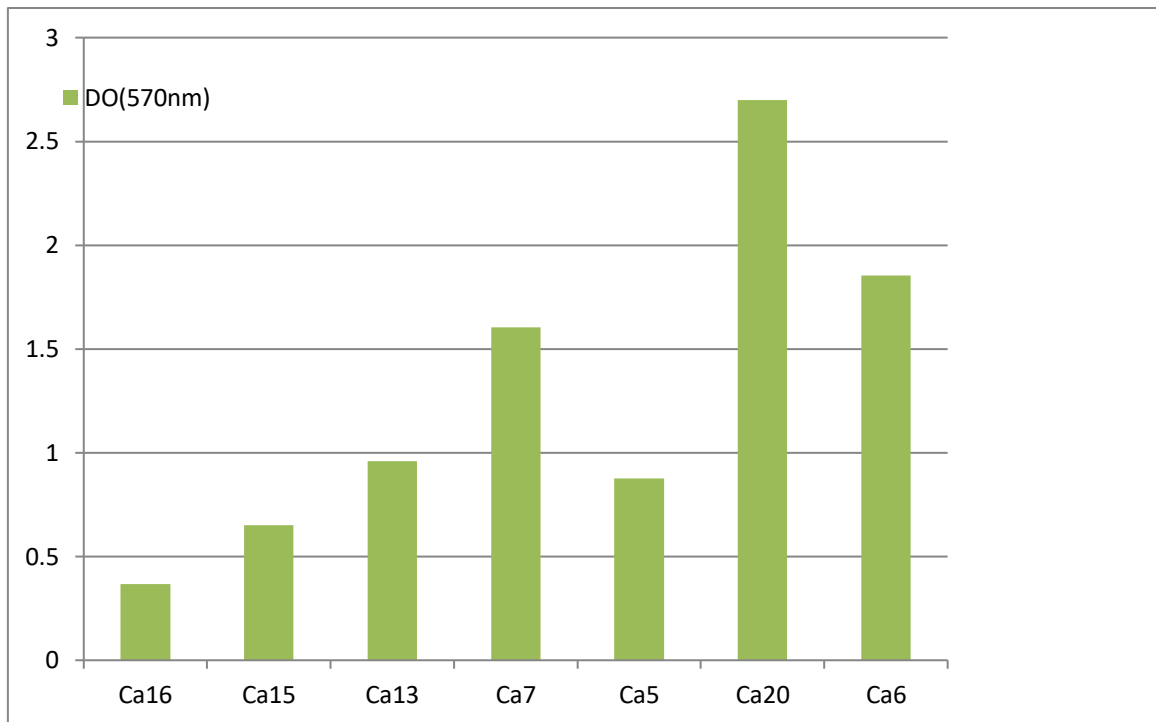


Figure N°5. Biomasses des biofilms mono-espèce formés *in vitro* par les souches de *Candida albicans* étudiées

Les densités optiques des biofilms formés après 24 heures d'incubation à 35° par les souches de *Candida albicans* étudiées varient de 0,366 à 2,698.

Selon les intervalles fixés par **Marcos-zambrano et ses collaborateurs (2014)**, nous remarquons que les souches de *Candida albicans* (Ca7, Ca20 et Ca6) sont fortement formatrices de biofilms et 3 souches (Ca15, Ca13 et Ca5) sont modérément formatrices et 1 souche (Ca16) est faiblement formatrice du biofilm.

Une étude de **Sanchez Vargas et ses collaborateurs (2013)** rapporte que *Candida albicans* buccal a été associé à une production forte et modérée de biofilms entre 6 et 24 heures de développement.

Les résultats de l'étude menée par **Seghir et ses collaborateurs (2015)** sur des souches de *Candida albicans* isolées du CHU de Tlemcen montrent que la quantité des biofilms formés varie en fonction des souches de *Candida albicans*.

Quatrième partie

Conclusion

Candida albicans est l'espèce la plus fréquemment isolée de la cavité buccale. L'objectif de ce travail était d'identifier dans un premier temps une collection de souches de *Candida* isolées de la cavité buccale d'enfants immunodéprimés, et dans un second temps, d'étudier leurs capacités à former *in vitro* des biofilms ainsi que leurs profils de résistance aux antifongiques.

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

- Toutes les souches étudiées étaient assignées au genre espèce *Candida albicans*.
- Les concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la caspofungine obtenus ont montré que les souches de *Candida albicans* étaient sensibles à ces deux antifongiques.
- Trois souches de *Candida albicans* avaient un fort potentiel à former les biofilms albicans (Ca7, Ca20 et Ca6), 3 souches étaient catégorisées moyennement formatrices de biofilms (Ca15, Ca13 et Ca5) et 1 souche (Ca16) faiblement formatrice de biofilms.

En perspective, il serait intéressant de

- Elargir le panel des souches à étudier
- Etudier les facteurs de virulence et les gènes de résistance aux antifongiques par les techniques de biologie moléculaire
- Réaliser une étude épidémiologique sur la dissémination des levures *Candida albicans* dans les hôpitaux de l'ouest algérien.

Sixième partie

Références bibliographiques

1. Agbo-Godeau, S., & Guedj, A. (2005). Mycoses buccales / Oral mycosis. *EMC - Stomatologie*, 1(1), 30-41
2. Bretagne, S., & Develoux, M. (2005). Candidoses et levures diverses / Candidiasis and yeast infections. *EMC - Maladies Infectieuses*, 2, 119–139
3. Carlos Madrid., Abarca, M., Pop, S., & Bouferrache, K. (2013). La cavité buccale de retour dans le corps humain. *Forum Med Suisse*, 13(15), 293–297
4. Christensen, W. A., Simpson, J. J., Younger, L. M., Baddour, F. F., Barrett, D. M., & Melton, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6)
5. Chabasse, J.-P., Bouchara, P., & Rachieru-Sourisseau, P. (2010). *Acremonium strictum* fungaemia in a paediatric immunocompromised patient: Diagnosis and treatment difficulties. *Mycopathologia*, 170, 161–164
6. Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183, 5385–5394
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard—Third edition (M27-A3)*
8. De Jong, A. W., Dieleman, C., Carbia, M., Mohd Tap, R., & Hagen, F. (2021). Performance of two novel chromogenic media for the identification of multidrug-resistant *Candida auris* compared with other commercially available formulations. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(4), e03220-20
9. Dowd, F. J. (2014). *Candida albicans* infections. Dans Reference module in biomedical sciences (pp. 1-5). Elsevier

10. Fox, E. P., & Nobile, C. J. (2013). The role of *Candida albicans* biofilms in human disease. In *Candida albicans: Symptoms, causes and treatment options* (ISBN: 978-1-62808-882-3)
11. Glee, P. M., Sundstrom, P., & Hazen, K. C. (1995). Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infection and Immunity*, 63(4)
12. Hube, B., & Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: Resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 147, 1997–2005
13. Ifeanyi Elibe Mba , Nweze, E. I., Eze, E. A., & Anyaegbunam, Z. K. G. (2022). Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. *Infection, Genetics and Evolution*, 99, 105256.
14. Julia Douglas. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30–36
15. Karzan Abdulmuhsin Mohammad., Yashooa, R. K., & Mustafa, S. A. (2023). Incidence of *Candida* species biofilms in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy treatment. *BioMed*, 1(1), 18–23
16. Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353–362
17. Lortholary, O., Petrikkos, G., Akova, M., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S., Bassetti, M., Bille, J., Calandra, T., Castagnola, E., Cornely, O. A., Cuenca-Estrella, M., Donnelly, J. P., Garbino, J., Groll, A. H., Herbrecht, R., Hope, W. W., Jensen, H. E., Kullberg, B. J., Lass-Flörl, C., Meersseman, W., Richardson, M. D., Roilides, E., Verweij, P. E., Viscoli, C., & Ullmann, A. J. (2012). ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Patients with HIV infection or AIDS. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(Suppl 7), 68–77

18. Lúcia Bosco Vera., Birman, E. G., Cury, A. E., & Paula, C. R. (2003). Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: Exoenzyme production and antifungal resistance. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17(3), 217–222.
19. Marcos-Arias, C., López, J., Sahand, I. H., Eguia, A., De-Juan, A., Madariaga, L., Aguirre, J. M., Eraso, E., & Quindos, G. (2008). Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Archives of Oral Biology*, 54, 127–131
20. Marcos Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2014). Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1192–1198
21. Marie, L., Gogly, B., Tahmasebi, F., & Paillaud, E. (2011). Les candidoses oropharyngées des personnes âgées. *Gérontologie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillessement*, 9(1), 21–28
22. Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59, 251–264.
23. Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128
24. Megha Gulati., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: Development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310–321.
25. Meriam Bouchekoua ., Boudaouara, Y., Trabelsi, S., Aloui, D., Cheikhrouhou, S., & Khaled, S. (2017). Les levures isolées en milieu de réanimation : Typologie et profil de résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(3), e25–e26.

26. Pacorel, C. (2015). Santé bucco-dentaire du jeune enfant : Connaissances et pratiques des professionnels de santé de périnatalité (Thèse, Université de Lorraine, N°6778)
27. Paster, B. J., Aas, J. A., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11)
28. Ramanan Narendrakumar., & Wang, Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*, 288(5468), 1062–1064
29. Richard Calderone., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327–335
30. Salomon Siegfried., Felk, A., & Schiffer, W. (2004). Genomics of *Candida albicans*. In *International series* (Vol. 4). Fungal genomics
31. Sánchez-Vargas, L. O., Estrada-Barraza, D., Pozos-Guillén, A. J., & Rivas-Cáceres, R. (2013). Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of Oral Biology*, 58(10), 1318–1326
32. Scorzoni, L., de Paula e Silva, A. C., Marcos, C. M., Assato, P. A., De Melo, W. C., De Oliveira, H. C., & Fusco-Almeida, A. M. (2017). Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 36
33. Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Sari-Belkharroubi, L., & Anselme-Bertrand. (2015). Evaluation of mixed biofilm formation between *Candida albicans* and a variety of bacterial species isolated from peripheral catheters at Tlemcen CHU: First study in Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 123–129
34. Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7), 317–324

35. Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—The virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79
36. Volpato Sanitá, P., & Mima, E. G. de O. (2013). Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Medicine*, 116(5), 562–569
37. Whiteway, M., & Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, 61, 529–553
38. Yang, L., Su, C., & Liu, H. (2014). *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in Microbiology*, 22(xx), 1–8