

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE,  
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



LABORATOIRE :  
ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES : PHYSICO-CHIMIE, SYNTHÈSE ET  
ACTIVITE BIOLOGIQUE

THESE

Présentée

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie

Option: Biochimie

Par

*M<sup>r</sup> SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib*

Thème

---

# Evaluation de la formation des biofilms de *Candida* sp. isolées des dispositifs médicaux au CHU de Sidi Bel Abbès

---

Soutenue le 21 juin 2014

*Devant le jury :*

Président :	Boucherit Kebir	Professeur, Centre Universitaire de Naama
Directrice de thèse :	Boucherit-Otmani Zahia	Professeur, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Examineurs :	Hassaïne Hafida	Professeur, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
	Djeribi Riad	Professeur, Badji Mokhtar-Annaba
	Abdelouahed D.Eddine	Professeur, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
	Taleb Mourad	Maître de Conférences A, Univ. Djillali Liabes-Sidi Bel Abbès

**Année Universitaire : 2013 – 2014**

*Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans l'aide de DIEU,  
qu'il nous guide toujours vers son chemin droit.*

*Je dédie ce modeste travail :*

A mon grand-père qui m'a toujours soutenu lors des moments difficiles. Mille mercis pour tes prières et tes leçons de sagesse.

A mes parents qui étaient présents dans mes débuts incertains et dans mes moments de découragements. Ils ont su gérer mon stress sans jamais me faire part du leur. Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux.

A ma femme bien aimée, pour ses sacrifices et la confiance qu'elle me donne pour nos échanges si sincères. Qu'elle me pardonne mon manque de disponibilité et mes absences.

A ma famille. Que Dieu la garde et la bénisse

A mes amis, je pense aussi à tous ceux qui sont restés plus ou moins longtemps à mes côtés et qui ont rendu l'ambiance fort-sympathique, pour les bons moments passés ensemble et pour leur amitié.

**L'UNIVERS EST VASTE, ALORS TANS PIS POUR CEUX QUI NE  
TROUVENT POINT LEURS PLACES.**

*Mohammed SEDDIKI*

# Remerciements

Les travaux qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique. Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen

Ce travail, par son caractère pluridisciplinaire, a donné naissance à de nombreuses collaborations. La richesse scientifique, la disponibilité, la sympathie et l'intérêt de toutes les personnes impliquées me furent d'un grand support. Qu'elles soient ici remerciées.

Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement M<sup>me</sup> Boucherit-Otmani Zahia, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, Directrice du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique, qui m'a encadré tout au long de cette thèse, sans elle rien ne serait là aujourd'hui. Je la remercie également pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, pour ses conseils précieux et ses orientations scientifiques et surtout pour le plaisir qu'elle a su me faire découvrir et la patience nécessaire dans la recherche. Je lui adresse ma profonde reconnaissance. La réussite de ce travail ne saurait être possible sans le grand apport de sa part.

Je tiens à remercier vivement M<sup>r</sup> Boucherit Kebir, Professeur au Centre Universitaire de Naâma qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail. Je l'assure de ma profonde gratitude pour l'apport et le soutien que j'ai reçu de sa part. Je voudrais également le remercier pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse malgré ses multiples occupations.

Je voudrai remercier particulièrement M<sup>me</sup> Hassaïne Hafida, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen pour son aide, son soutien et sa disponibilité. Je lui exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait M<sup>r</sup> Djeribi Ryad, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba en acceptant de siéger parmi les membres de ce jury. Je vous prie de trouver ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également à M<sup>r</sup> Abdelouahed Djamel Eddine, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à M<sup>r</sup> Taleb Mourad, Maître de Conférences Classe A à la Faculté de Médecine de l'Université Djilali Liabes-Sidi Bel Abbès pour son accueil chaleureux dans son service et son aide. Je le remercie aussi pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je ne voudrais pas oublier de remercier M<sup>r</sup> Kunkel Dennis, Directeur du laboratoire «*Dennis Kunkel Microscopy, Inc. USA*» pour avoir accepté de réaliser une partie de ce travail, celle de la microscopie électronique à balayage. Je lui adresse un grand merci tout particulier.

Je ne serai jamais assez reconnaissant à l'égard de M<sup>r</sup> Ghannoum Afif Mahmoud, Directeur de Center for Medical Mycology, University Hospitals of Cleveland, and Department of Dermatology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour son aide et son soutien. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.

Le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation. Je souhaite remercier tous les intervenants directs ou non et plus particulièrement ceux qui m'ont encouragé et soutenu durant la réalisation de ce travail. Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire LAPSAB pour toutes leurs attentions, ainsi que pour les moments de détente et de sympathie que nous avons partagés ensemble.

Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel du Centre Hospitalier Universitaire de Sidi Bel Abbès pour leur accueil, leur soutien et leur gentillesse.

Merci enfin à tous ceux qui, de près ou de loin, se sont intéressés à mon travail et m'ont encouragé pendant ces dernières années. Même si ce fut bref, ce fut plaisant.

## ملخص

تمثل العدوى المكتسبة في المستشفيات و المرتبطة باستعمال مختلف الأجهزة الطبية مثل القسطرات (cathéters) أحد أهم الأسباب المؤدية للإصابات الخطيرة خاصة الفطرية مثل *Candida sp.* رغم هذا لا توجد في الوقت الراهن أي طريقة تسمح بالكشف و التفريق بين مجرد الإصابة الفطرية و العدوى المرتبطة بالقسطرات، بالأخص إذا كانت الإصابة مضاعفة بتشكيل الأغشية الحيوية (Biofilms) على سطح القسطرة. في هذا السياق، قمنا بهذه الدراسة في المركز الاستشفائي بسبيدي بلعباس، بحيث عزلنا 37 وحدة من سلالات *Candida sp.* من مختلف القسطرات مباشرة بعد نزعها من المرضى (*Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*). بعد ذلك قمنا بدراسة مختلف الإصابات و العدوى المتعلقة بهذا النوع من الأجهزة بصدد التفريق و المقارنة بينها عن طريق تكييف تقنية Brun-buisson المخصصة لدراسة البكتيريا حيث تم رصد ثلاثة أنواع منها. بالمقابل، تبين أن مصلحة العناية المركزة و مصلحة الجراحة احلتا المراكز الأولى من حيث عدد الإصابات. لاحقاً تم التحقق من قدرة 31 من سلالات *Candida sp.* المعزولة سابقاً على تشكيل الأغشية الحيوية و تحققتنا أيضاً من مقاومتها للمضادات الفطرية (امفوتريسين ب و فلوكونازول). أخيراً، عابنا بنية الأغشية الحيوية الناشئة على سطح القسطرات بالمسح الإلكتروني المجهرية.

**الكلمات المفتاحية:** *Candida sp.*، قسطرة، إصابة فطرية، عدوى فطرية، أغشية حيوية، المجهر الإلكتروني الماسح.

## RESUME

*Candida sp.* est une levure pathogène opportuniste responsable de plus de 75% de mycoses invasives. Ces infections sont souvent liées aux dispositifs médicaux tels que les cathéters qui favorisent la formation des biofilms à leurs surfaces. Ils représentent une niche où les cellules de *Candida sp.* échappent aux défenses immunitaires de l'hôte ainsi qu'aux traitements antifongiques. La distinction entre une simple contamination et une infection du cathéter est primordiale pour une meilleure prise en charge de ces mycoses. Malheureusement, actuellement il n'existe pas de techniques rapides et fiables pour ces études. Dans ce contexte nous avons entrepris ce travail au CHU de Sidi Bel Abbès qui a porté sur l'évaluation des différents types d'infektivités fongiques des cathéters (contamination, colonisation et infection), l'identification des espèces fongiques en causes et la détermination du potentiel des souches isolées à former des biofilms par des tests de sensibilité à l'amphotéricine B et au fluconazole. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la technique modifiée de Brun-buisson semble être fiable, reproductible et rapide. Trois types d'infektivités fongiques des cathéters sont recensées, les contaminations qui occupent le premier rang suivies des colonisations et enfin, les infections. Par ailleurs, sur 457 prélèvements, 37 souches de *Candida sp.* sont isolées et trois espèces sont identifiées, *Candida glabrata*, *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*. Nous remarquons que c'est une espèce non-albicans en l'occurrence *C. glabrata* qui est dominante. 31 souches sont capables de former les biofilms, l'imagerie électronique à balayage (MEB) montre clairement leur structure tridimensionnelle sur les faces internes et externes des cathéters. En revanche, une réponse insignifiante des biofilms à l'amphotéricine B et au fluconazole est observée. Elle est trente deux (32) fois plus élevée vis-à-vis de l'amphotéricine B et cent vingt huit (128) fois vis-à-vis du fluconazole.

**Mots clés :** *Candida sp.*, cathéters, infectivité fongique, résistance, biofilms, MEB.

## SUMMARY

The hospital can be considered as an ecosystem where the patient is in contact with the microbial world and faces the risk of contracting an infection that is termed the nosocomial. Some opportunist pathogens yeasts parts of this universe, *Candida sp.* is responsible for more than 75% of systemic fungal infections. These infections are primarily related to medical devices such as catheters that promote the formation of biofilms. That structures set up a nidus for disease because is not easily amenable to conventional antifungal therapy. The diagnosis of catheter-related candidiasis is difficult; however, the differentiation between catheter infection and a simple contamination is essential to establish an antifungal treatment. Though, the methodology used for this type of studies is that of Brun-Buisson (1987); however, it was examining catheters alterations caused by bacteria. So, we wanted to adapte this method to evaluate the various alterations types of catheters (contaminations, colonization and infections) and their corresponding rates, as well as the responsible yeast species. In this context we conducted our study between February 2011 and January 2012 at the Hospital University Center of Sidi Bel Abbès, which is to assess the various types of infectivity of catheters (contamination, colonization, or infection) and their corresponding rates, as well as the responsible yeast species. Then, to check their power to form biofilms and to test their resistance against amphotericin B and fluconazol. From 457 samples, 37 strains of *Candida sp.* were isolated, nevertheless 31 were able to form biofilms, in addition *C. glabrata* was dominant. In the other hand, the electronic imaging clearly shows their three-dimensional structure on the internal and external surfaces of catheters. It appears from this study that the antifungal tests show clearly that sessile cells of *Candida sp.* were much more resistant than their planktonic counterparts (thirty two (32) times higher towards AmB and one hundred twenty eight (128) times to fluconazole). Moreover, images of electron microscopy performed in the laboratory "Dennis Kunkel Microscopy, Inc." shows the formation of biofilms on the internal surfaces of catheters.

**Keywords :** *Candida sp.*, catheters, fungal infectivity, resistance, biofilms, scanning electron microscopy.

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b>	<b>4</b>
1. <i>Candida</i> sp : caractères morphologiques et habitat	5
2. Espèces pathogènes de <i>Candida</i> sp	7
2.1. <i>Candida albicans</i>	7
2.2. <i>Candida glabrata</i>	7
2.3. <i>Candida parapsilosis</i>	8
3. Infections à <i>Candida</i> sp	8
3.1. Candidoses liées aux cathéters	9
3.2. Voies de contamination des cathéters	9
3.2.1. Voie extraluminale	9
3.2.2. Voie intraluminale	9
3.2.3. Voie hématogène	10
4. Types d'altérations fongiques des cathéters	10
4.1. Contamination	10
4.2. Colonisation	11
4.3. Infection	11
5. Mode de vie en biofilm	11
6. Impact médical du biofilm candidal	12
7. Phases de formation des biofilms de <i>Candida</i> sp	13
7.1. Phase d'adhésion	15
7.2. Phase intermédiaire	16
7.3. Phase de maturation	16
8. Architecture des biofilms de <i>Candida</i> sp	17
9. Quorum sensing	19
10. Résistance des biofilms de <i>Candida</i> sp	19
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b>	<b>23</b>
1. Prélèvements	24
2. Détermination des types d'altérations des cathéters	24
3. Isolement, purification et identification	26
3.1. Test de blastèse (test de germination)	26
3.2. Test de chlamydosporulation	26
3.3. Identification par les Galeries Api <i>Candida</i>	27
4. Evaluation de la capacité de <i>Candida</i> sp. à former des biofilms	27
4.1. Préparation des solutions mères des antifongiques	28
4.2. Préparation du XTT et de la ménadione	28

4.3.	Préparation des inocula	28
4.4.	Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	29
4.5.	Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles(SCMI)	29
4.5.1.	Formation des biofilms	30
4.5.2.	Tests antifongiques	30
4.5.3.	Test de réduction du tétrazolium	31
5.	Observation des biofilms au microscope électronique à balayage (MEB)	32
5.1.	Préparation des échantillons	32
<b>Troisième partie : Résultats et discussion</b>		<b>35</b>
1.	Détermination des types d'infectivités fongiques des cathéters	36
2.	Isolement et identification des levures de <i>Candida</i> sp	42
3.	Types d'infectivités selon les espèces identifiées	47
4.	Evaluation de la capacité de <i>Candida</i> sp. à former les biofilms	50
4.1.	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	51
4.2.	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI)	53
5.	Observation des biofilms au microscope électronique à balayage (MEB)	57
5.1.	Cathéter veineux central	57
5.2.	Cathéter veineux périphérique	60
5.3.	Etude d'un cas patient	64
<b>Quatrième partie : Conclusion Générale</b>		<b>65</b>
<b>Cinquième partie : Références bibliographiques</b>		<b>72</b>
<b>Sixième partie : Annexes</b>		
<b>Septième partie : Publications</b>		

## Liste des abréviations

**IN** : Infection Nosocomiale

**FLC** : fluconazole

**AmB** : Amphotéricine B

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**SCMI** : Sessile Concentration Minimale Inhibitrice

**NNISS** : National Nosocomial Infection Surveillance System

**CLSI**: Clinical and Laboratory Standards Institute

**ATCC** : American Type Culture Collection

**IP** : Institut Pasteur

**QS** : Quorum Sensing

**MEB** : Microscope Electronique à Balayage

**FESEM** : Field Emission Scanning Electron Mycroscopy

**PBS** : Phosphate Buffered Saline “ Tampon Phosphate Salé ”

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institut

## **Liste des tableaux**

**Tableau N° 1 :** Répartition des prélèvements par service et par type de cathéter

**Tableau N° 2 :** Taux et nombre des infectivités fongiques des cathéters au CHU de Sidi Bel Abbès

**Tableau N° 3 :** Nombre de prélèvements effectués et répartition des espèces de *Candida* sp. isolées dans chaque service du CHU de Sidi Bel Abbès

**Tableau N° 4 :** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B et du fluconazole vis-à-vis des souches de références et des souches isolées, selon le protocole de CLSI M27-A3 (2008)

**Tableau N° 5 :** SCMI de l'AmB et du FLC vis-à-vis des souches de références et des souches isolées selon le protocole de Pierce et coll., (2008)

## Liste des figures

**Figure N°1** : Morphologie de *Candida* sp. **(Thompson et coll., 2011)**

**Figure N°2** : Principales phases de formation des biofilms de *Candida albicans* sur une surface inerte (disques de cathéter) **(Chandra et coll., 2001a)**, avec l'imagerie électronique correspondante à chaque phase **(Ramage et coll., 2009)**

**Figure N°3** : Microscopie électronique à balayage d'une section transversale intérieure de la lumière d'un cathéter vasculaire, implanté chez un rat, contaminé par un biofilm de *C. albicans* d'une épaisseur supérieure à 200 µm (Grossissement x 1000) **(Nett et Andes, 2006)**

**Figure N° 4:** Microscopie électronique à balayage des biofilms matures (48 h) (A) *C. glabrata* (B) *C. parapsilosis* (Grossissement x 3000) **(Silva et coll., 2010)**

**Figure N° 5** : Représentation schématique des mécanismes de résistance des biofilms fongiques **(Ramage et coll., 2012)**

**Figure N° 6** : Différents types d'infectivités fongiques en fonction des types de cathéters utilisés au CHU de Sidi Bel Abbès

**Figure N° 7** : Taux des espèces de *Candida* sp. isolées de l'ensemble des services du CHU de Sidi Bel Abbès

**Figure N° 8** : Différents types d'infectivités fongiques des cathéters au CHU de Sidi Bel Abbès

**Figure N° 9** : Dendrogramme de similitude des différents types d'infectivités fongiques vis-à-vis des trois espèces isolées au CHU de Sidi Bel Abbès

## Liste des photos

**Photo N° 1 :** Microscopie électronique à balayage d'une coupe (A) longitudinale, (B) transversale d'un cathéter veineux central contaminé, dans sa face interne, par la souche *C. albicans* "RFKTC3". Temps de pose du cathéter est de 8 jours (Grossissement  $\times 35$ )

**Photo N° 2 :** MEB d'une mixture morphologique du biofilm mature de la souche *C. albicans* "RFKTC3" isolée du service de réanimation-anesthésie. Le biofilm est formé sur la face interne du cathéter veineux central (Grossissements A  $\times 450$ , B  $\times 1100$  et C  $\times 4500$ )

**Photo N° 3 :** MEB de (A) face externe d'un cathéter non colonisé, (B) phases précoces de la formation du biofilm de *C. albicans* "CFKT3" sur la face interne du même cathéter. Temps de pose du cathéter est de 3 jours (Grossissements A  $\times 15000$ , B  $\times 6000$ )

**Photo N° 4 :** Division cellulaire de *C. parapsilosis* "THKT2" et formation des micro-colonies sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique après un temps de pose de 4 jours (Grossissement  $\times 3000$ )

**Photo N° 5 :** MEB de la morphologie du biofilm de *C. glabrata* "RFKT1" développée sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique provenant du service de réanimation-anesthésie après un temps de pose de 2 jours (Grossissements  $\times 4500$ )

**Photo N° 6 :** MEB de la morphologie du biofilm de *C. albicans* "HFKT1" développé sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique provenant du service d'hématologie après un temps de pose de 5 jours (Grossissement  $\times 2000$ )

**Photo N° 7 :** Photographies de : (A) Face dorsale de la langue d'une patiente en réanimation-anesthésie recouverte par l'espèce *C. albicans* avec, à proximité, un cathéter oro-bronchique implanté et infecté par la même espèce. (B) Microscopie optique de *C. albicans* suite à l'écouvillonnage de la de la langue de la patiente (Grossissement  $\times 400$ )

**Photo N° 8 :** Microscopie électronique à balayage de : (A) orifice au niveau du cathéter oro-bronchique provenant du service de réanimation-anesthésie après un temps de pose de 3 jours, (B) biofilm mature de *C. albicans* attaché à la face interne du même cathéter (Grossissement, A :  $\times 60$ , B :  $\times 6000$ )

---

# ***INTRODUCTION***

L'utilisation des dispositifs médicaux en milieu hospitalier a connu un essor important au cours de ces dernières décennies. Pour diverses raisons, ils sont laissés en place pendant des durées variables, ce qui peut être à l'origine d'infections nosocomiales fongiques systémiques.

La conduite préconisée pour le traitement de ces mycoses invasives passe par l'ablation des cathéters. Malheureusement, si l'ablation d'un cathéter veineux périphérique ne pose généralement pas de problèmes, celle d'un cathéter veineux central n'est pas simple et la pose d'un nouveau cathéter représente un risque infectieux supplémentaire pour le patient.

Develoux et Bretagne en 2005, ont signalé que les progrès sont limités pour différencier colonisation et infection car peu de méthodes sont disponibles en routine pour permettre de conclure à la pathogénie des levures. Par conséquent, il est important de distinguer entre colonisation, contamination et infection des cathéters, et ce par une simple culture de l'extrémité distale du cathéter après son ablation (**Veyssier et coll., 1998**). En effet, les dispositifs médicaux peuvent servir de support pour l'adhésion des microorganismes d'où la formation des biofilms. Ces derniers, constituent une source permanente de microorganismes qui échappent, à la fois, aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antifongiques.

En 2009, une enquête de prévalence réalisée au Centre Hospitalo-Universitaire de Sid Bel Abbès par le service d'épidémiologie et de médecine préventive a montré que plus de deux tiers des infections nosocomiales sont liées à l'utilisation des cathéters. Cependant, cette étude n'a traité que le côté bactérien laissant dans l'ombre la part des levures dans ce type d'infections.

Devant cette problématique, il nous a semblé indispensable de rechercher et d'évaluer les infections fongiques liées aux cathéters au CHU de Sid Bel Abbès.

Pour cela nous avons adopté le plan de travail suivant :

- Récupérer les dispositifs médicaux des patients, directement après leur ablation.
- Déterminer les types d'altérations des cathéters (contamination, colonisation et infection) par la technique de Brun-Buisson et ses collaborateurs (1987) que nous avons adapté aux levures.
- Identifier les espèces fongiques en cause et évaluer le potentiel à former des biofilms par des tests de sensibilité à l'amphotéricine B et au fluconazole.

## *Introduction*

- Mettre en évidence l'architecture des biofilms des levures isolées par microscopie électronique à balayage des faces internes et externes des segments de cathéters prélevés.

***Première partie***

---

**Synthèse**  
**bibliographique**

Les infections opportunistes invasives d'origine fongique constituent une cause majeure de morbi-mortalité chez les patients immunodéprimés.

Les espèces de *Candida* sp. sont considérées comme étant les principaux agents pathogènes responsables de ces infections, en particulier chez les patients fragilisés **(Saghrouni et coll., 2011)**. Les manifestations cliniques des candidoses, tant systémiques que viscérales, sont dénuées de toute spécificité ce qui rend difficile leur diagnostic. De plus, l'utilisation importante des cathéters dans le milieu hospitalier place *Candida* sp. au troisième ou quatrième rang des agents responsables des infections nosocomiales **(Mermel et coll., 2011)**.

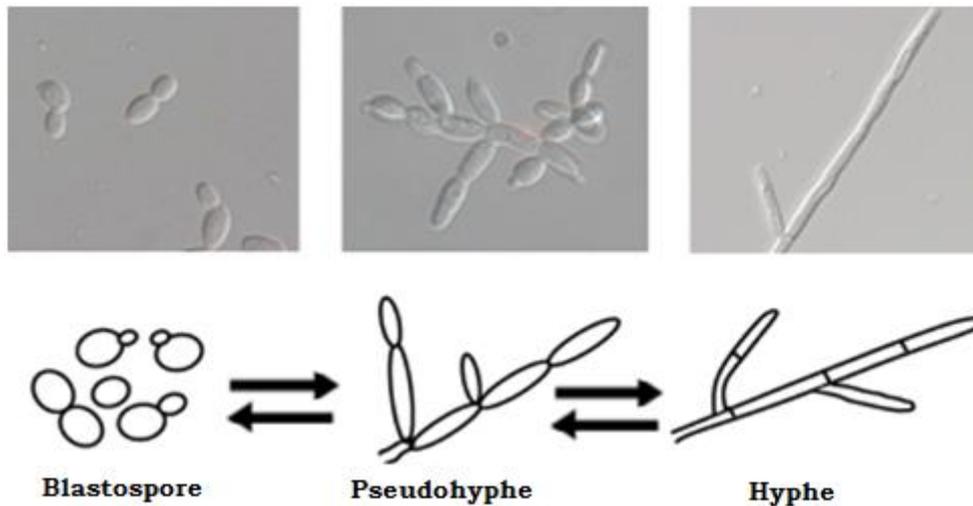
### **1. *Candida* sp : caractères morphologiques et habitat**

Les levures du genre *Candida* sont ubiquitaires fréquemment isolées dans l'environnement. Il s'agit d'organismes eucaryotes appartenant au règne des champignons et au phylum des Ascomycètes **(James et coll., 2006)**.

Ce sont des levures de petite taille de 2 à 5 µm par 3 à 7 µm, globulaires, ovoïdes ou cylindriques selon l'espèce, non pigmentées, non capsulées à bourgeonnement multilatéral productrices ou non de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture **(Fitzpatrick et coll., 2006)**.

*Candida* sp. est une levure commensale des muqueuses digestives et de la flore vaginale qui se reproduit par bourgeonnement de la blastospore donnant naissance à une blastospore fille **(LaFleur et coll., 2006)**.

*Candida* sp. peut avoir trois morphologies cellulaires distinctes, blastospore (forme levure), pseudohyphe et hyphe (forme filamenteuse) (Figure N°1).



**Figure N° 1:** Morphologie de *Candida* sp. (Thompson et coll., 2011).

La forme levure (blastospore) est constituée de cellules rondes qui se reproduisent par bourgeonnement.

À la suite de la division cellulaire, les cellules filles peuvent rester attachées les unes aux autres et former des chaînes plus ou moins ramifiées appelées pseudohyphes. Ces derniers correspondent à des cellules allongées séparées par des constriction aux jonctions septales en formant des chaînes. Les pseudohyphes se forment principalement lors d'une carence en acides aminés [(Odds, 1979) ; (Sudbery et coll., 2004) ; (Reiss et coll., 2012)]. En revanche, les hyphes ont généralement des formes cylindriques de côtés parallèles et sont uniformes en largeur. Ils sont séparés par des cloisons incomplètes assurant la continuité cytoplasmique (Odds, 1988).

Dans certaines conditions de culture, une autre forme peut être observée chez *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*, les chlamydospores. Se sont de grosses spores rondes ou ovales à paroi épaisse de 6 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre qui se forment sur les filaments mycéliens en position terminale des hyphes [(Nobil et coll., 2003) ; (Staib et Morschhauser, 2007)].

En termes d'agressivité, les blastospores sont adaptées à la dissémination des levures, alors que les formes filamenteuses sont susceptibles de favoriser l'invasion (Chauhan et coll., 2006).

## **2. Espèces pathogènes de *Candida* sp.**

En 2006, le nombre globale d'espèces identifiées était de 248, actuellement ce nombre dépasse les 350 espèces **[(Chabasse et coll., 2006) ; (Williams et coll., 2011)]**. Toutefois, seules quelques espèces de *Candida* sp. sont rencontrées en pathologie humaine, il s'agit essentiellement de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* et *Candida dubliniensis* **[(Guarro et coll., 1999) ; (Colombo et coll., 2003)]**.

Malgré la dominance de *Candida albicans*, les espèces non-*albicans*, notamment *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*, sont souvent isolées en milieu hospitalier **(Silva et coll., 2009)**.

### **2.1. *Candida albicans***

C'est une levure commensale des muqueuses digestives et vaginales. 50 à 70% des individus en bonne santé seraient porteurs de cette levure. Cependant, son caractère dimorphique tenace qui correspond à sa capacité de changer de forme (transition morphologique entre la forme levure et la forme hyphes), lui confère la particularité d'être l'espèce la plus virulente en provoquant des maladies superficielles et systémiques graves **[(Samaranayake et coll., 2005) ; (Irimés et coll., 2008)]**.

### **2.2. *Candida glabrata***

Elle a été décrite pour la première fois en 1895 par Berlese. Initialement, elle était appelée *Torulopsis glabrata*, c'est une levure saprophyte de la flore normale de l'homme. Malgré qu'elle soit incapable de produire des formes filamenteuses, elle est considérée comme agent opportuniste responsable de candidémies, d'infections de l'appareil urinaire et de candidoses profondes **[(Vandeputte et coll., 2008) ; (Ahmad et coll., (2014))]**.

### **2.3. *Candida parapsilosis***

Cette espèce est responsable d'infections cutanées et/ou profondes qui peuvent être d'origine endogène ou exogène généralement manuportées. Elle devient pathogène opportuniste lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont compromises ou l'équilibre de la microflore normale est perturbé **[(Trofa et coll., 2008) ; (Nagy et coll., 2011)]**.

### **3. Infections à *Candida* sp.**

Le spectre des candidoses est particulièrement étendu allant de la surinfection cutanée à l'infection disséminée qui représente le prototype de l'infection nosocomiale. Cette dernière constitue la conséquence des traitements médico-chirurgicaux de plus en plus spécialisés dispensés à l'hôpital chez des patients de plus en plus fragiles **(Develoux et Bretagne., 2005)**. En effet, *Candida* sp. est responsable de mycoses superficielles comme les candidoses cutanées ou urogénitales et digestives pouvant être à l'origine d'une dissémination profonde comme les septicémies et les candidoses viscérales **[(Gigou-Cornet, 2006) ; (Nucci et Anaissie, 2001) ; (Alangaden, 2011)]**.

La candidémie est la manifestation invasive des candidoses. Elle est considérée comme nosocomiale si elle survient 48 heures ou plus après l'admission à l'hôpital **(Gürçüoğlu et coll., 2010)**. Elle doit être évoquée lors de pic thermique ou plus exceptionnellement en cas d'hypothermie chez des patients sous antibiothérapie à large spectre **(Lewis et coll., 2002)**.

La candidurie, quant à elle, représente environ 40 % des infections nosocomiales. La majorité des candiduries sont asymptomatiques, transitoires et s'observent surtout chez les patients diabétiques ou porteurs chroniques de sondes. La présence des levures dans les urines peut être considérée comme premier signe de l'infection invasive **[(Avila-Aguero et coll., 2005) ; (Lavigne et Sotto, 2005)]**.

### **3.1. Candidoses liées aux cathéters**

Les cathéters sont des tubulures utilisés principalement pour entraîner un fluide physiologique (sang, urine, infusion, nutrition parentérale, médication...) dans le milieu intérieur du patient ou inversement. Ils sont susceptibles d'être altérés par des microorganismes fongiques appartenant au genre *Candida* sp. **[(Theaker, 2005) ; (Edgeworth, 2009)]**.

Les infections nosocomiales peuvent survenir à tout moment lors de l'utilisation des cathéters. Les levures du genre *Candida* peuvent coloniser l'extrémité du cathéter suivant des voies endogènes et/ou exogènes **[(Hot et coll., 2007) ; (Picazo et coll., 2008)]**.

### **3.2. Voies de contamination des cathéters**

Sur le plan physiopathologique, l'infection liée aux cathéters est précédée par la colonisation de son extrémité distale. Il est donc classique de définir trois voies de contamination des cathéters **(Safdar et Maki, 2004)**.

#### **3.2.1. Voie extraluminale**

Elle parvient au point d'entrée cutané du cathéter lors de son insertion. Les levures peuvent coloniser l'extrémité du cathéter, ce qui peut induire une colonisation sous-cutanée secondaire de ce dernier par migration des germes le long de son trajet sous-cutané **[(Kaltenbach et coll., 2002) ; (Eggimann et coll., 2004)]**.

Les levures proviennent soit de la propre flore cutanée du patient, soit d'une flore ayant colonisé sa peau, soit du personnel soignant **(Hot et coll., 2007)**.

#### **3.2.2. Voie intraluminale**

Elle survient lors des manipulations répétées des tubulures et de leurs raccords à l'occasion de divers branchements. Ce sont surtout les cathéters centraux de longue durée qui sont contaminés par cette voie, dite endoluminale ou intraluminale. L'importance de cette source de contamination explique mieux l'augmentation du risque infectieux lié au cathéter avec la durée de pose **[(Brun-Buisson et coll., 1994) ; (Reanis, 1999)]**.

### **3.2.3. Voie hématogène**

Elle est à l'origine des septicémies récurrentes. Elle est responsable de près de 15% des infections liées aux cathéters. La portion intravasculaire du cathéter est colonisée à partir d'un foyer infectieux à distance, en particulier lors de candidémies. Elle pourrait être facilitée par la présence, dans certains cas, de véritables thrombi distaux à l'extrémité du cathéter **[(Maartens et Wood, 1991) ; (Reanis, 1999)]**.

## **4. Types d'altérations fongiques des cathéters**

L'infection bactérienne d'un cathéter est associée à une culture positive de ce dernier avec un seuil de signification. Cette culture permet de différencier les infections des cathéters des simples colonisations ou contaminations, et d'apporter des informations utiles au clinicien pour guider son attitude pratique et thérapeutique **(Brun-buisson, 1994)**. Cependant, il n'existe pas de techniques fiables validées pour identifier une infection fongique du cathéter permettant de la distinguer d'une contamination ou d'une colonisation **(Walsh et Rex, 2002)**.

Le diagnostic d'une infection du cathéter est basé sur des critères cliniques et microbiologiques qui ont été décrits par Ryan et ses collaborateurs en 1974 puis adoptés par l'équipe de Brun-buisson en 1987 comme critères de référence **(Carrière et Marchandin, 2001)**.

Ces critères font appel à des manifestations cliniques locales (rougeur, chaleur, induration, douleur), des signes généraux d'infections (fièvre supérieure à 38°C, l'hypotension et la septicémie et à leur confrontation aux résultats microbiologiques qualitatifs et quantitatifs **(Domart et coll., 1991)**.

Par conséquent, trois types d'altérations des cathéters sont définis : la contamination, la colonisation et l'infection.

### **4.1. Contamination**

Elle se définit par une culture positive non significative de l'extrémité distale du cathéter en l'absence de signes locaux ou généraux d'infection. La culture quantitative de Brun-Buisson et coll., (1987) est inférieure à 10<sup>3</sup> UFC/mL **(Carrière et Marchandin, 2001)**.

#### **4.2. Colonisation**

Il s'agit d'une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter en l'absence de signes locaux ou généraux d'infection attribuables au cathéter. Le nombre de germe doit être  $\geq 10^3$  UFC/mL par la méthode quantitative de Brun-Buisson **(Mer, 2005)**.

L'ablation du cathéter ne change en rien l'évolution du syndrome infectieux, la colonisation pouvant provenir d'un foyer septique situé à distance **(Carrière et Marchandin, 2001)**.

#### **4.3. Infection**

L'infection liée au cathéter est définie par la présence d'un syndrome septique et d'une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter avec un seuil  $\geq 10^3$  UFC /mL en culture quantitative de Brun-Buisson. La disparition du syndrome infectieux fait suite au retrait du cathéter **(Carrière et Marchandin, 2001)**.

### **5. Mode de vie en biofilms**

La vie en mode biofilm a été définie en 1978 par Costerton et ses collaborateurs comme étant l'état de croissance sur surface. Par la suite, en 1981 un lien entre l'état de croissance sur une surface, la pathogénèse microbienne et l'infection humaine a été mis en évidence par ces mêmes auteurs.

Les biofilms sont définis comme étant des communautés microbiennes structurées fortement attachées à une surface et encastrées dans une matrice de substance exo-polymérique auto-synthétisée qui peut occuper jusqu'à 75% du volume du biofilm mature **[(Ghannoum et O'tool, 2004) ; (Monds et O'toole, 2008)]**. Le biofilm représente une source potentielle de diffusion de microorganismes **(Ramage et coll., (2014))**.

Actuellement, il est clair que la majorité des microorganismes, y compris les levures, sont capables d'alterner entre la croissance planctonique (libre en solution) et sessile (en biofilm). Les estimations suggèrent que jusqu'à 80 % de tous les microorganismes dans l'environnement existent dans des communautés structurées en biofilms **(Donlan, 2002)**. Selon Ghannoum et O'tool (2004), le biofilm est la forme d'existence microbienne la plus répandue

dans la nature. Il peut être causé par une seule espèce microbienne ou par un mélange d'espèces bactériennes et/ou fongiques **(Douglas, 2003)**.

Les infections sur cathéters sont souvent associées à la formation de biofilms constituants ainsi un problème majeur d'infections nosocomiales **[(Nett et coll., 2007) ; (Seneviratne et coll., 2009)]**.

## **6. Impact médical du biofilm candidal**

L'une des principales particularités liées à la virulence de *Candida* sp. est sa capacité d'adhérer aux surfaces et de former les biofilms **(Chatzimoschou et coll., 2008)**. Ces derniers jouent un rôle important en pathologie humaine et peuvent être à l'origine de mycoses systémiques graves **[(Martinez et Fries, 2010) ; (Muni et coll., 2012)]**.

Différentes espèces de *Candida* peuvent coloniser l'extrémité du cathéter et former des biofilms **(Yeater et coll., 2007)**. En effet, *Candida* sp. peut former des biofilms sur une variété de surfaces inertes et biologiques et sur presque tous les dispositifs médicaux invasifs **[(Li et coll., 2007) ; (Soll, 2008)]**.

Formé sur un matériel médical, le biofilm sert de réservoir et peut être la source d'une future candidémie. Les cellules qui se détachent des biofilms formés sur les dispositifs médicaux peuvent rejoindre la circulation sanguine et induire une nouvelle infection **(Uppuluri et coll., 2010)**.

Les biofilms constituent des niches protectrices pour les microorganismes qui se trouvent à l'abri des traitements antimicrobiens et des défenses immunitaires de l'hôte **[(Peeters et coll., 2008) ; (Soll, 2008)]**.

De plus, la sévérité de la pathologie sous-jacente, la durée d'exposition aux techniques invasives et l'immunodépression éventuelle représentent des facteurs de risque majeurs de ces infections, ce qui facilite la rencontre de *Candida* sp. avec des biomatériaux implantés et la plupart des surfaces d'accueil **(Ramage et coll., 2005)**.

**7. Phases de formation des biofilms de *Candida* sp.**

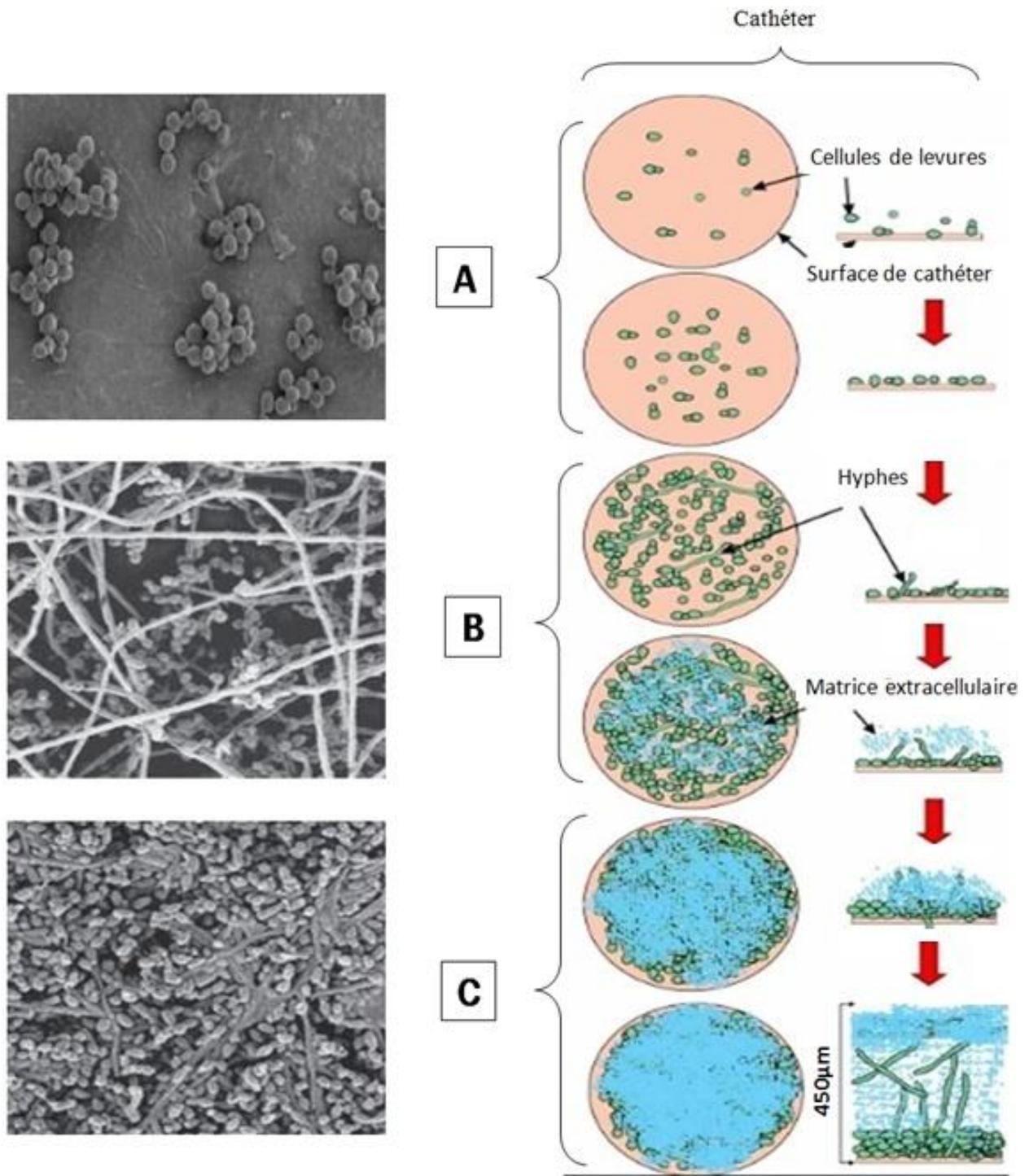
Les cellules de *Candida* sp. formatrices de biofilms présentent des propriétés phénotypiques totalement différentes de celles de leurs homologues planctoniques **[(Ernst et Rogers, 2005) ; (Al-Dhaheri et Douglas, 2008)]**.

En effet, en fonction de l'environnement, *Candida* sp. peut passer de la forme levure à la forme hyphes, c'est le phénomène de dimorphisme (phenotypic switching). La première forme assure la dispersion, alors que la seconde assure l'invasion. Cette tendance à induire la filamentation semble être un facteur de virulence en soi pour ces levures **[(Lo et coll., 1997) ; (Alem et coll., 2006) ; (Cate et coll., 2009)]**.

L'association entre ce phénomène de changement phénotypique et la virulence de cette espèce est un indicateur d'agressivité important dans les candidoses invasives **(Jones et coll., 1994)**.

Si les mécanismes moléculaires exacts impliqués dans la formation du biofilm diffèrent d'un organisme à un autre, les étapes de leur développement semblent être conservées au sein d'un large éventail de microorganismes **(O'toole, 2003)**.

Selon plusieurs auteurs, la formation des biofilms est un phénomène dynamique extrêmement complexe qui se déroule en trois phases principales selon une séquence bien établie, phase d'adhésion, phase intermédiaire et phase de maturation **[(Haras, 2005) ; (Nett et Andes, 2006)]** (Figure N° 2).



**Figure N° 2 :** Principales phases de formation des biofilms de *Candida albicans* sur une surface inerte (disques de cathéter) (Chandra et coll., 2001a), avec l'imagerie électronique correspondante à chaque phase (Ramage et coll., 2009).

**A :** Phase d'adhésion **B :** Phase intermédiaire **C :** Phase de maturation.

### **7.1. Phase d'adhésion**

Cette phase est extrêmement importante dans le processus de formation des biofilms. Elle est souvent citée comme la première étape du processus d'infection pour *Candida* sp. **(Soll, 2008)**.

Une grande variété de facteurs environnementaux contribuent à cette adhésion, à savoir la vitesse d'écoulement du milieu environnant (urine, sang, salive...), le pH, la température, la présence d'agents antimicrobiens et de substances polymériques et l'hydrophobicité de la surface **[(Baillie et Douglas, 2000) ; (Ramage et coll., 2002a)]**.

Le degré d'hydrophobicité et de rugosité des surfaces des cathéters contribuent de façon directe à l'adhésion des microorganismes **(Cuéllar-Cruz et coll., 2012)**.

*In vivo*, les matériaux des cathéters adsorbent rapidement les protéines de l'hôte. La surface colonisée est d'abord recouverte par un film conditionnant constitué essentiellement de protéines spécifiques souvent des fibrinogènes et des fibronectines **[(Douglas, 2003) ; (Nett et coll., 2011)]**. Ce film de conditionnement est constant quel que soit le type de cathéter et facilite l'adhésion des cellules à la surface **[(Quinet, 2006) ; (Aslam, 2008)]**.

*Candida* sp. forme des adhésines spécifiques sur sa paroi cellulaire lui permettant d'adhérer au film de conditionnement préalablement installé sur la surface **(Silva et coll., 2011)**.

La phase d'adhésion se déroule en deux étapes successives. Une première étape réversible et une deuxième irréversible.

- Adhésion réversible : l'attachement initial à la surface est souvent faible. La blastospore adhérente peut être facilement détachée de la surface et reprend son statut planctonique libre **(Baillie et Douglas, 1999)**.
- Adhésion irréversible : la blastospore adhère fortement à la surface sans se détacher **(Jabra-Rizk et coll., 2004)**.

Au début de la phase d'adhésion, la majorité des cellules sont présentes sous forme de blastospores. Ensuite, des microcolonies distinctes apparaissent sur la surface avec absence du matériel extracellulaire **(Zhou et coll., 2010)**.

### **7.2. Phase intermédiaire**

Dès que l'attachement à la surface devient irréversible, le biofilm entame la phase de croissance. Pour certaines espèces de *Candida* sp, la phase d'adhésion est suivie d'une période de formation des tubes germinaux **(Monds et O'toole, 2008)**.

Cette phase assure la multiplication par bourgeonnement et la formation d'une couche basale de micro-colonies de levures **(Baillie et Douglas, 2000)**.

Les blastospores commencent à se multiplier par bourgeonnement, un échafaudage filamenteux est produit et un matériel non cellulaire se forme. Les microcolonies sont unies par les extensions des hyphes, menant à une monocouche confluyente **(Ramage et coll., 2009)**.

La phase intermédiaire est caractérisée par la production et l'émergence de la matrice extracellulaire qui apparaît comme un voile couvrant les microcolonies de *Candida* sp, alors que le dépôt initial de la matière extracellulaire donne un aspect trouble **(Al- Fattani et Douglas., 2006)**.

### **7.3. Phase de maturation**

Durant la phase de maturation, la quantité du matériel extracellulaire augmente jusqu'à ce que les populations microbiennes soient entièrement confinées. Le biofilm mature se compose d'un réseau dense de levures ovoïdes (blastopores), de filaments (hyphes) et de pseudohyphes et d'une matrice exopolymérique. À ce stade, les biofilms sont organisés en une bicouche où les blastopores constituent la couche basale alors que les hyphes forment la couche supérieure ramifiée plus épaisse **(Hawser et Douglas, 1994)**.

La composition biochimique de la matrice extracellulaire du biofilm est contrôlée par la communauté microbienne. La majeure partie de cette matrice est constituée d'eau (jusqu'à 97%). D'autres composants peuvent également être présents, tels que les glucides (40% dont 32% de glucose, 3% d'hexosamines et 0.1% d'acide uronique en plus du mannose, de galactose et de glucane), les protéines (environ 5%), le phosphore (0.5%), des quantités plus petites d'acides nucléiques et de lipides **(Daniels et coll., 2006)**.

En plus des trois phases précédentes, la formation et le développement du biofilm s'achève par une quatrième phase, celle de la dispersion et la diffusion des cellules filles du biofilm. Cette phase joue un rôle extrêmement important dans la dissémination et la complication des infections systémiques **(Pace et coll., 2006)**.

Le retour des cellules à la phase planctonique boucle le cycle de développement du biofilm. Cette étape est considérée par certains auteurs comme étant une cinquième phase dans la formation du biofilm **(Irie et Parsek, 2008)**.

### **8. Architecture des biofilms de *Candida* sp.**

La structure du biofilm mature varie en fonction de la surface, de la nature des microorganismes constitutifs et de la disponibilité des éléments nutritifs. Néanmoins, l'hétérogénéité structurale de l'architecture semble être une propriété commune des biofilms formés par presque tous les microorganismes **[(Stickler, 1999) ; (Chandra et coll., 2001b)]**.

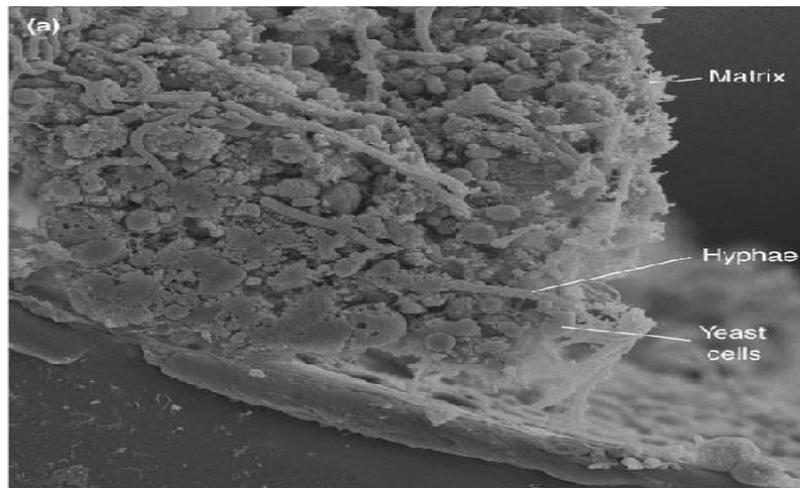
Les biofilms sont formés sur des surfaces solides et présentent une structure en trois dimensions (Figure N° 3). Dans le cas des biofilms de *C. albicans*, la forme levure constitue la couche basale du biofilm, tandis que les hyphes et les pseudohyphes forment la couche supérieure. Cette structure se caractérise par un aspect bi-phasique **(Nett et Andes, 2006)**.

La couche basale de blastospores représente environ un quart de la profondeur du biofilm total. La couche supérieure, d'épaisseur variable, est composée en grande partie d'hyphes envahissant la matrice exo-polymérique et couvrant la première couche **(Mateus et coll., 2004)**.

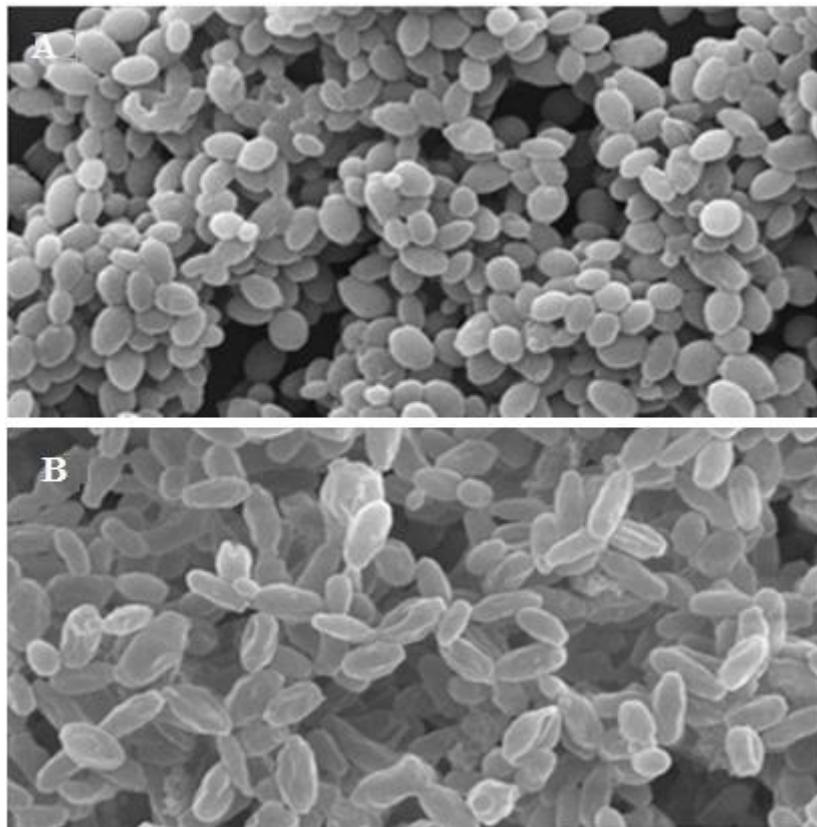
Il est à noter que les biofilms formés par *Candida glabrata* sont monomorphiques. Ils sont constitués uniquement de blastospores. En revanche, ceux formés par *C. parapsilosis* sont constitués de blastospores et de pseudohyphes **(Reiss et coll., 2012)** (Figure N°4).

Au cours de sa croissance à environ 48 h après sa formation, le biofilm candidal se développe en cellules métaboliquement actives qui sont entrecoupées par des canaux d'eau ramifiées qui permettent la circulation des éléments nutritifs, l'élimination des déchets et l'établissement de micro-niches à travers le biofilm **[(Donlan, 2001) ; (Coogan et coll., 2006)]**.

Sur les différents dispositifs médicaux, l'épaisseur des biofilms varie généralement entre 200 et 300  $\mu\text{m}$  voire 450  $\mu\text{m}$  (Yeater et coll., 2007).



**Figure N° 3 :** Microscopie électronique à balayage d'une section transversale intérieure de la lumière d'un cathéter vasculaire, implanté chez un rat, contaminé par un biofilm de *C. albicans* d'une épaisseur supérieure à 200  $\mu\text{m}$  (Grossissement x 1000) (Nett et Andes, 2006).



**Figure N° 4:** Microscopie électronique à balayage des biofilms matures (48 h) (A) *C. glabrata* (B) *C. parapsilosis* (Grossissement x 3000) (Silva et coll., 2010).

## **9. Quorum sensing**

Les biofilms sont également sous le contrôle de molécules de signalisation diffusibles qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Elles sont désignées par le terme de quorum sensing. Il s'agit d'une signalisation intercellulaire qui permet aux microorganismes d'évaluer leur densité de population et de la contrôler en induisant ou réprimant l'expression de gènes contrôlés par le quorum sensing [(Hogan, 2006a et 2006b) ; (Irie et Parsek, 2008) ; (Martinez et Fries, 2010)].

Deux molécules du quorum sensing sont impliquées chez *Candida* sp, le tyrosol et le farnésol.

Le tyrosol joue un rôle dans la croissance et la morphogenèse de *C. albicans* en assurant un contrôle positif pour le passage à la forme hyphe, il stimule la filamentation dans des conditions permissives pour la formation des tubes germinaux [(Hornby et coll., 2003) ; (Chen et coll., 2004)].

Le farnésol est un sesquiterpène synthétisé à partir du farnésyl pyrophosphate. Il assure le contrôle négatif du quorum sensing et fonctionne comme un signal entre les cellules en inhibant la formation d'hyphes et la colonisation des surfaces (Weber et coll., 2008).

En 2007, Martins et ses collaborateurs, ont montré que le dodécanol est une autre molécule du quorum sensing qui inhibe le dimorphisme. Récemment, Hall et ses collaborateurs (2010), ont ajouté que cette transition peut être stimulée par le CO<sub>2</sub>, qui lui aussi est une molécule du quorum sensing des biofilms de *Candida albicans*.

## **10. Résistance des biofilms de *Candida* sp.**

L'une des caractéristiques déterminantes des biofilms de *Candida* sp. est leur résistance aux agents antifongiques. Ce phénomène est mis en évidence dès 1995 par Hawser et Douglas. Dès lors, les biofilms posent un problème majeur puisque la dose d'antifongique requise pour les éradiquer est supérieure aux doses thérapeutiques (Ramage et coll., 2009). Par conséquent, les infections liées au biofilm sont difficiles à traiter et à éliminer totalement par des régimes de traitement standard (Perumal et coll., 2007).

L'augmentation de la résistance aux agents antifongiques est induite par l'adhésion des cellules aux surfaces. Elle est associée à une augmentation concomitante de l'activité métabolique du développement du biofilm **(Nett et coll., 2008)**.

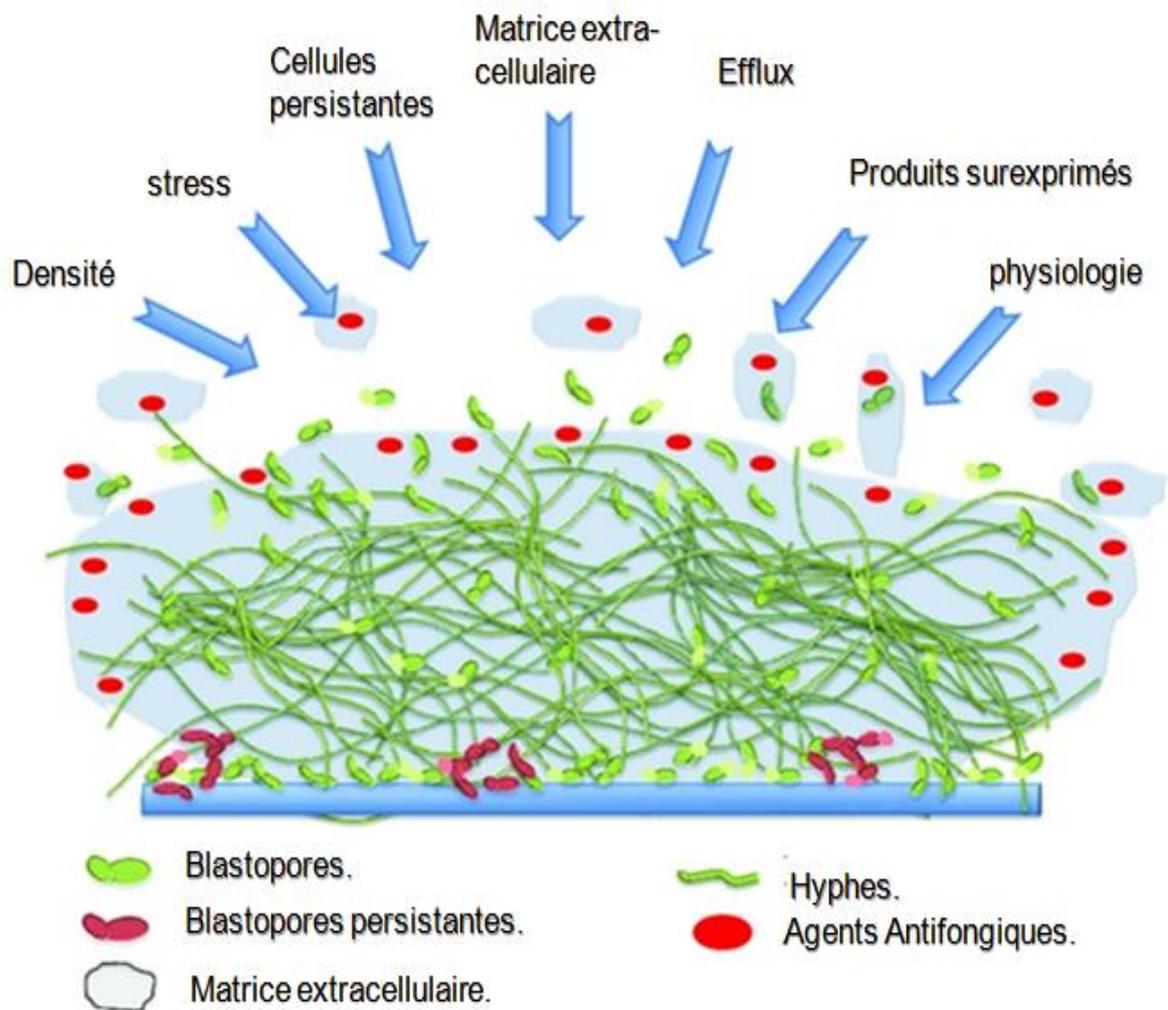
Complexes et mal compris au début des années 2000, les mécanismes de résistance des biofilms aux agents antimicrobiens commencent à être clarifiés **[(Ribaud et coll., 1999) ; (Ramage et coll., 2002b)]**. Récemment, Ramage et ses collaborateurs (2012) ont proposé un modèle schématique des différents mécanismes de résistance des biofilms fongiques (Figure N° 5).

La résistance du biofilm est un phénomène multifactoriel qui constitue un large spectre de défense qui soit efficace contre de nombreux types d'agents antifongiques **(Ramage et coll., 2001a et 2005)**.

Différents facteurs contrôlent la résistance antifongique au sein du biofilm. En effet, la densité cellulaire élevée d'un biofilm explique partiellement la résistance accrue des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques **[(Seneviratne et coll., 2008) ; (Ramage et coll., 2012)]**. De plus, les travaux de Kouidhi et ses collaborateurs en 2010, ont montré que la résistance au sein du biofilm repose sur la modification de la perméabilité membranaire, c'est-à-dire, la diminution de l'influx et l'augmentation de l'efflux.

L'expression génétique augmente au cours de la formation des biofilms. Il s'agit essentiellement des gènes *CDR1*, *CDR2* (*Candida Drug Resistance*), et *MDR1* (*Multi- Drug Resistance*) qui présentent une surexpression localisée dans la membrane cellulaire **(Mukherjee et Chandra, 2004)**.

L'existence des cellules dites persistantes favorise le processus de résistance. Cette population particulière survit à des concentrations élevées en antifongiques et peut reformer un nouveau biofilm **(LaFleur et coll., 2006)**. Ce type de cellules est rencontré dans les biofilms de *C. albicans*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*, mais pas dans ceux formés par *C. glabrata*, ce qui suggère que les cellules persistantes ne sont pas les seules responsables de la résistance aux antifongiques chez les biofilms de *Candida* sp. **(Lewis, 2010)**.



**Figure N° 5** : Représentation schématique des mécanismes de résistance des biofilms fongiques (**Ramage et coll., 2012**).

D'autre part, la réduction de la teneur en ergostérol amplifie la résistance durant la phase intermédiaire et la phase de maturation du biofilm **(Mukherjee et Chandra, 2004)**.

De même, la matrice extracellulaire augmente la résistance aux antifongiques en constituant une barrière diffusive **(Al-Fattani et Douglas, 2006)**. Les antifongiques sont dilués à travers la matrice ce qui induit une diminution de leur concentration et un retard dans leur action **(Hall-Stoodley et coll., 2004)**.

Vue l'importance, la dominance et la résistance des levures appartenant au genre *Candida* isolées des dispositifs médicaux en milieu hospitalier, nous avons entrepris cette étude dans le but de :

- Rechercher, isoler et identifier les différentes espèces de levures impliquées dans les contaminations et les infections de ces derniers après leurs retraits des patients hospitalisés au CHU de Sidi bel Abbès.
- Evaluer la capacité des souches isolées à former des biofilms et leur mise en évidence par microscopie électronique à balayage.

## *Deuxième partie*

---

# **Matériel et méthodes**

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

### **1. Prélèvements**

Notre échantillonnage a concerné différents dispositifs médicaux (cathéters vasculaires centraux et périphériques, naso-gastriques, oro-bronchiques, trachéotomiques, chirurgicaux de drainage et sondes urinaires). Ces derniers sont prélevés durant la période allant de Février 2011 à Janvier 2012 de patients hospitalisés dans les services de réanimation-anesthésie, chirurgie infantile, chirurgie générale, neurochirurgie, traumatologie, urologie, Gastro-entérologie, pneumo-phtisiologie, hématologie clinique et endocrinologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Sidi Bel Abbès.

Seuls les dispositifs médicaux implantés depuis 48 heures et plus sont prélevés selon les recommandations de Quinet (2006) et Gürcüoğlu et ses collaborateurs en 2010.

En prenant des mesures d'asepsie, l'extrémité distale de chaque cathéter retiré est sectionnée à environ 3 à 5 cm de longueur. Elle est ensuite placée dans un tube stérile contenant 1 mL d'eau physiologique. Afin d'éviter toute contamination, les tubes sont ouverts devant une torche, flambés puis vite refermés après coupure des extrémités distales des cathéters à l'aide de ciseaux stériles. Les sondes, quant à elles, sont coupées à l'aide de bistouris stériles (**Carrière et Marchandin, 2001**).

Les échantillons sont marqués, puis transportés au laboratoire dans un bac réfrigérant (glacière) pour ralentir la croissance microbienne.

### **2. Détermination des types d'altérations des cathéters**

Pour la détermination des différents types d'altérations fongiques des cathéters, les prélèvements sont examinés au microscope optique.

La distinction entre l'infection, la colonisation et la contamination des cathéters est évaluée en se référant au seuil de signification ( $10^3$  cellules/mL) ainsi qu'aux données enregistrées lors des prélèvements (**Brun-buisson et coll., 1987**).

Nous avons adopté la technique quantitative de Brun-buisson et coll., (1987) avec une légère modification qui consiste en un dénombrement direct des levures sur cellule de Thoma.

Les tubes contenant les segments des cathéters prélevés sont agités au vortex pendant une minute. Cette opération permet, à la fois, d'examiner les faces internes et externes des cathéters.

Les levures sont dénombrées sur cellules de Thoma. Selon Gognies et Belarbi, (2010), seules les levures situées à l'intérieur des lignes délimitant la surface de la cellule de Thoma sont dénombrées, les résultats sont rapportés en cellules/mL.

Les travaux de Boucherit-Atmani et coll., (2011) ont montré que l'agitation du cathéter au vortex pendant une minute, ne permet pas de détacher la totalité des levures. C'est pourquoi, les segments des cathéters qui présentent un résultat négatif à l'examen au microscope optique sont transférés dans des tubes contenant du milieu Sabouraud liquide additionné de 50 mg/L de chloramphénicol, puis incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures, voire 72 heures. Cette incubation permet l'isolement des cellules de levures non détachées des surfaces des cathéters, notamment celles en mode biofilms. Les résultats obtenus des différents types d'altérations fongiques ont fait l'objet d'une étude statistique qui nous a permis de comparer chaque type d'altération vis-à-vis :

- des services inclus dans l'étude,
- des espèces isolées,
- du type de cathéters prélevés,

L'outil statistique utilisé est l'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA2) et l'analyse hiérarchique des variables (CAH).

Les traitements statistiques sont réalisés sur Excel 2007 et MINITAB 16.

Les valeurs de variances ( $P$ ) inférieures à 0,05 sont considérées comme étant significatives.

### **3. Isolement, purification et identification**

L'isolement et l'identification des espèces de levures se fait simultanément avec l'évaluation des types d'altérations fongiques des cathéters.

Après agitation des tubes contenant les prélèvements au vortex, des boîtes de pétri préalablement coulées avec la gélose Sabouraud sont ensemencées en stries, puis incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

La purification des levures est réalisée par repiquages successifs sur milieu Sabouraud. Chaque souche pure est ensemencée sur gélose Sabouraud inclinée en tube puis incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures et conservée à 4°C.

L'identification des souches isolées est basée sur leurs caractères biochimiques et morphologiques. Les tests de microculture (blastèse et Chlamydosporulation) et les galeries d'identification Api Candida® (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, France) sont utilisés.

#### **3.1. Test de blastèse (test de germination)**

Ce test décrit par Taschdjian en 1960 et inspiré des travaux de Reynolds et Braune (1956) qui ont montré que les constituants du sang favorisent la formation de filaments par certaines levures.

La souche à tester est ensemencée dans 1 mL de sérum humain, puis incubée à 37°C pendant 3 à 4 heures. L'observation de la suspension au microscope optique (Grossissement ×400) est réalisée pour mettre en évidence la formation des tubes germinatifs (**Bouchet et coll., 1989**).

#### **3.2. Test de chlamydosporulation**

Une colonie est prélevée puis ensemencée en stries sur gélose PCB (pomme de terre, carotte, bile de bovin) en créant des fentes dans la surface de la gélose à l'aide d'un fil de platine. La zone ensemencée est recouverte d'une lamelle couvre-objets stérile puis incubée à 30 °C pendant 48 heures. La présence de chlamydozoospores (spores globuleuses de 10 à 15 µm entourées d'une paroi épaisse) est mise en évidence par l'observation au microscope optique au grossissement ×400 (**Drochey et Vieu, 1957**).

### **3.3. Identification par les Galeries Api Candida**

La galerie Api *Candida* est un moyen standardisé pour l'identification des levures du genre *Candida*. Elle comprend 10 cupules contenant des substrats déshydratés pour réaliser 12 tests d'identification (acidification des sucres et réactions enzymatiques) (BioMérieux®. Marcy l'Etoile, France 2011).

A partir d'une culture jeune de levure (18 à 24 heures), l'inoculum est ajusté à une concentration cellulaire de  $10^7$  cellules/mL (3 Mc Farland). Celui-ci est réparti ensuite dans chacune des cupules de la galerie.

Pour créer l'anaérobiose, les 5 premières cupules plus la dernière sont couvertes avec de l'huile de paraffine. La galerie ainsi préparée est placée dans une étuve à 37°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.

### **4. Evaluation de la capacité des souches isolées à former les biofilms**

Le calcul des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules planctoniques (CMI) et des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI) permet d'évaluer la capacité des souches isolées à former les biofilms. Le pouvoir des souches de *Candida* sp. à former les biofilms est jugé positif si les SCMI sont supérieures aux CMI (**Ramage et coll., 2001b**).

Nous avons utilisé deux antifongiques, l'amphotéricine B pure (SIGMA) qui appartient à la classe des polyènes et le fluconazole pure (HEKMA), un dérivé azolé de troisième génération.

Il est important de signaler que ces deux antifongiques sont les plus utilisés en milieu hospitalier.

Seules les cellules adhérentes aux surfaces forment des biofilms, celles qui n'ont pas la capacité de les former vont être éradiquées par lavage au tampon phosphate salé (PBS 10 mM, pH 7,4, 2,7 mM chlorure de potassium, 137 mM chlorure de sodium, Annexe 1).

L'activité antifongique de l'amphotéricine B (AmB) et du fluconazole (FCZ) est testée sur 37 souches isolées des différents services du CHU de Sidi Bel Abbès

ainsi que sur trois souches de référence (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 26790 et *C. albicans* IP 444).

Pour chaque souche, nous avons évalué la CMI et la SCMI sur la même microplaque.

#### **4.1. Préparation des solutions mères des agents antifongiques**

La solution mère de l'amphotéricine B est préparée dans le diméthyle sulfoxyde (SIGMA) à une concentration de 1mg/mL. En revanche, le fluconazole est dissout dans de l'eau distillée à une concentration de 2 mg/mL. Les deux solutions sont préparées en extemporané.

#### **4.2. Préparation du XTT et de la Ménadione**

Le tétrazolium "XTT" (2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium 5-carboxanilide) provenant des laboratoires SIGMA est utilisé pour l'évaluation des SCMI. La solution mère de tétrazolium est préparée dans le PBS (10 mM, pH 7,4) à une concentration de 5mg/mL. Après sa stérilisation par filtration à travers un filtre millipore de 0,22 µm de porosité, elle est stockée à -20°C.

Le XTT étant un produit photosensible, les tests doivent être effectués en extemporané et à l'obscurité.

La ménadione (2-méthyl-1,4-naphthoquinone) ou vitamine K3, provenant des laboratoires SIGMA est utilisée comme accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. La solution mère de ménadione (10mM) est préparée dans l'acétone à une concentration de 0,17mg/mL, puis filtrée et stockée à -20°C.

#### **4.3. Préparation des inocula**

Les levures sont ensemencées dans 20 mL de milieu Sabouraud liquide et incubées à 30°C pendant 8 heures sous agitation continue (180 tours/min). Selon Ramage et ses collaborateurs (2001b), cet ensemencement permet d'avoir une culture jeune de blastospores facilement dénombrables sur cellule de Thoma.

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé deux fois avec du PBS stérile.

Les cellules récoltées sont resuspendues dans 20 mL de milieu RPMI 1640 tamponné avec 0,165 M d'acide morpholine-propane-sulfonique (MOPS, pH 7, SIGMA).

La concentration cellulaire de départ est fixée à  $10^3$  cellules/mL pour la détermination des CMI et à  $10^6$  cellules/mL pour l'évaluation des SCMI.

#### **4.4. Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)**

L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'amphotéricine B et du fluconazole vis-à-vis de chaque souche est réalisée suivant le protocole décrit par the *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI M27 A3, 2008)*.

Dans chaque puits de la microplaque, nous avons introduit 100  $\mu$ L de milieu RPMI 1640. 100  $\mu$ L de la solution antifongique (AmB ou FCZ), à une concentration finale de 64  $\mu$ g/mL, sont ajoutés aux puits N°1.

Après homogénéisation, une série de dilution est réalisée de puits en puits où 100  $\mu$ L sont prélevés, déposés et homogénéisés dans les puits suivants jusqu'aux derniers puits.

100  $\mu$ L de l'inoculum ( $10^3$  cellules/mL) sont ensuite ajoutés dans tous les puits de la microplaque.

Pour chaque agent antifongique, une série de dilution sans inoculum est également réalisée pour servir de témoin négatif.

Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Les CMI sont déterminées à l'œil nu.

#### **4.5. Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI)**

Les résultats des calculs des CMI ont une importance clinique. En effet, en dessous des SCMI<sub>50</sub> (concentrations minimales susceptibles d'inhiber 50% de la population sessile) l'intérêt thérapeutique est modéré. En revanche, au delà des SCMI<sub>80</sub> (concentrations minimales susceptibles d'inhiber 80% de la population sessile) le risque des concentrations toxiques augmente

**(Pierce et coll., 2008)**. Partant de ces données, nous avons recherché uniquement les SCMI<sub>50</sub> et les SCMI<sub>80</sub>.

Nous avons utilisé le protocole décrit par Pierce et ses collaborateurs (2008), qui permet de mesurer l'activité métabolique des cellules sessiles après leur exposition aux agents antifongiques. Cette méthode, précise et reproductible, est basée sur la réduction du tétrazolium.

Le XTT est converti en formazane par une enzyme (déshydrogénase mitochondriale des levures) qui est un produit de couleur orange soluble dans l'eau. Le formazane peut être quantifié par un lecteur de microplaque. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de cellules viables **[(Ernst et Rogers, 2005) ; (Pierce et coll., 2008)]**.

L'évaluation des SCMI se déroule en trois étapes successives, la formation des biofilms, le test antifongique et le test de réduction du tétrazolium.

#### **4.5.1. Formation des biofilms**

Les biofilms sont cultivés dans les puits des microplaques stériles, l'ensemencement des puits est réalisé après ajustement de la concentration cellulaire de départ à 10<sup>6</sup> cellules/mL.

Après addition de 100 µL de l'inoculum dans chaque puits, la microplaque est scellée puis placée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

#### **4.5.2. Tests antifongiques**

A l'aide d'une micropipette multicanal, le surnageant est aspiré soigneusement des puits pour éviter la destruction des biofilms formés.

Les puits sont ensuite rincés deux fois avec 200 µL de PBS stérile afin d'éliminer les cellules planctoniques et les cellules non adhérentes aux surfaces des puits.

Un égouttage de la microplaque est réalisé en l'inversant. Le liquide résiduel du PBS est écarté en la tamponnant sur des serviettes stériles en papier buvard.

100 µL du milieu RPMI 1640 sont ajoutées dans chaque puits de la microplaque. 100 µL de chaque agent antifongique (à la concentration finale de 64 µg/mL) sont incorporés dans les puits N° 1.

Après homogénéisation, une série de dilution de ½ est effectuée de puits en puits jusqu'au dernier.

Les tests antifongiques sont réalisés en triplicata pour chaque souche. En parallèle, un témoin négatif et un témoin positif sont préparés. Le témoin négatif correspond à une incubation de l'agent antifongique dans le milieu de culture en l'absence de levures, alors que le témoin positif consiste à incuber les levures en l'absence d'agent antifongique.

Les microplaques sont convenablement scellées et incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, un lavage des puits à l'aide du PBS est réalisé comme décrit précédemment et la microplaque est prête au test de réduction du tétrazolium.

#### **4.5.3. Test de réduction du tétrazolium**

Avant d'effectuer les tests de viabilité des cellules, 1 µL de la solution de ménadione est ajouté à 10 mL de la solution XTT pour avoir une concentration finale de 1 mM de ménadione.

Les puits sont rincés avec du PBS stérile et 100 µL du mélange XTT/ménadione sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque (y compris le contrôle positif).

Les microplaques sont ensuite scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 2 à 3 heures. À ce stade, le tétrazolium est converti en formazane par les cellules viables.

Après l'incubation des microplaques, 75 µL du contenu de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque stérile. Celle-ci est placée dans un lecteur de microplaques (Biotek, ELx800) pour mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm.

Les SCMI sont calculées en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante:

$$\text{SCMI} = 100 [1 - (A_{490\text{nm}} \text{ des biofilms} / A_{490\text{nm}} \text{ du contrôle positif})]$$

$A_{490}$ : Densité optique à 490 nm (**Dalleau et coll., 2008**).

Cette formule permet de calculer les SCMI des antifongiques correspondants pour chaque puits de la microplaque.

## **5. Observation des biofilms au microscope électronique à balayage**

Pour mettre en évidence l'aptitude des souches isolées à former les biofilms et d'observer leurs structures, cinq segments de différents cathéters prélevés des patients sont soumis à l'observation au microscope électronique à balayage (MEB). Une suspension de levures détachées d'un autre cathéter, après agitation au vortex pendant une minute, est également observée au microscope électronique à balayage.

Les segments choisis pour servir d'échantillons à l'imagerie électronique provenaient d'un cathéter veineux central, quatre cathéter veineux périphériques et un cathéter oro-bronchique. Ces derniers sont retirés des patients après des temps de pose respectifs de 8, 3, 4, 2, 5 et 3 jours.

Le choix des segments se fait suite aux observations microscopiques des suspensions dans lesquelles les cathéters sont plongés. L'observation des structures mycéliennes, pseudomycéliennes ou d'important amas de cellules laisse présager l'existence de biofilms sur les parois des cathéters.

Pour la réalisation des photographies en microscopie électronique à balayage, les échantillons sont fixés par le glutaraldéhyde puis envoyés au laboratoire de microscopie électronique « *Dennis Kunkel Microscopy, Inc* » dirigé par le Professeur Dennis Kunkel (Etats Unis d'Amérique).

### **5.1. Préparation des échantillons**

Avant l'envoi des échantillons pour leur observation aux MEB, nous les avons fixés par le glutaraldéhyde selon le protocole de Chandra et coll., (2001b).

Dans le but de garder attaché le maximum du biofilm sur les segments des cathéters envoyés au laboratoire de la microscopie électronique à balayage, l'agitation au vortex ne sera pas effectuée.

Dans un tube eppendorf, une solution de glutaraldéhyde est ajoutée à 1 mL du tampon PBS pour avoir une concentration finale de 2,5 %.

Des segments de cathéters de 7 à 8 mm de long sont coupés stérilement, puis introduits dans des tubes eppendorf stériles.

Les tubes numérotés sont bien scellés en ajoutant un film adhésif, puis placés dans un autre flacon et laissé 12 heures à 4°C avant leur expédition au laboratoire de microscopie électronique à balayage.

## *Troisième partie*

---

# **Résultats et discussion**

L'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2013**) estime qu'entre 5 et 12% des patients hospitalisés dans le monde développent une infection nosocomiale, dont plus de 60% sont associées à l'usage d'un dispositif médical ou chirurgical. Le cathéter veineux périphérique est le dispositif invasif le plus utilisé.

La part des candidémies parmi les septicémies n'est pas négligeable, en particulier lorsqu'elles sont nosocomiales (**Eloy et coll., 2006**).

Il apparaît donc nécessaire d'évaluer le risque infectieux fongique lié aux cathéters et d'identifier les espèces qui y sont impliquées.

En effet, depuis 2003 le service d'épidémiologie et de médecine préventive du CHU de Sidi Bel Abbès a adopté une stratégie pour la surveillance des infections nosocomiales par des enquêtes de prévalences répétitives dans le but de mesurer leur taux et de suivre leurs tendances évolutives.

L'enquête de prévalence réalisée en 2009 dans ce CHU a montré que 56,8% des patients ayant contracté une infection nosocomiale portaient un cathéter veineux périphérique, 11,4% portaient un cathéter veineux central et 13,6% portaient d'autres types de cathéters. De plus, les antibiotiques à large spectre sont souvent utilisés dans les différents services, alors que les antifongiques ne sont que rarement prescrits (Données du service d'épidémiologie et de médecine préventive).

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui consiste à isoler des levures appartenant au genre *Candida* à partir des cathéters après leurs ablations (cathéters vasculaires centraux et périphériques, urinaires, chirurgicaux de drainage, oro-bronchique et trachéotomique) des patients admis dans les différents services du CHU de Sidi Bel Abbès.

L'objectif de cette étude porte également sur l'évaluation *in vitro* de la capacité des souches isolées à former les biofilms, ainsi que sur leur résistance aux antifongiques les plus utilisés dans les hôpitaux algériens, l'amphotéricine B et le fluconazole.

### **1. Détermination des types d'infectivités des cathéters**

Le cathétérisme est un geste invasif de pratique courante dans les structures hospitalières qui facilite l'administration des traitements par voie veineuse. Malheureusement, ce dispositif constitue souvent une porte d'entrée aux agents infectieux. Cependant, l'infection liée aux cathéters demeure la principale complication de leur utilisation quel que soit le type du matériel **(Douard et coll., 2005)**.

Il est nécessaire de rappeler que la contamination se définit par une culture positive non significative de l'extrémité distale du cathéter, en l'absence de signes locaux ou généraux d'infection, alors que dans le cas d'une colonisation, il s'agit d'une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter, en l'absence des signes d'infection. En revanche, l'infection liée au cathéter est définie par la présence d'un syndrome septique et d'une culture significativement positive de l'extrémité distale du cathéter. Le seuil de signification est  $\geq 10^3$  cellules/mL en culture quantitative selon Brun-Buisson et coll., (1987).

Sur la base de ces données, nous avons établi un classement des colonisations, des contaminations et des infections auxquelles nous avons attribué le terme d'« infectivités fongiques des cathéters ».

Sur la période allant du mois de Février 2011 au mois de Janvier 2012, nous avons collecté 456 cathéters des dix (10) services concernés par cette étude. La répartition des prélèvements par service est représentée sur le tableau N°1. Nous constatons qu'au moins, quatre types de cathéters sont utilisés dans les services de réanimation-anesthésie, de chirurgie infantile, de chirurgie générale et de neurochirurgie. Il est à noter que certains patients portaient plus d'un type de cathéter. Les cathéters veineux périphériques et les cathéters urinaires sont les dispositifs médicaux les plus utilisés dans tous les services étudiés du CHU de Sidi Bel Abbès. Par ailleurs, les cathéters trachéotomiques ne sont utilisés qu'aux services de réanimation-anesthésie et de chirurgie générale (Tableau N° 1).

**Tableau N° 1** : Répartition des prélèvements par service et par type de cathéter

<b>Services</b>	<b>Types de cathéters</b>						<b>Total</b>
	<b>KTP</b>	<b>KTC</b>	<b>KTU</b>	<b>KTT</b>	<b>KTOB</b>	<b>KTD</b>	
Réanimation-anesthésie	15	17	10	8	12	-	62
Urologie	9	-	34	-	-	-	43
Chirurgie Infantile	10	1	14	-	9	11	45
Gastro-entérologie	29	-	11	-	-	1	44
Chirurgie Générale	12	3	10	2	3	17	47
Neurochirurgie	14	1	16	-	13	-	44
Pneumo-phtisiologie	33	-	9	-	-	-	42
Endocrinologie	38	-	3	-	-	-	41
Hématologie clinique	38	-	5	-	-	-	43
Traumatologie	25	-	15	-	-	5	45
<b>Total</b>	<b>223</b>	<b>22</b>	<b>127</b>	<b>10</b>	<b>37</b>	<b>29</b>	<b>456</b>

**KTP** : cathéter veineux périphérique, **KTC** : cathéter veineux centrale, **KTU** : cathéter urinaire, **KTT** : cathéter trachéotomique, **KTOB** : cathéter orobronchique, **KTD** : cathéter de drainage.

Le tableau N° 2 regroupe le nombre et le taux des différents types d'infectivités fongiques des cathéters au CHU de Sidi Bel Abbès. Les détails de dénombrements sur cellules de Thoma sont représentés dans l'annexe 2.

Nous remarquons qu'en termes d'infection des cathéters, le service de réanimation-anesthésie se classe en première position avec un taux de 4,76 % suivi du service de pneumo-phtisiologie avec 2,38 %. Le service de chirurgie générale occupe la troisième place avec 2,13 %.

En ce qui concerne les colonisations des cathéters, le service de chirurgie générale est le plus concerné par ce type d'infectivité avec 8,51 % suivi du service de chirurgie infantile avec un taux de 4,44 %. Le service de réanimation-anesthésie arrive en troisième position avec un taux de 3,18 %.

Pour les contaminations des cathéters, le service de réanimation-anesthésie est le plus concerné avec un taux de 9,52 %.

Par ailleurs, nous avons constaté que deux à trois types d'infectivités fongiques sont observés dans les différents services à l'exception du service de chirurgie infantile et d'hématologie clinique où seules des colonisations ont été enregistrées (Tableau N° 2).

**Tableau N° 2** : Taux et nombre des infectivités fongiques des cathéters au CHU de Sidi Bel Abbès.

<b>Services</b>	<b>Contamination N<sup>bre</sup> (%)</b>	<b>Colonisation N<sup>bre</sup> (%)</b>	<b>Infection N<sup>bre</sup> (%)</b>
Réanimation-anesthésie	6 (9,52)	2 (3,18)	3 (4,76)
Urologie	2 (4,65)	1 (2,32)	0
Chirurgie Infantile	0	2 (4,44)	0
Gastro-entérologie	2 (4,54)	0	0
Chirurgie Générale	2 (4,25)	4 (8,51)	1 (2,13)
Neurochirurgie	1 (2,27)	0	0
Pneumo-phtisiologie	2 (4,76)	0	1 (2,38)
Endocrinologie	3 (7,32)	0	0
Hématologie clinique	0	1 (2,32)	0
Traumatologie	2 (4,44)	1 (2,22)	0
<b>Total</b>	<b>20 (55,56)</b>	<b>11 (30,56)</b>	<b>5 (13,88)</b>

L'analyse statistique de la variance à deux facteurs (ANOVA 2) révèle la présence d'une différence significative entre les services étudiés avec  $P = 0,01$ , ainsi qu'une nette différence entre les types d'infectivités fongiques ( $P = 0,03$ ).

Rappelons que la fréquence des microorganismes fongiques causant les infections nosocomiales varie d'un pays à l'autre selon les établissements, les services de soins intensifs, les protocoles d'antibiothérapie et le type du cathéter utilisé **[(Fridkin et Jarvis, 1996) ; (Vincent, 2003) ; (Pfaller et Diekema, 2010)]**.

De plus, selon Quinet en 2002, la colonisation du cathéter n'aboutit pas forcément à une fongémie. Cependant, dans l'immense majorité des cas, la souche colonisante est la souche infectante **(Stephan et coll., 2002)**. Par conséquent, l'infection du cathéter survient secondairement à une fongémie et le cathéter infecté constitue par la suite un réservoir qui entretient l'infection **(Gallien et coll., 2007)**.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux d'Eggimann et ses collaborateurs (2003), Hot et ses collaborateurs (2007), Seabra et Bhogal (2009) et Timsit et ses collaborateurs (2005 et 2011) qui ont montré que l'utilisation des cathéters est la principale source des infections invasives chez les patients hospitalisés, notamment dans les services de soins intensifs.

Nous avons également déterminé les différents types d'infectivité fongiques en fonctions des types de cathéters prélevés.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N° 6 (Annexe 3).

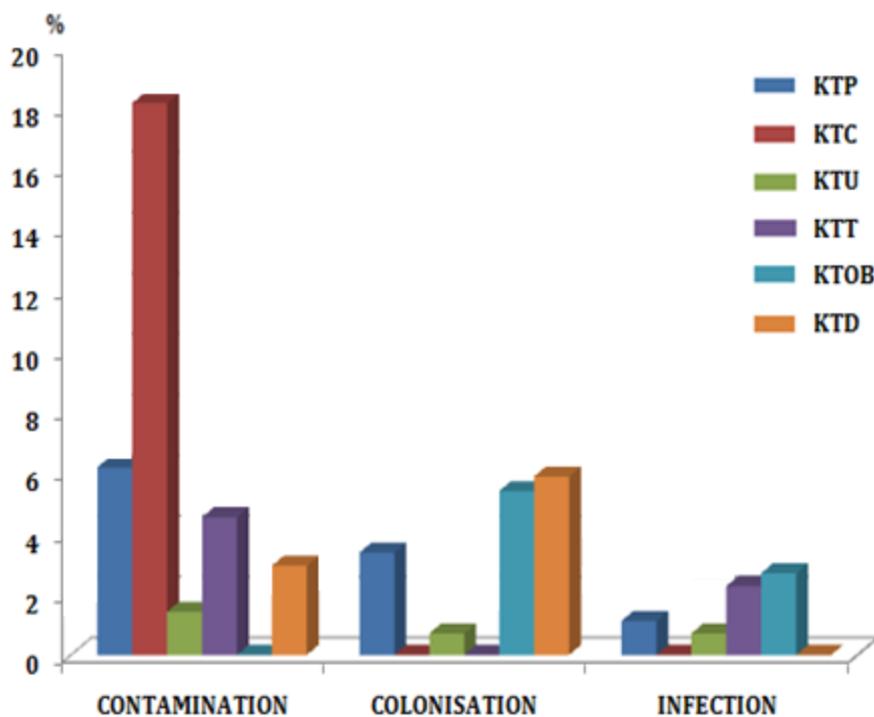
Nous constatons que les types d'infectivités varient selon les types de cathéters utilisés au CHU de Sidi Bel Abbès. Les cathéters centraux sont les plus incriminés dans les contaminations avec un taux de 18,18 %, ceci pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs dont la durée d'implantation des ces cathéters dépassant les 8 jours et pouvant aller jusqu'à 21 jours. De plus, l'ensemble des patients présentait des pathologies lourdes (diabète, hypertension,...) et hospitalisés en réanimation, service pourvoyeur d'infections nosocomiales. En revanche, se sont les cathéters de drainages (5,88%) et les cathéters oro-bronchiques (5,4%) qui sont responsables des colonisations.

Pour les infections, se sont essentiellement les cathéters oro-bronchiques qui sont responsables (2,7%). Ce type de cathéters est souvent incriminé dans les infections nosocomiales.

Cette hypothèse est confirmée chez un cas patient au service de réanimation présentant une infection par la même espèce de *Candida* retrouvée sur son cathéter oro-bronchique et sur sa langue.

Aucune différence significative n'est observée entre les types d'infestivités fongiques ( $P = 0,13$ ). Cependant, nous distinguons une légère différence entre les types de cathéters utilisés ( $P = 0,04$ ).

Les cathéters veineux centraux sont les plus impliqués dans les contaminations fongiques. Ce résultat n'est pas en accord avec ceux de Donlan et Costerton (2002) et de Shoham (2011) qui ont montré que ce type de cathéter est responsable d'infections. Selon Brun-buisson (1994), cette différence peut être liée en partie à la durée de pose du cathéter veineux central qui est en moyenne supérieure à huit jours. Cette observation a été confirmée en 2013 par Al Mohajer et Darouiche. De plus, Mascellino et coll. (2012) ont signalé que les candidoses invasives sont significativement reliées à la présence des cathéters ( $P < 0.05$ ).



**Figure N° 6 :** Différents types d'infestivités fongiques en fonction des types de cathéters utilisés au CHU de Sidi Bel Abbès.

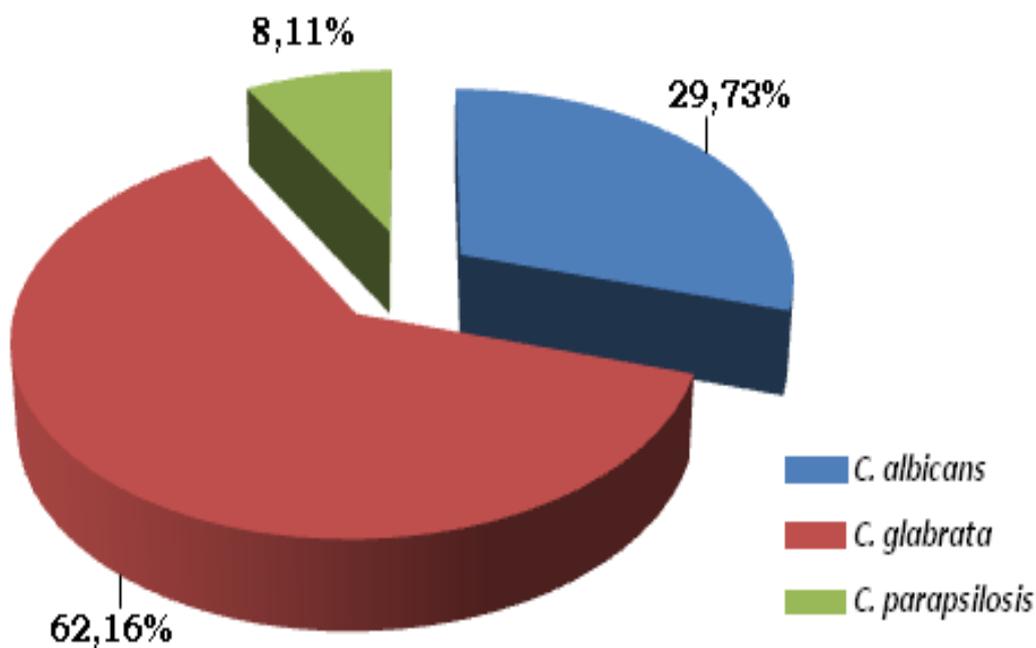
## 2. Isolement et identification des levures de *Candida* sp.

Sur 456 prélèvements, 36 souches de *Candida* sp. sont isolées des différents cathéters implantés (Annexe 4).

Les résultats relatifs à la répartition des souches isolées au sein du CHU de Sidi Bel Abbès sont représentés sur la figure N° 7.

Il ressort de cette figure que trois espèces appartenant au genre *Candida* sont isolées au CHU de Sidi Bel Abbès. Il s'agit de *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida parapsilosis*.

L'espèce *Candida glabrata* occupe la première place avec un taux de 62,16 %, suivie de *Candida albicans* (29,73 %) puis de *Candida parapsilosis* avec un taux de 8,11 %. Il est à noter que l'espèce dominante est *Candida glabrata* qui fait partie des espèces émergentes de *Candida*.



**Figure N° 7 :** Taux des espèces de *Candida* sp. isolées de l'ensemble des services du CHU de Sidi Bel Abbès.

Ce résultat est en accord avec les travaux de Fidel et ses collaborateurs (1999) ainsi que ceux de l'équipe de Baddley (2001) qui ont signalé l'émergence de *C. glabrata* comme agent pathogène opportuniste dans les hôpitaux. En effet, les infections liées à cette espèce sont désormais courantes **[(Sobel, 2000) ; (Ahmad et coll., 2014)]**.

De plus, Lima et ses collaborateurs en 2010 ont considéré *C. glabrata* comme étant un agent important dans les infections chez les patients immunodéprimés. La fréquence de cette espèce a doublé par rapport aux données enregistrées dix années auparavant **(Figueroa et coll., 2009)**.

Par ailleurs, Pace et ses collaborateurs en 2006, ont révélé que *Candida* sp. est responsable de 6% de colonisation et de 9% d'infections des cathéters.

Nous nous sommes également intéressés à la répartition des souches isolées par service au CHU de Sidi Bel Abbès. Les résultats obtenus sont rassemblés sur le tableau N°3

Il ressort de ce tableau que les services de réanimation-anesthésie et de chirurgie générale sont les plus concernés par les infectivités fongiques des cathéters. En effet, le taux des souches isolées de *Candida* sp. au service de réanimation-anesthésie est de 19,05 % et atteint 14,89 % au service de chirurgie générale. Il est de 7,32 % et 7,14 % respectivement pour le service d'endocrinologie et de pneumo-phtisiologie.

Les services de neurochirurgie et d'hématologie clinique viennent en dernier rang, avec des taux respectifs de 2,27 % et 2,32 %.

**Tableau N° 3** : Nombre de prélèvements effectués et répartition des espèces de *Candida* sp. isolées dans chaque service du CHU de Sidi Bel Abbès.

<b>Service</b>	<b>N<sup>bre</sup> de prélèvements</b>	<b><i>C. albicans</i> N<sup>bre</sup> (%)</b>	<b><i>C. glabrata</i> N<sup>bre</sup> (%)</b>	<b><i>C. parapsilosis</i> N<sup>bre</sup> (%)</b>
Réanimation- anesthésie	63	3 (4,76)	9 (14,28)	0
Urologie	43	0	3 (6,97)	0
Chirurgie Infantile	45	0	2 (4,44)	0
Gastro- entérologie	44	0	2 (4,54)	0
Chirurgie Générale	47	2 (4,25)	5 (10,64)	0
Neurochirurgie	44	0	1 (2,27)	0
Pneumo- phtisiologie	42	1 (2,38)	1 (2,38)	1 (2,38)
Endocrinologie	41	3 (7,32)	0	0
Hématologie clinique	43	1 (2,32)	0	0
Traumatologie	45	1 (2,22)	0	2 (4,44)
<b>Total</b>	<b>457</b>	<b>11 (29,73)</b>	<b>23 (62,16)</b>	<b>3 (8,11)</b>

Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'Eggimann et Pittet (2002), de Vincent (2003), d'Almirante et ses collaborateurs (2005) ainsi que ceux de Chalmers et Bal (2011) qui ont signalé que les services de soins intensifs sont les plus confrontés aux infections nosocomiales liées au genre *Candida*.

A contrario, Rouzic et coll. (2008) ont révélé que c'est le service de maternité qui vient au premier rang de ces infections. Alors qu'Eggimann et ses collaborateurs (2003) ont signalé que les patients hospitalisés dans les services de chirurgie sont les plus exposés aux risques d'infections nosocomiales fongiques.

Nous constatons également que les souches isolées appartiennent toutes au genre *Candida*, il s'agit de *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida parapsilosis*. Néanmoins, une dominance de l'espèce *C. glabrata* est observée au CHU de Sidi bel Abbès. En effet, au service de réanimation-anesthésie, neuf souches de *Candida glabrata* sont isolées soit un taux de 14,28%. Le service de chirurgie générale occupe la deuxième place avec cinq souches (10,64 %). Les taux de *Candida glabrata* isolées des services de d'urologie, de chirurgie infantile et de gastro-entérologie sont respectivement de 6,97 %, 4,44 % et 4,54 %. Une seule souche est isolée des services de pneumo-phtisiologie ainsi que de neurochirurgie avec des taux respectifs de 2,38 % et 2,27 %.

Aucune souche de *C. glabrata* n'est isolée des services d'endocrinologie, d'hématologie clinique et de traumatologie.

Onze (11) souches de *Candida albicans* sont isolées du CHU de Sidi Bel Abbès soit un taux de 29,73 %. Ces souches se répartissent comme suit : Trois souches isolées du service de réanimation-anesthésie (4,76 %) et d'endocrinologie (7,32 %). Deux souches du service de Chirurgie Générale avec un taux de 4,25 % et une seule souche est isolée des services de pneumo-phtisiologie, d'hématologie clinique et de traumatologie, avec des taux respectifs de 2,38%, 2,32 % et 2,22 %. Cette espèce n'est pas isolée dans les autres services. Nous rappelons que cette même espèce était responsable d'une infection nosocomiale buccale chez le cas patient cité précédemment.

L'espèce *Candida parapsilosis* est celle qui représente la plus faible fréquence d'isolement au CHU de Sidi Bel Abbès où seulement trois souches sont isolées, deux du service de traumatologie soit un taux de 4,44 % et une seule souche du service de pneumo-phtisiologie (2,38 %).

Des études antérieures ont classé *C. albicans* comme étant l'agent étiologique le plus souvent isolé lors de candidémie nosocomiale [(Sahiner et coll., 2011) ; (Das et coll., 2011)]. Cependant, au cours des deux dernières décennies, nous assistons à l'émergence des espèces non-albicans. Ces dernières sont majoritaires dans les candidémies nosocomiales liées aux cathéters [(Ruan et coll., 2009) ; (Abbès et coll., 2011)].

L'épidémiologie des candidoses s'est considérablement modifiée ces dernières années avec l'apparition de nouvelles espèces (Develoux et Bretagne, 2005). En effet, Pfaller et Diekema (2007) ont mis en évidence la régression de la fréquence des isolats cliniques de *C. albicans* devant les espèces non-albicans. De plus, Bassetti et coll. (2011), Ferreira et coll. (2013) ainsi que Kaur et coll. (2014) ont révélé que les isolats cliniques des espèces non-albicans de *Candida* sont plus importants que ceux de *C. albicans*. D'un autre côté, *C. parapsilosis* est devenue une des principales causes de candidémie nosocomiale cette dernière décennie. Cette espèce est souvent isolée dans les hôpitaux, elle se classe au troisième rang en termes de cause de candidémie [(Pfaller et coll., 2001) ; (Trofa et coll., 2008)].

À l'inverse de *Candida glabrata* qui a une écologie proche de celle de *C. albicans*, *C. parapsilosis* est une levure fréquente de la peau mais non du tube digestif, et expose par conséquent, les patients aux risques de contaminations manuportées (Develoux et Bretagne, 2005). L'isolement de cette espèce est fortement associé à une infection du cathéter [(Anaissie et coll., 1998) ; (Pires et coll., 2011)].

En revanche, selon une enquête multicentrique dans des hôpitaux français non universitaires réalisée par Éloy et coll., (2006), l'espèce *Candida albicans* est dominante, suivie de *C. glabrata*, ensuite de *C. tropicalis* et enfin *C. parapsilosis*. En 2004, Ben-Abraham et ses collaborateurs ont montré que le taux de mortalité le plus élevé est associé à l'espèce *Candida glabrata* malgré la prédominance de *Candida albicans*.

A travers toutes ces analyses fongiques, nous constatons que l'ensemble des dispositifs médicaux étudiés étaient contaminés, colonisés et infectés par une seule espèce de levure. Ce résultat est rarement retrouvé sur les dispositifs médicaux cliniques puisque, plusieurs travaux dont ceux de Paulitsch et ses

collaborateurs (2009) ont isolés à partir du même cathéter différentes espèces de levures (*C. albicans* et *C. glabrata*).

### **3. Types d'infectivités fongiques selon les espèces identifiées**

Les résultats relatifs à la répartition des souches isolées au CHU de Sid Bel Abbès en fonction des différents types d'infectivités fongiques des cathéters sont regroupés dans la figure N° 8.

Nous remarquons que les contaminations des cathéters sont dominantes au CHU de Sidi Bel Abbès avec un taux de 55,56 %. Elles sont liées essentiellement à l'espèce *Candida glabrata* (33,33 %). La deuxième espèce incriminée dans ce type d'infectivité est *C. albicans* avec un taux de 16,66 %. L'espèce *C. parapsilosis* n'est responsable que de 5,55 % de contaminations.

Les colonisations des cathéters au CHU de Sidi Bel Abbès sont moins importantes que les contaminations (30,56 %). 22,23 % des cathéters sont colonisés par l'espèce *C. glabrata*, 5,56 % par *C. albicans* et 2,78 % seulement sont causées par *C. parapsilosis*.

Le taux d'infection des cathéters est de 13,88 % où les espèces *C. glabrata* et *C. albicans* sont responsables respectivement de 8,33 % et 5,56 % de ce type d'infectivité.

L'analyse hiérarchique des variables (CAH) affiche des clusters représentant un pourcentage de similitude des différents types d'infectivités fongiques vis-à-vis des trois espèces isolées au CHU de Sidi Bel Abbès (Figure N° 9). Les détails statistiques sont représentés dans l'annexe 5.

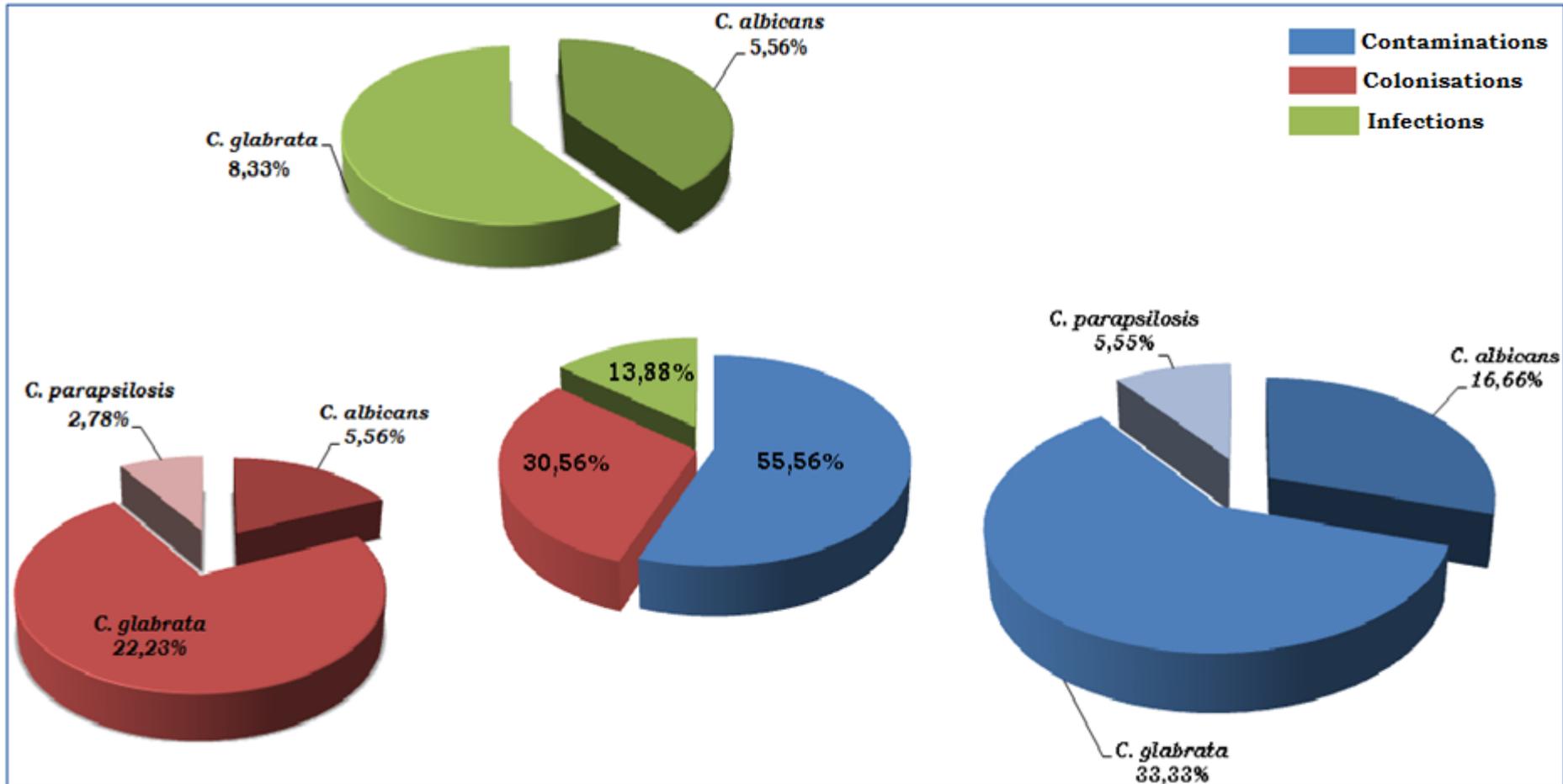
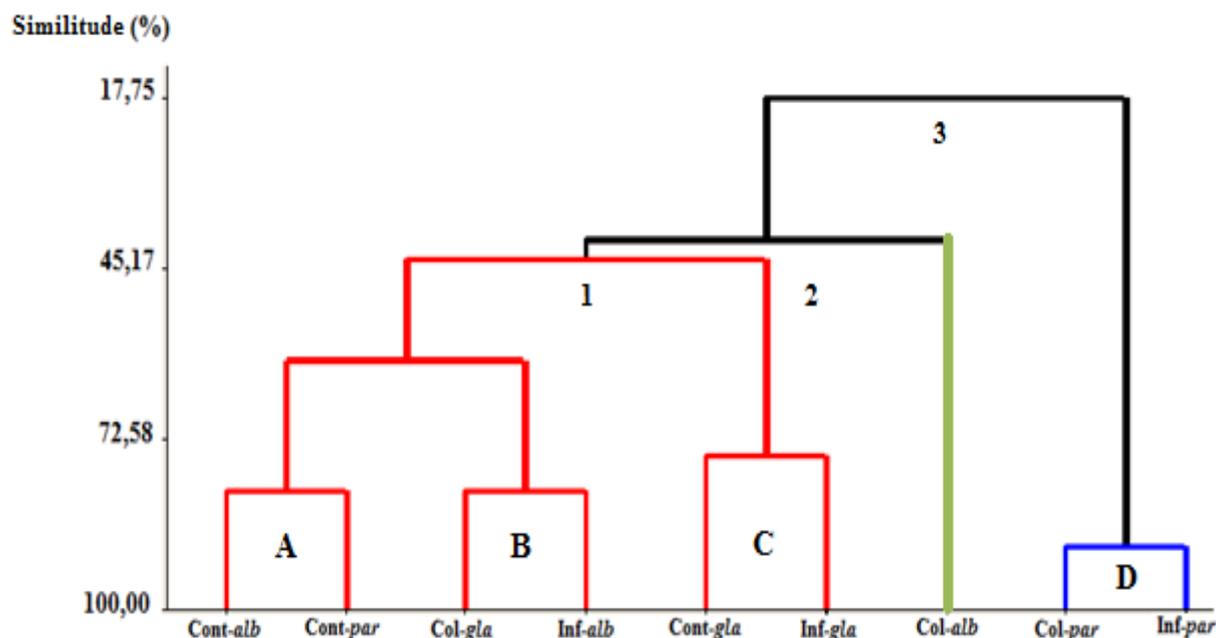


Figure N° 8 : Différents types d'infektivités fongiques des cathéters au CHU de Sidi Bel Abbès.



**Figure N° 9 :** Dendrogramme de similitude des différents types d'infectivités fongiques vis-à-vis des trois espèces isolées au CHU de Sidi Bel Abbès.

**Cont :** Contamination du cathéter, **Col :** Colonisation du cathéter, **Inf :** Infection du cathéter. **alb :** *C. albicans*, **gla :** *C. glabrata*, **par :** *C. parapsilosis*.

Selon ce dendrogramme, nous pouvons distinguer trois groupes (1,2 et 3). Le groupe 1 (rouge) où une similitude est remarquée entre les contaminations des cathéters par les deux espèces *C. albicans* et *C. parapsilosis*, d'une part (cluster A) ; et entre les colonisations par l'espèce *C. glabrata* et les infections par *C. albicans* d'autre part (cluster B), avec des niveaux de similitude respectifs de 81,16% et 81,12%. En revanche, un niveau de similitude de 75,41% est enregistré entre les contaminations des cathéters par *C. glabrata* et les infections par la même espèce (cluster C). Le groupe 3, le cluster D (bleu) marque une importante similitude (90,41%) des colonisations des cathéters par *C. parapsilosis* et leurs infections par la même espèce.

Par ailleurs, un niveau de similitude inférieur à 50% est enregistré entre les groupes 1 (rouge) et 2 (vert).

Nos résultats révèlent également que les contaminations représentent le type d'infectivité fongique dominant vis-à-vis du sexe des patients, surtout chez les hommes, malgré cela il n'y a aucune différence significative entre les types d'infectivités fongiques ( $P = 0,1$ ).

Ces résultats concordent avec ceux de Chow et ses collaborateurs en 2008. Ces auteurs n'ont observé aucune différence significative quant au sexe des patients. Par contre, Paulitsch et coll., (2009) ont signalé que les isolats cliniques de *Candida* sp. à partir des cathéters sont significativement positifs chez les hommes.

#### **4. Evaluation de la capacité de *Candida* sp. à former des biofilms**

Les biofilms de *Candida* sp. constituent un problème majeur de santé publique par leur résistance aux doses cliniques usuelles (**LaFleur et coll., 2006**). La présence du biofilm sur le matériel médical peut être la cause d'un échec de fonctionnement du matériel (**Douglas, 2002**).

Il s'avère que *Candida* sp. peut former des biofilms sur presque tous les dispositifs médicaux actuellement utilisés, y compris les cathéters (**Ramage, 2006**). Par conséquent, la plupart des manifestations de la candidose sont associées à leur formation [(**Miao et coll., 2007**) ; (**Pierce et coll., 2008**)].

Cette capacité est fortement associée à la virulence des biofilms des espèces de *Candida* et à leur capacité d'aggraver significativement l'infection chez les patients hospitalisés, ce qui accroît le risque de mortalité [(**Tumbarello et coll., 2007**) ; (**Muni et coll., 2012**)].

Cette partie de notre étude vise à évaluer, *in vitro*, la résistance de *Candida* sp. au sein du biofilm (cellules sessiles) et de leurs homologues planctoniques vis-à-vis de deux antifongiques l'amphotéricine B et le fluconazole.

#### 4.1. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Le tableau N° 4 regroupe les résultats des CMI de l'amphotéricine B et du fluconazole vis-à-vis des souches de références (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 26790 et *C. albicans* IP 444) et des souches isolées des patients hospitalisés au CHU de Sidi Bel Abbès.

Nous avons suivi le protocole décrit par le CLSI M27-A3 en 2008. L'annexe 8 regroupe les détails des CMI de l'amphotéricine B et du fluconazole.

Nous remarquons que la CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références passe de 0,5 µg/mL pour *Candida albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* IP 444 à 1µg/mL pour *C. albicans* ATCC 26790. Les CMI du fluconazole sont identiques pour les trois souches de références. Elles sont égales à 4 µg/mL.

Boucherit-Atmani et coll., (2011) ont signalé que les CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis de *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* IP 444 sont de 0,5 et 1 µg/mL. Or, pour Zore et coll., (2010), la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 est résistante au fluconazole avec une CMI ≥ 64 µg/mL.

Pour les souches isolées, les CMI de l'AmB varient de 0,25 à 2 µg/mL. Seize (16) souches ont des CMI comparables à celles des souches de références, 19 souches ont des CMI égales à 0,25 µg/mL et seulement deux souches ont des CMI de 2 µg/mL. Ces CMI restent dans l'intervalle des CMI établies par Hammond en 1977. Il est à noter que selon les recommandations de CLSI (2008), les souches de *Candida* sp. sont résistantes à l'AmB si leurs CMI sont supérieures à 2 µg/mL.

D'autre part, les CMI du fluconazole vis-à-vis des souches isolées varient de 0,5 à 16 µg/mL. 31 souches isolées ont des CMI supérieures à celles des souches de références dont 19 souches ont des CMI de 16 µg/mL et 12 souches avec des 8 µg/mL. En revanche, 6 souches ont des CMI nettement inférieures à celles des souches de références. Malgré ces observations, le seuil de résistance n'est pas atteint par les souches isolées puisque *Candida* sp. n'est qualifiée de résistante à cet antifongique que si sa CMI est ≥ 32 µg/mL (**EUCAST, 2012**).

**Tableau N° 4 :** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de l'amphotéricine B et du fluconazole vis-à-vis des souches de références et des souches isolées, selon le protocole de CLSI M27-A3 (2008).

<b>Souches (nombre)</b>	<b>CMI de l'AmB (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>CMI du FLC (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	4
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	1	4
<i>C. albicans</i> 444 IP	0,5	4
19	0,25	16
4	1	8
2	2	0,5
8	0,5	8
4	0,5	1

Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'Éloy et ses collaborateurs (2006) qui ont montré que les CMI de l'AmB varient de 0,047 à 1 µg/mL, alors que celles du fluconazole sont comprises entre 0,125 et 256 µg/mL. De plus, Mascellino et coll., (2012) ont montré que les CMI de l'AmB vis-à-vis de *Candida* sp. varient de 0,125 à 0,25µg/mL, alors que celles du fluconazole sont égales à 0,25 µg/mL pour *Candida albicans*, 8 µg/mL pour *C. glabrata* et 1 µg/mL pour *C. parapsilosis*.

Selon Timsit et coll., (2003), *C. albicans* est habituellement sensible au fluconazole contrairement à *C. glabrata* qui est inconstamment sensible à cet antifongique. C'est pourquoi, la sensibilité de *C. glabrata* à l'ensemble des dérivés azolés doit être soulignée et devra être surveillée **(Éloy et coll., 2006)**.

L'utilisation extensive du fluconazole durant les deux dernières décennies a induit une émergence de souches résistantes des espèces non-albicans de *Candida*, particulièrement, *C. glabrata* **(Déry et Hasbun, 2011)**.

#### **4.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI)**

La résistance des biofilms de *Candida* sp. a été mise en évidence pour la première fois en 1995 par Hawser et Douglas.

*Candida* sp. forme le biofilm, celui-ci accroît l'adhérence de la levure au cathéter et lui confère des propriétés de résistance aux antifongiques **(Gallien et coll., 2007)**.

Le tableau N°5 regroupe les résultats des SCMI de l'AmB et du fluconazole, selon le protocole de Pierce et coll., (2008), vis-à-vis des souches de références (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 26790 et *C. albicans* IP 444) et des souches isolées. L'annexe 8 regroupe les détails des SCMI de l'amphotéricine B et du fluconazole.

Il ressort de ce tableau que les SCMI<sub>50</sub> de l'AmB vis-à-vis des souches de références sont comprises entre 1 et 2 µg/mL. Les SCMI<sub>80</sub>, quant à elles, varient de 4 à 8 µg/mL. Les SCMI sont nettement supérieures aux CMI.

Pour le fluconazole, les SCMI<sub>50</sub> vis-à-vis des souches de références sont comprises entre 4 et 8 µg/mL ; cependant, les SCMI<sub>80</sub> varient entre 16 et 32µg/mL. Ces résultats sont supérieurs aux CMI obtenues par le protocole du CLSI M27-A3 (Tableau N° 5).

Selon Ramage et coll. (2001b), l'accroissement des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques témoigne de leur capacité à former des biofilms. De plus, d'Enfert (2006) a montré que les biofilms de *Candida* sp. sont plus résistants que leurs homologues planctoniques. De ce fait, les trois souches de références sont capables de former les biofilms.

Pour les souches isolées des différents services du CHU de Sidi Bel Abbès, les SCMI<sub>50</sub> de l'AmB varient de 0,25 à 2 µg/mL, alors que les SCMI<sub>80</sub> sont comprises entre 0,25 et 4µg/mL. En revanche, les SCMI<sub>50</sub> du fluconazole varient de 0,25 à 32 µg/mL. Les SCMI<sub>80</sub> vont de 0,0625 à 64 µg/mL.

Trente et une (31) souches isolées (83,78%) possèdent la capacité de former les biofilms. En revanche, 6 souches isolées de *Candida glabrata* en sont dépourvues.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Cuéllar-Cruz et ses collaborateurs (2012), qui ont montré que *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* peuvent former les biofilms sur tous les dispositifs médicaux implanté chez l'homme.

De même, Ferreira et coll. en 2013 ont observé que 100 % des isolats cliniques de *Candida* sp. avaient le potentiel de former les biofilms.

La formation des biofilms est une caractéristique stable et inhérente des souches de *Candida*. Elle varie considérablement entre les souches cliniques, allant de faible à élevée **[(Shin et coll., 2002) ; (Jain et coll., 2007) ; (Tumbarello et coll., 2007)]**. C'est pourquoi, Wesenberg-Ward et coll., (2005) ont signalé que la relation entre le taux d'adhésion initiale et la formation à long terme des biofilms de *Candida* sp. est encore très controversée.

**Tableau N° 5** : SCMI de l'AmB et du FLC vis-à-vis des souches de références et des souches isolées selon le protocole de Pierce et coll., (2008).

Souches (nombre)	SCMI de l'AmB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		SCMI du FLC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	SCMI <sub>50</sub>	SCMI <sub>80</sub>	SCMI <sub>50</sub>	SCMI <sub>80</sub>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	4	4	16
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	1	4	8	32
<i>C. albicans</i> 444 IP	2	8	4	16
11	1	2	32	64
5	1	4	8	32
6	2	4	0,5	0,5
3	0,25	0,5	8	16
4	0,5	0,5	0,5	1
1	0,5	1	4	16
5	0,25	4	0,25	0,0625
2	0,5	0,25	4	4

La formation des biofilms par *Candida* sp. augmente de manière significative les niveaux de résistance aux antifongiques classiques **[(Coogan et coll., 2006) ; (Shuford et coll., 2006 et 2007) ; (Seneviratne et coll., 2008) ; (Hasan et coll., 2009)]**.

Les SCMI de l'AmB que nous avons obtenu sont trente deux (32) fois plus élevées que les CMI, alors qu'elles sont cent vingt huit (128) fois plus élevées pour le fluconazole.

Ces résultats ainsi que ceux de Bell, (2001), Mukherjee et Chandra (2004) et Seneviratne et coll., (2008), peuvent expliquer un certain nombre d'échecs thérapeutiques dans la prise en charge des mycoses systémiques. Selon ces auteurs, les SCMI des antifongiques vis-à-vis des biofilms à *Candida* sp. sont 15 à 1000 fois plus élevées que celles calculées pour les cellules planctoniques. Elles sont, pour Hawser et Douglas (1995), 30 à 2000 fois plus élevées.

Selon Douglas (2002), l'amphotéricine B est moyennement efficace contre les biofilms de *Candida* sp. contrairement au fluconazole qui ne présente aucune activité thérapeutique. En effet, à des concentrations supérieures à sa marge thérapeutique, l'AmB a un effet inhibiteur sur les cellules sessiles de *Candida* sp. **[(Ramage et coll., 2002a) ; (Blankenship et Mitchell, 2006)]**.

Mateus et coll., (2004) ont montré que la fixation des levures sur un support solide de silicone induit immédiatement une augmentation de la résistance au fluconazole par surexpression des pompes à efflux.

De même, Sanguinetti et coll., (2005) ont associé la résistance des biofilms des isolats cliniques de *C. glabrata* au fluconazole à la surexpression des pompes à efflux.

## **5. Observation des biofilms au microscope électronique à balayage**

La plupart des manifestations cliniques fongiques qui sont en rapport avec l'utilisation des cathéters sont liées à la formation des biofilms [(Martinez et Fries, 2010) ; (Bonhomme et d'Enfert, 2013)].

Le diagnostic du cathéter retiré et la recherche de levures sont améliorés en réalisant un examen en microscopie électronique à balayage (Gallien et coll., 2007). La structure tridimensionnelle du biofilm est importante pour comprendre la physiologie et l'écologie de ce système microbien (Harrison et coll., 2006). C'est pourquoi, nous avons jugé utile d'effectuer des observations en microscopie électronique à balayage de segments de cathéters susceptibles de contenir des biofilms.

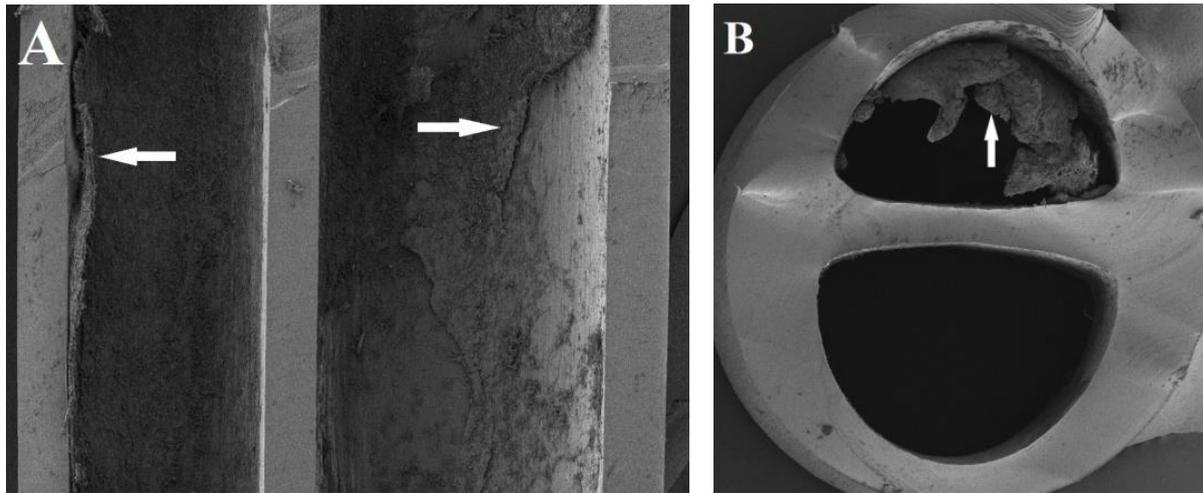
L'imagerie électronique est réalisée par le professeur Dennis Kunkel à l'université de Hawaii, Etats Unis d'Amérique (2012).

### **5.1. Cathéter veineux central**

La photo N° 1 représente les images de la microscopie électronique à balayage du biofilm formé par la souche *C. albicans* "RFKTC3". Cette souche, adhérant à la surface interne d'un cathéter veineux central, est prélevée après un temps de pose de huit jours d'une patiente hospitalisée dans le service de réanimation-anesthésie.

Nous remarquons la présence d'un film biologique qui adhère à la face interne du cathéter central.

Cette observation va dans le même sens que celle de Crump et Collignon, (2000), qui ont montré que presque tous les cathéters veineux centraux peuvent avoir des microorganismes intégrés en biofilm dans leurs lumières internes après un temps de pose supérieur à 8 jours.



**Photo N° 1 :** Microscopie électronique à balayage d'une coupe (A) longitudinale, (B) transversale d'un cathéter veineux central contaminé, dans sa face interne, par la souche *C. albicans* "RFKTC3". Temps de pose du cathéter est de 8 jours. Les flèches indiquent les cellules dans le biofilm formé sur la paroi du cathéter (Grossissement  $\times 35$ ).

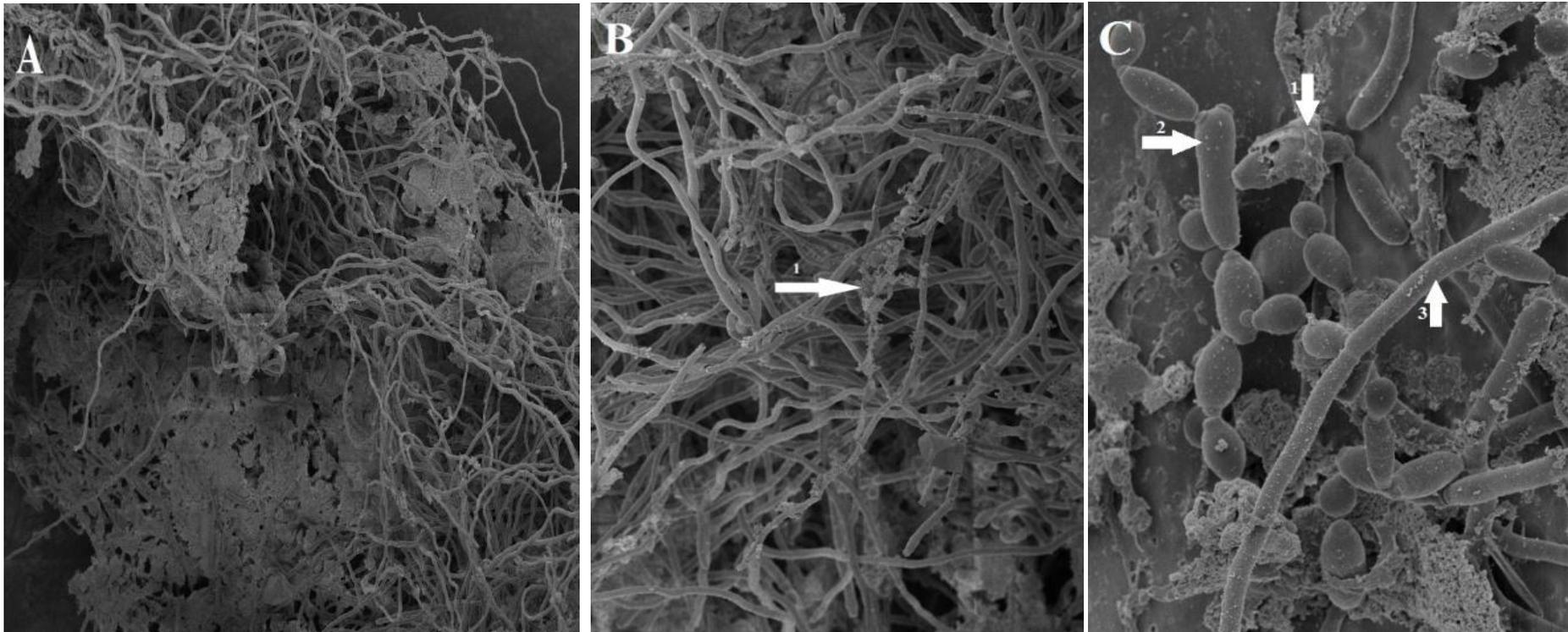
Par ailleurs, l'observation de ce même cathéter à des grossissements plus importants montre clairement l'architecture tridimensionnelle du biofilm (Photo N° 2).

En effet, au grossissement  $\times 450$  (Photo N° 2A), nous constatons que le biofilm est caractérisé par un important chevauchement entre les hyphes et la matrice extracellulaire (MEC). Cette architecture est formée de deux couches hétérogènes, une couche basale constituée essentiellement de blastospores et une seconde couche qui est envahie par les hyphes.

Lorsque le cathéter est examiné avec un grossissement de  $\times 1100$  (Photo N° 2B), la structure tridimensionnelle du biofilm révèle l'existence de cellules de levures et d'un réseau dense d'hyphes.

Cependant, l'architecture tridimensionnelle du biofilm est beaucoup plus claire au grossissement  $\times 4500$ . Les levures, les pseudohyphes, les hyphes ainsi que la matrice extracellulaire sont bien distincts (Photo N° 2C).

Rappelons que dans un biofilm mature, *Candida albicans* peut exister sous forme de levures, d'hyphes ou de pseudohyphes [(Baillie et Douglas, 1998) ; (Alem et coll., 2006)].



**Photo N° 2 :** MEB d'une mixture morphologique du biofilm mature de la souche *C. albicans* "RFKTC3" isolée du service de réanimation-anesthésie. Le biofilm est formé sur la face interne du cathéter veineux central. Les flèches indiquent : (1) matrice extracellulaire, (2) pseudohyphe et (3) hyphe. (Grossissements A  $\times$  450, B  $\times$  1100 et C  $\times$  4500)

Nos résultats sont en accord avec ceux de Baillie et Douglas (1999), Kumamoto (2002) et Kuhn et coll., (2002a) qui ont montré que la couche basale des biofilms de *C. albicans* est constituée de levures. Cette couche a un rôle important dans l'ancrage du biofilm à la surface des cathéters, ajoutent les mêmes auteurs.

De plus, Douglas en 2002, a signalé aussi que les biofilms de *Candida albicans* sont arrangés en bicouches, une couche basale constituée essentiellement de cellules de levures et une couche supérieure formée d'hyphes et de pseudohyphes. Selon Chandra et ses collaborateurs (2008), les biofilms de *C. albicans* sont organisés en mosaïque de blastospores, d'hyphes et de pseudohyphes.

### **5.2. Cathéter veineux périphérique**

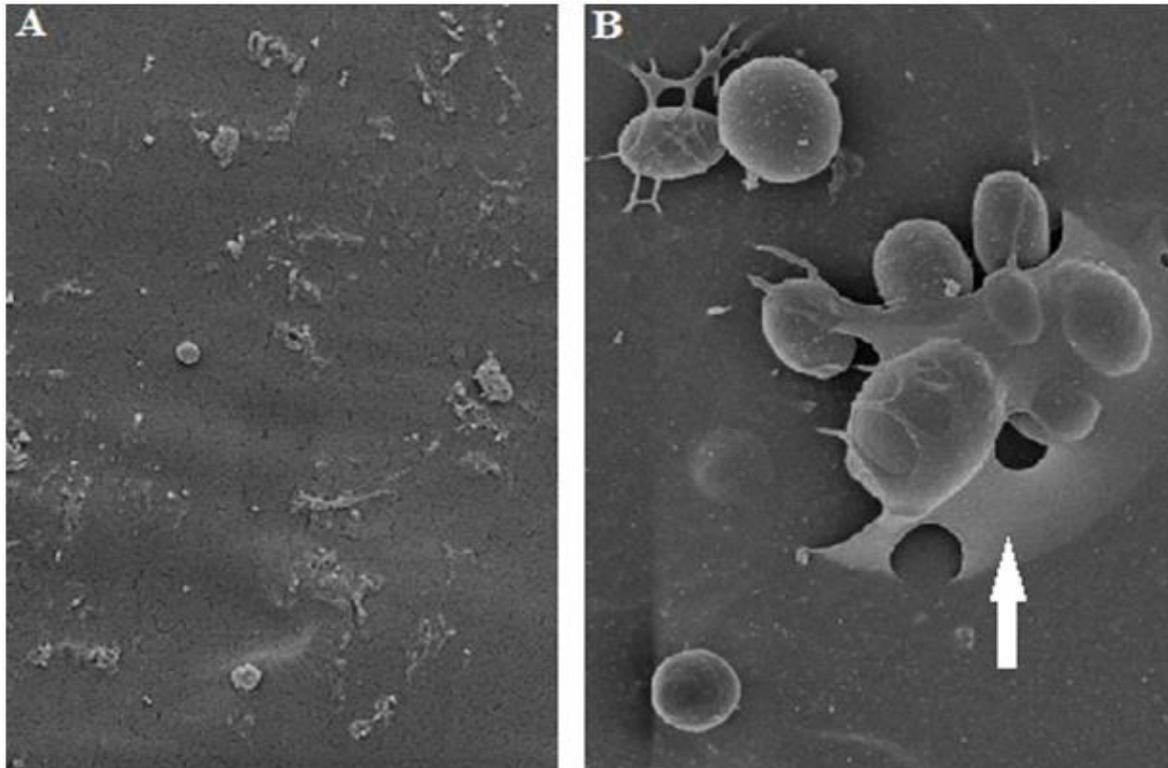
La photo N° 3 met en évidence les premières étapes de la formation des biofilms de *Candida* sp. sur les faces interne et externe des cathéters veineux périphériques.

Le cathéter est prélevé du service de chirurgie générale du CHU de Sidi Bel Abbès après un temps de pose de trois jours.

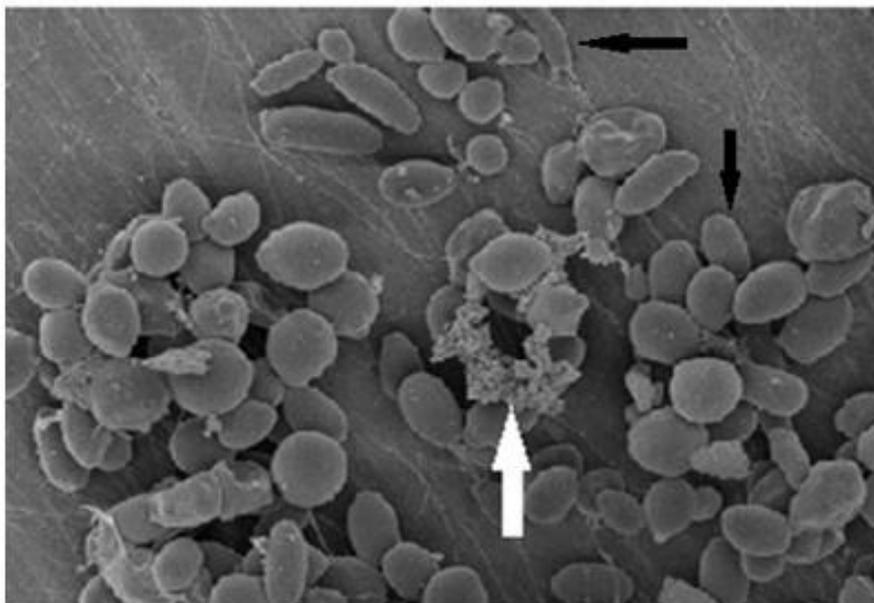
Il ressort de cette photo que :

- La face externe de ce cathéter n'est pas contaminée et n'héberge aucune forme de levure (Photo N° 3A).
- La face interne renferme des blastospores de *C. albicans* "CFKT3" qui entament la formation d'un biofilm (phase initiale d'adhésion). La matrice extracellulaire se développe et entoure le biofilm jeune (Photo N° 3B).

La photo N 4 représente un biofilm formé par *C. parapsilosis* "THKT2" sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique provenant du service de traumatologie. La formation des micro-colonies est clairement visible.



**Photo N° 3 :** MEB de (A) face externe d'un cathéter non colonisé, (B) phases précoces de la formation du biofilm de *C. albicans* "CFKT3" sur la face interne du même cathéter. Temps de pose du cathéter est de 3 jours. Les flèches indiquent la matrice extracellulaire (Grossissements A  $\times$  15000, B  $\times$  6000).



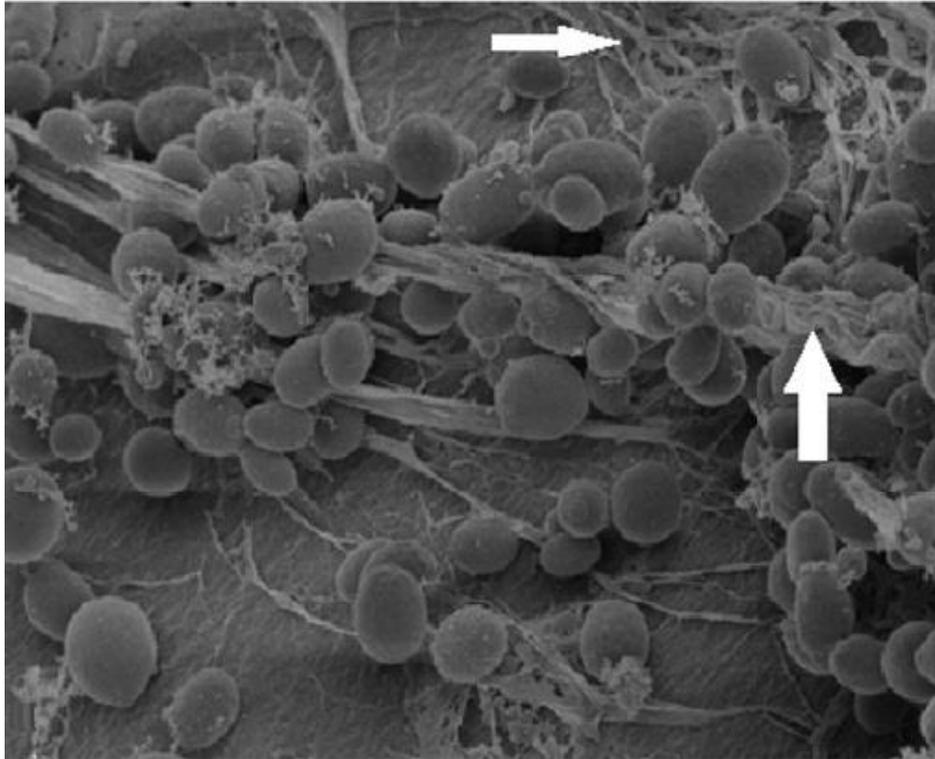
**Photo N° 4 :** Division cellulaire de *C. parapsilosis* "THKT2" et formation des micro-colonies sur la face interne d'un cathéter veineux périphérique après un temps de pose de 4 jours. La flèche blanche indique la matrice extracellulaire, les flèches noires indiquent les pseudohyphes (Grossissement  $\times$  3000).

Pour la souche *C. glabrata* "RFKT1", isolée du service de réanimation-anesthésie, la structure du biofilm est visible en microscopie électronique à balayage (Photo N° 5). Le biofilm s'est développé sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique. Il est formé de blastospores emboîtées dans une matrice extracellulaire.

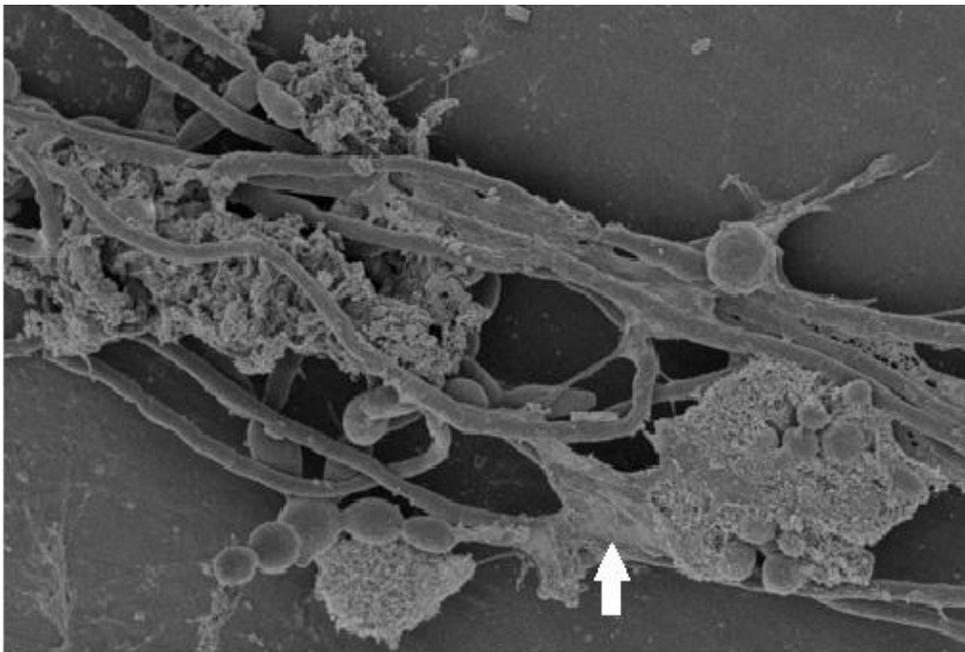
La photo N° 6 représente un biofilm formé par la souche *C. albicans* "HFKT1" isolée d'un cathéter veineux périphérique provenant du service d'hématologie clinique. Les prolongements des hyphes du biofilm sont tendus sur la face interne du cathéter. Les cellules de levures et la matrice extracellulaire sont nettement identifiables.

La microscopie électronique à balayage fournit des images détaillées de la topographie de la surface des biofilms à fort grossissement, malheureusement, elle implique la dégradation de la matrice extracellulaire en raison des mesures effectuées au cours de la préparation de l'échantillon (fixation et déshydratation au laboratoire d'imagerie électronique) **(Chandra et coll., 2008)**. En effet, les biofilms de *Candida* sp. sont des consortiums fonctionnels de cellules fongiques enveloppées dans des matrices organiques de polymères extracellulaires. Leur composition est plus ou moins complexe en fonction du genre et de l'espèce considérée. Ils sont fermement attachés sur la paroi d'un support solide **[(Bachmann et coll., 2002) ; (Mukherjee et coll., 2005)]**.

En 2007, Vinitha et Ballal ont montré que la production de la matrice extracellulaire diffère d'une espèce de *Candida* à une autre. En revanche, Sanchez et coll., (1993) ont signalé que la production de la matrice extracellulaire chez *Candida parapsilosis* est un facteur de virulence.



**Photo N° 5 :** MEB de la morphologie du biofilm de *C. glabrata* "RFKT1" développée sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique provenant du service de réanimation-anesthésie après un temps de pose de 2 jours. Les flèches indiquent la matrice extracellulaire (Grossissements  $\times 4500$ ).



**Photo N° 6 :** MEB de la morphologie du biofilm de *C. albicans* "HFKT1" développé sur la face interne d'un cathéter vasculaire périphérique provenant du service d'hématologie après un temps de pose de 5 jours. La flèche indique la matrice extracellulaire (Grossissement  $\times 2000$ ).

### **5.3. Etude d'un cas patient**

En plus des observations des cathéters veineux centraux et périphériques au microscope électronique à balayage, nous avons analysé également un cathéter oro-bronchique prélevé d'une patiente âgée de 64 ans séjournant depuis plus de six semaines dans le service de réanimation-anesthésie.

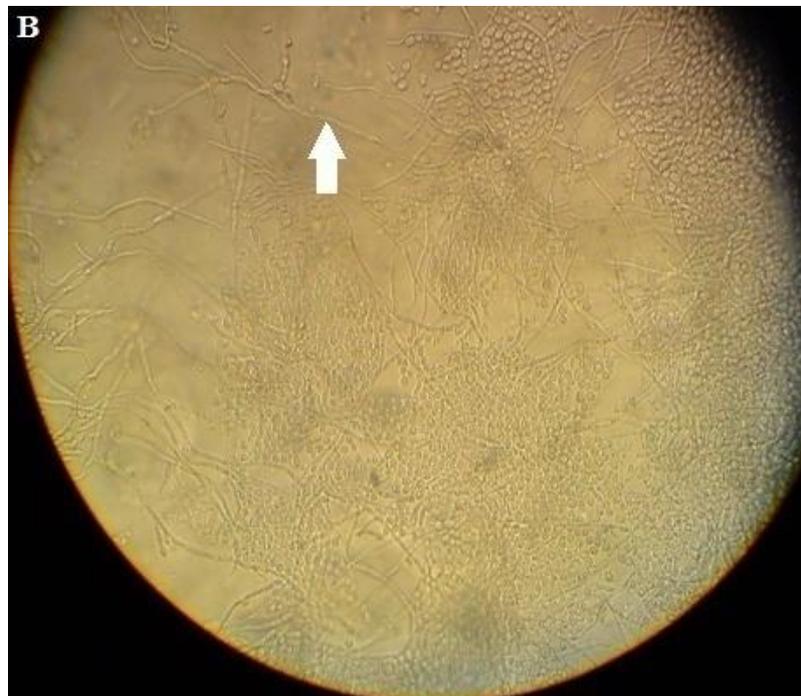
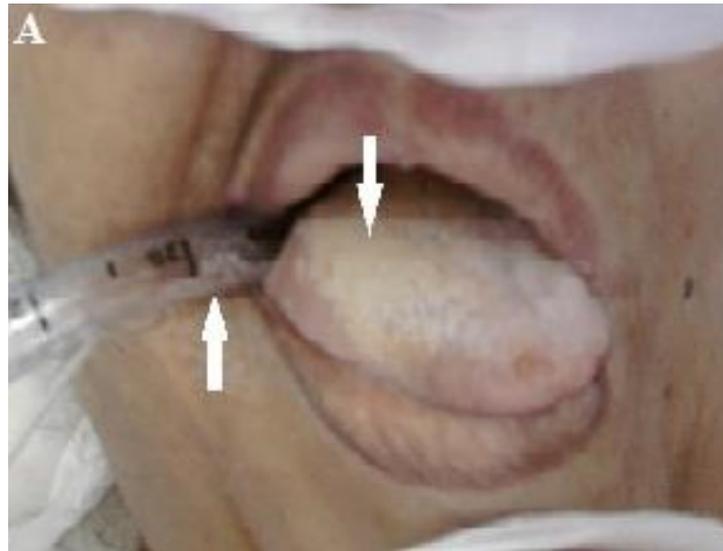
La patiente était diabétique insulino-dépendante et souffrant de méningo-encéphalite. Elle était sous antibiotiques (gentamicine et céphalosporine) et un antalgique (paracétamol).

Les photographies sont prises après avoir obtenu l'accord du chef de service et des membres de la famille de la patiente.

Comme le montre la photo N° 7A, le cathéter oro-bronchique est introduit à proximité d'un tapis blanc revêtant la face dorsale de la langue de cette patiente.

L'écouvillonnage de ce tapis blanc, suivi de son observation au microscope optique, a révélé des blastospores ainsi que des prolongements d'hyphes (Photo N° 7B). L'incubation de l'écouvillon a permis d'identifier *Candida albicans* "RFLG1".

La même espèce est isolée à partir du cathéter oro-bronchique, ce qui laisse supposer qu'une propagation probable s'est produite entre le biofilm formé sur la face interne du cathéter et les levures de *Candida albicans* tapissant la face dorsale de la langue de la patiente.



**Photo N° 7 :** Photographies de : (A) Face dorsale de la langue d'une patiente en réanimation-anesthésie recouverte par l'espèce *C. albicans* avec, à proximité, un cathéter oro-bronchique implanté et infecté par la même espèce. (B) Microscopie optique de *C. albicans* suite à l'écouvillonnage de la de la langue de la patiente.

Les flèches indiquent : (A) cathéter oro-bronchique et tapis blanc de *C. albicans*, (B) hyphes (Grossissement  $\times 400$ ). Photographie prise par une camera digitale, 3.2 méga pixel. Samsung, Model: GT-S5230 (CHU de Sidi Bel Abbès, 2012)

La photo N° 8A correspond à un des orifices qui se trouvent au niveau du cathéter oro-bronchique. Ces orifices peuvent être responsables de l'interaction entre le biofilm de *C. albicans*, attaché à la face interne du cathéter, et les levures appartenant à la même espèce, revêtant la face dorsale de la langue de la patiente.

La candidose oro-pharyngée est une infection opportuniste survenant souvent chez les patients immunodéprimés. En effet, la face dorsale de la langue constitue un abri écologique humain idéal pour des niches microbiennes [(Roldán et coll., 2003) ; (Nairy et coll., 2011)]. Cependant, l'apparition et le rythme de la prolifération microbienne dépendent de leurs facteurs de virulences, du statut immunitaire de l'hôte et des caractéristiques du cathéter (Crump et Collignon, 2000).

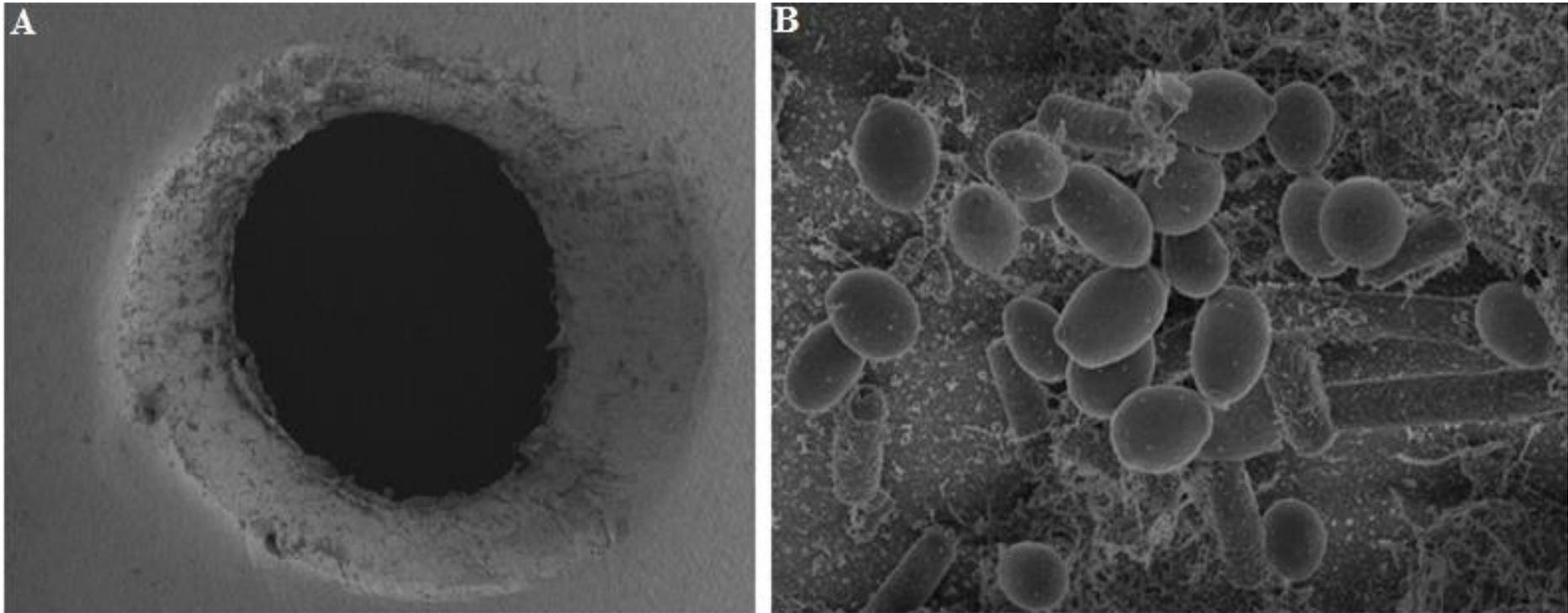
En 2011, Shoham a montré que la pathogénie et l'infection dues à *Candida* sp. sont en relation avec l'altération des barrières anatomiques suite à l'utilisation des implants médicaux, les facteurs de l'immunité de l'hôte et de la tendance de cette levure à former les biofilms sur des surfaces inertes.

La photo N° 8B représente l'observation du cathéter oro-bronchique au grossissement × 6000. Le biofilm de *Candida albicans* adhérant à la face interne de ce dernier est nettement visible avec l'existence des formes de levures et d'hyphes, en plus de la matrice extracellulaire.

*C. albicans* est capable de coloniser différentes surfaces buccales aboutissant à la candidose buccale qui se présente cliniquement sous de nombreuses formes (Cannon et coll., 1995).

Ce résultat est en accord avec ceux de Javed et coll., (2009) qui ont rapporté que la colonisation de la voie orale par *C. albicans* augmente considérablement chez les patients diabétiques, en particulier chez les femmes.

Nous avons noté également que les patients sont traités avec des agents antibactériens à large spectre. Or, selon Ha et ses collaborateurs (2011), la colonisation par *Candida* sp. est fortement liée à l'usage d'une antibiothérapie à large spectre.



**Photo N° 8 :** Microscopie électronique à balayage de : (A) orifice au niveau du cathéter oro-bronchique provenant du service de réanimation-anesthésie après un temps de pose de 3 jours, (B) biofilm mature de *C. albicans* attaché à la face interne du même cathéter (Grossissement, A :  $\times 60$ , B :  $\times 6000$ ).

Récemment, Ramage et ses collaborateurs (2014), ont montré que les biofilms fongiques sont ubiquitaires et se localisent sur toute la surface de l'hôte, y compris la cavité buccale.

Ces biofilms peuvent affecter la langue des patients et provoquer des candidoses buccales **(Williams et coll., 2011)**. Ils apparaissent comme une substance de mousse blanche fixée à la surface de la langue ou de la muqueuse orale **[(Yang et coll., 2006) ; (Hoshi et coll., 2011)]**.

Les biofilms de *C. albicans* contribuent également à la pathogenèse de la candidose buccale **(Veyssier et coll., 1998)**. Leur présence sur la surface d'implants médicaux peut constituer un facteur de risque persistant **(Boucherit-Atmani et coll., 2011)**.

En effet, les cellules fongiques ont la capacité d'adhérer non seulement aux tissus humains, mais aussi à tous les dispositifs invasifs **(Verstrepen et coll., 2004)**, puisque la première étape de la formation des biofilms de tous les microorganismes est l'adhérence aux surfaces des biomatériaux ou des cellules de l'hôte **(Cuéllar-Cruz et coll., 2012)**.

## *Quatrième partie*

---

# **Conclusion Générale**

Au cours de ces dernières décennies, la fréquence des candidoses systémiques ou profondes a fortement augmentée. Ces infections sont associées à une morbidité et une mortalité élevées en raison de l'utilisation croissante de nouvelles thérapies immunosuppressives, de radiothérapie, d'antibiothérapie large spectre et de procédures invasives (cathéters, matériels prothétiques...).

Si l'espèce *Candida albicans* reste le principal agent responsable de ces mycoses (50 à 70 % des infections), une fréquence accrue des espèces non *albicans* a été rapportée (**Pfaller et coll., 2007**).

Par ailleurs, la formation de biofilms sur la surface des dispositifs médicaux est un élément fondamental dans la survenue de ces infections.

Partant de ces données nous avons entrepris cette étude qui vise à déterminer les différents types d'infectivités fongiques sur dispositifs médicaux au CHU de Sidi Bel Abbès, isoler les espèces de levures responsables de ces infections et évaluer leur potentiel à former des biofilms en testant leurs sensibilités à l'amphotéricine B et au fluconazole.

Nos travaux nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

Trois types d'infectivités fongiques des dispositifs médicaux sont recensés au CHU de Sidi Bel Abbès. Les contaminations occupent la première place avec un taux de 55,56 %, suivies des colonisations (30,56 %) et enfin, les infections avec un taux de 13,88 %.

La réalisation d'un protocole standard pour distinguer entre infections, contaminations et colonisations des dispositifs médicaux d'origine fongique était indispensable pour faire une étude approfondie. C'est pourquoi, nous pouvons dire que la technique de Brun-Buisson et ses collaborateurs (1987) que nous avons adapté aux levures semble être fiable, rapide et reproductible pour la détermination des types d'infectivités fongiques des cathéters.

Sur 475 prélèvements effectués, 37 souches de *Candida* sp. sont isolées, soit un taux de 7,79 %. Trois espèces sont identifiées, *Candida glabrata* (23 souches), suivie de *Candida albicans* (11 souches) et *Candida parapsilosis* (3 souches). *Candida glabrata* est l'espèce dominante au CHU de Sidi Bel Abbès. L'identification de *Candida glabrata* comme espèce dominante lors de ces prélèvements devrait être prise en considération compte tenu de la fréquence élevée des espèces *non-albicans* dans les isolats cliniques.

En effet, la même étude menée au CHU d'Oran a mis en évidence la dominance de l'espèce *Candida parapsilosis*. *Candida glabrata* occupe la deuxième place (travail en cours).

La répartition des souches diffère d'un service à l'autre. Le service de réanimation-anesthésie vient en première position avec un taux de 19,05% suivi du service de chirurgie générale (14,89%). Les services de neurochirurgie (2,27%) et d'hématologie clinique (2,32%) se classent derniers.

Parmi les 37 souches de *Candida* sp. isolées des dix services du CHU de Sid Bel Abbès, 31 souches présentent le potentiel de former les biofilms. Ce potentiel est mis en évidence par la détermination des CMI et SCMI et par les photos de la microscopie électronique à balayage.

L'altération des cathéters par *Candida* sp. peut être aggravée par la résistance des biofilms à l'amphotéricine B et au fluconazole. En effet, les cellules sessiles de *Candida* sp. sont plus résistantes que leurs homologues planctoniques. La détermination des CMI et des SCMI des souches isolées a montré qu'elles sont plus résistantes en mode biofilms qu'en mode planctonique, cette résistance est trente deux (32) fois plus élevée vis-à-vis de l'AmB et cent vingt huit (128) fois vis-à-vis du fluconazole.

Les images de la microscopie électronique à balayage mettent en évidence les biofilms formés par *Candida* sp. sur les faces internes et externes des cathéters examinés. La structure tridimensionnelle des biofilms de *Candida* sp. est formée d'un agrégat de levures, d'hyphes et de pseudohyphes enveloppés dans une matrice extracellulaire.

La prévention des infections liées aux cathéters est obligatoire, elle s'appuie sur :

- le lavage soigneux des mains avec le respect des règles d'hygiène.
- la référence à des protocoles simples et régulièrement enseignés de

l'ensemble de l'équipe soignante.

La recommandation essentielle tient dans la limitation des indications et de la durée du cathétérisme. Les manipulations sur les lignes de perfusion doivent être réduites au minimum.

Pour compléter cette étude, il serait souhaitable de faire une caractérisation moléculaire des souches isolées et de développer des stratégies de traitement qui doivent être réévaluées en tenant compte des caractéristiques épidémiologiques locales.

## *Cinquième partie*

---

# **Références bibliographiques**

1. Abbès S., Sellami H., Sellami A., Makni F., Mahfoudh N., Makni H., Khaled S. and Ayadi A. (2011) Microsatellite analysis and susceptibility to FCZ of *Candida glabrata* invasive isolates in Sfax Hospital, Tunisia. *Med Mycol*; 49 : 10-15
2. Ahmad K.M., Kokosar J., Guo X., Gu Z., Ishchuk O.P. and Piskur J. (2014) Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*; 1-7
3. Al Mohajer M. and Darouiche R.O. (2013) Prevention and Treatment of Urinary Catheter-Associated Infections. *Curr Infect Dis Rep*; 15 : 116-123
4. Alangaden G.J. (2011) Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am*; 25 : 201-225
5. Al-Dhaheri R.S. and Douglas L.J. (2008) Absence of Amphotericin B-Tolerant Persister Cells in Biofilms of Some *Candida* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52 : 1884-1887
6. Alem M.A., Oteef M.D., Flowers T.H. and Douglas L.J. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot. Cell*; 5 : 1770-1779
7. Al-Fattani M.A. and Douglas L.J., (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*; 55 : 999-1008
8. Almirante B., Rodríguez D., Park B.J., Cuenca-Estrella M., Planes A.M., Almela M., Mensa J., Sanchez F., Ayats J., Gimenez M., Saballs P., Fridkin S.K., Morgan J., Rodriguez-Tudela J.L., Warnock D.W., Pahissa A.; Barcelona Candidemia Project Study Group. (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin Microbiol*; 43 :1829-1835
9. Anaissie E.J., Rex J.H., Uzun O. and Vartivarian S. (1998) Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia. *Am J Med*; 104 : 238-245
10. Aslam S. (2008) Effect of antibacterials on biofilms. *Ajic*; 36 : S175
11. Avila-Aguero M.L., Canas-Coto A., Ulloa-Gutierrez R., Caro M.A., Alfaro B. and Paris M.M. (2005) Risk factors for *Candida* infections in a neonatal intensive care unit in Costa Rica. *Int J Infect Dis*; 9 : 90-95

12. Bachmann S.P., VandeWalle K., Ramage G., Patterson T.F., Wickes B.L., Graybill J.R. and Lopez-Ribot J.L. (2002) *In-vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*; 46 : 3591-3596
13. Baddley J.W., Smith A.M., Moser S. A. and Pappas P.G. (2001) Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a University Hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 39: 199-201
14. Baillie G.S. and Douglas L. J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol*; 48 : 671-679
15. Baillie G.S. and Douglas L.J. (2000) Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 46 : 397-403
16. Baillie G.S. and Douglas L.J. (1998) Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 2146-2149
17. Bassetti M., Taramasso L., Nicco E., Molinari M.P., Mussap M. and Viscoli C. (2011) Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. *PLoS ONE*; 6 : e24198
18. Bell M. (2001) Biofilms: A Clinical Perspective. *Current Infectious Disease Reports*; 3 : 483-486
19. Ben-Abraham R., Keller N., Teodorovitch N., Barzilai A., Harel R., Barzilay Z. and Paret G. (2004) Predictors of adverse outcome from candidal infection in a tertiary care hospital. *Journal of Infection*; 49 : 317-323
20. Blankenship J.R. and Mitchell A.P., (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective, *Current Opinion in Microbiology*; 9 : 588 - 594
21. Bonhomme J. and d'Enfert C. (2013) *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Current Opinion in Microbiology*; 16 : 398-403
22. Boucherit-Atmani Z., Seddiki S.M.L, Boucherit K., Sari-Belkharoubi L. and Kunkel D. (2011) *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *J Mycol Med*; 21: 182-187

23. Bouchet P., Guignard J.L., Madulo-Leblond G. et Regli P. (1989) Mycologie générale et médicale. Ed Masson. Paris; 107-120
24. Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S., and Rapin M. (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med*; 147: 873-877
25. Brun-buisson C. (1994) analyse critique des méthodes diagnostiques d'infection liée au cathéter sur matériel enlèvent. *Réan. Urg*; 3 (3 bis), 343-346
26. Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A.B. and Monk B.C. (1995) Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *JDR May*; 74 : 1152-1161
27. Carrière C., et Marchandin H. (2001) Infections liées aux cathéters veineux centraux : diagnostic et définitions. *Néphrologie*; 22 : 433-437
28. Cate J.M.T., Klis F.M., Pereira-Cenci T., Crielaard W. and De Groot P.W.J. (2009) Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to *Candida* Biofilm Formation. *J Dent Res*; 88 : 105-115
29. Chabasse D., Robert R., Marot A. et Pihet M. (2006) *Candida* pathogène, (Collection Monographies de microbiologie), Lavoisier. Paris. France
30. Chalmers C.M. and Bal A.M. (2011) Management of fungal infections in the intensive care unit: a survey of UK practice. *Br J Anaesth*; 106 : 827-831
31. Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., and Ghannoum M.A. (2001a) Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*; 183 : 5385-5394
32. Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A. (2008) *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat. Protoc*; 3: 1909-1924
33. Chandra J., Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas L.J. and Ghannoum M.A. (2001b) Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res*; 80 : 903-908
34. Chandra J., Patel J.D., Li J., Zhou G., Mukherjee P.K., McCormick T.S., Anderson J.M., and Ghannoum M.A. (2005) Modification of Surface Properties of Biomaterials Influences the Ability of *Candida albicans* To Form Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*; 71 : 8795-8801

35. Chatzimoschou A., Dotis J., Evdoridou J., Katragkou A., Simitsopoulou M., Iosifides E., Georgiadou E., Antachopoulos C., Drosou-Agakidou V. and Roilides E. (2008) Biofilm-forming Capacity of *Candida* Bloodstream Isolates from Neonatal Intensive Care Units Neonates. *Infections in Patients with Solid Organ Transplantation; S8. ESCMID 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; Barcelona, Spain
36. Chauhan N., Latge J.P. and Calderone R. (2006) Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nature Reviews Microbiology*; 4 : 435-444
37. Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J. and Fink G.R. (2004) Tyrosol is a quorum sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci*; 101: 5048-5052
38. Chow J.K., Golan Y., Ruthazer R., Karchmer A.W., Carmeli Y., Lichtenberg D., Chawla V., Young J. and Hadley S. (2008) Factors Associated with Candidemia Caused by Non-*albicans Candida* Species versus *Candida albicans* in the Intensive Care Unit. *Clinical Infectious Diseases*; 46 : 1206-1213
39. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3<sup>rd</sup> ed. Document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008. USA
40. Colombo A.L., Perfect J., DiNubile M., Bartizal K., Motyl M., Hicks P. Lupinacci R., Sable C. and Kartsonis N. (2003) Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 22 : 470-474
41. Coogan M.M., Fidel P. L., Jr., Komesu M.C., Maeda N. and Samaranayake L.P. (2006) (B1) *Candida* and Mycotic Infections. *Adv Dent Res*; 19 : 130-138
42. Costerton J. W., Geesey G.G. and Cheng K.J., (1978) How bacteria Stick. *Scientific American*; 238: 86-95
43. Costerton J.W., Irvin R.T. and Cheng K.J. (1981). The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*; 8: 303-338

44. Crump J.A. and Collignon P.J. (2000) Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 19: 1-8
45. Cuéllar-Cruz M., Vega-González A., Mendoza-Novelo B., López-Romero E., Ruiz-Baca E., Quintanar-Escorza M.A. and Villagómez-Castro J.C. (2012) The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31 : 2513-2527
46. D'Enfert C. (2006) Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets*; 7: 465-470
47. Dalleau S., Cateau E., Bergès T., Berjeaud J-M. and Imbert C. (2008) *In-vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 31 : 572-576
48. Daniels K.J., Srikantha T., Lockhart S.R., Pujol C. and Soll D.R. (2006). Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *Embo J*; 25 : 2240-2252
49. Das I., Nightingale P., Patel M. and Jumaa P. (2011) Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *International Journal of Infectious Diseases*; 15 : e759-e763
50. Da-Silva W.J., Seneviratne J., Parahitiyawa N., Rosa E.A.R., Samarnayake L. P. and Del Bel Cury A.A. (2008) Improvement of XTT Assay Performance for Studies Involving *Candida albicans* Biofilms. *Braz Dent J*; 19 : 364-369
51. Déry M.A. and Hasbun R. (2011) Fluconazole-Resistant *Candida*: Mechanisms and Risk Factor Identification. *Curr Fungal Infect Rep*; 5: 23-28
52. Develoux M. et Bretagne S. (2005) Candidoses et levures diverses. *EMC-Maladies Infectieuses*; 2: 119 - 139
53. Domart Y., Hoen B., Leport C., Cartier F. et le Groupe de travail sur les infections cardiovasculaires (1991) Traitement curatif des infections sur cathéter veineux central en fonction du germe, de la situation clinique et du type de cathéter (cathéter en place ou après ablation). Propositions, limites. *Nutr Clin Métabol*; 5 : 95-104
54. Donlan R.M. (2001) Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*; 33 : 1387-1392
55. Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*; 8: 881-890

- 56.** Donlan R.M. and Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*; 15: 167-193
- 57.** Douard M.C, Basto E., Marie O. et Jacob L. (2005) Infections liées aux cathéters (incidence, physiopathologie, moyens diagnostiques et traitement). Principes de réanimation chirurgicale, 2<sup>ème</sup> édition, Arnette, JL Pourriat-C Martin, Paris, France
- 58.** Douglas L.J. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*; 19 : 139-143
- 59.** Douglas L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *TRENDS in Microbiology*; 11: 30-36
- 60.** Drochey E. and Vieu M. (1957) Biology of *Candida* infections: Laboratory diagnosis; study of 342 strains of *Candida* isolated from pathological specimens. *Sem Hop*; 33: 793-807
- 61.** Edgeworth J. (2009) Intravascular catheter infections. *Journal of Hospital Infection*; 73 : 323-330
- 62.** Eggimann P. et Pittet D. (2002) Candidoses en réanimation. *Réanimation*; 11 : 209-221
- 63.** Eggimann P., Garbino J., and Pittet D. (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect*; 3: 685-702
- 64.** Eggimann P., Sax H., and Pittet D. (2004) Catheter-related infections *Microbes and Infection*; 6 : 1033-1042
- 65.** Éloy O., Blancb V., Pina P., Gaudart A., Bressolle M.-L., Plainvert C., Decousser J.-W., Pangon B., Allouch P.-Y. et le Collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH) (2006) Épidémiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique ColBVH. *Pathologie Biologie*; 54 : 523-530
- 66.** Ernst E.J., Rogers P.D. (2005) Methods in Molecular Medicine: Antifungal Agents, Methods and Protocols. New Jersey, Humana Press; USA
- 67.** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2012) Antifungal Agents, Break Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 4.1.

68. Ferreira A.V., Prado C.G., Carvalho R.RDias., K.S.T. and Dias A.L.T. (2013) *Candida albicans* and Non *albicans Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*; 175 : 265–272
69. Fidel P.L. Vazquez Jr. J.A. and Sobel J.D. (1999) *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C.albicans*. *Clin Microbiol Rev*; 12 : 80-96
70. Figueroa R.B.G., Santibáñez J.A., Kuba E.B. and Trujillo A.B. (2009) *Candida glabrata* : an emergent opportunist in vulvovaginitis. *Cir Ciruj*; 77 : 423-427
71. Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., and Butler G. (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from super tree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol*; 6 : 99
72. Fridkin S.K. and Jarvis W.R. (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*; 9 : 499-511
73. Gallien S., Sordet F. et Enache-Angoulvant A. (2007) Traitement des candidémies chez un patient porteur d'un cathéter vasculaire. *Journal de Mycologie Médicale*; 17 : 42-49
74. Ghannoum M.A. and O'Toole G. A. (2004) Microbial biofilms, D.C. ASM Press, Washington.
75. Gigou-Cornet M. (2006) Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. Institut National Agronomique Paris-Grignon
76. Gognies S. and Belarbi A. (2010) Use of a new gelling agent (Eladium©) as an alternative to agar-agar and its adaptation to screen biofilm-forming yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*; 88 : 1095-1102
77. Guarro J., Gené J. and Stchigel A.M. (1999) Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*; 12 : 454-500
78. Gürcüoğlu. E., Akalın H., Ener B., Ocakoglu G., Sınırtas M., Akçaglar S., Yılmaz E., Evcı C. and Oral B. (2010) Nosocomial candidemia in adults: Risk and prognostic factors. *J Mycol Med*; 20 : 269-278

79. Ha J.F., Italiano C.M., Heath C.H., Shih S., Rea S. and Wood F.M. (2011) Candidemia and invasive candidiasis : a review of the literature for the burns surgeon. *Burns*; 37: 181-195
80. Hall R.A., De Sordi L., Mac Callum D.M., Topal H., Eaton R., Bloor J.W., Robinson G.K., Levin L.R., Buck J., Wang Y., Gow N.A.R., Steegborn C., and Muhlschlegel F.A. (2010) CO<sub>2</sub> Acts as a Signalling Molecule in Populations of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 6(11) : e1001193
81. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: From the nature environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*; 2 : 95-108
82. Hammond S.M. (1977) Biological activity of polyene antibiotics. *Prog Med Chem*; 14 : 105 - 283
83. Haras D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux et Techniques*; 93 : 27-41
84. Harrison J.J., Ceri H., Yerly J., Stremick C.A., Hu Y., Martinuzzi R. and Turner R.J. (2006) The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online*; 8 : 194-215
85. Hasan F., Xess I., Wang X., Jain N., Fries B.C. (2009) Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*; 11: 753-761
86. Hawser S.P. and Douglas L.J. (1994) Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*; 62: 915-921
87. Hawser, S. P. and Douglas L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in-vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 39 : 2128-2131
88. Hogan D.A. (2006a) Quorum Sensing: Alcohols in a Social Situation. *Curent Biology*; 16: 457-458
89. Hogan D.A. (2006b) Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell*; 5 : 613-619
90. Hornby J.M., Kebaara B.W. and Nickerson K.W. (2003) Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob. Agents Chemother*; 47: 2366-2369

91. Hoshi N., Mori H., Taguchi H., Taniguchi M., Aoki H., Sawada T., Kawabata M., Kuwabara A., Oono A., Tanaka K., Hori N., Toyoda M. and Kimoto K. (2011) Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res*; 55 : 48–52
92. Hot A., Mittaine B. et Dupont B. (2007) Infections fongiques invasives du grand prématuré. *Journal de Mycologie Médicale*; 17: 33-41
93. Irie Y. and Parsek M.R. (2008) Quorum Sensing and Microbial Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 322 : 67-84
94. Irimes C., Séguin J., Roy S. and Barbeau J. (2008) Investigations on farnesol lowres ponsiveness in *Candida albicans*: Influence of CO<sub>2</sub>, temperature and expression of selected genes. *Abstract Number: B50, 9th Conference on Candida and Candidiasis, ASM Conferences*; 17-130. New-York
95. Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A. and Meiller T.F. (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*; 10: 14-19
96. Jain N., Kohli R., Cook E, Gialanella P., Chang T. and Fries B. C. (2007) Biofilm Formation by and Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates from Urine. *Applied and Environmental Microbiology*; 73: 1697-1703
97. James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C. J., and coll. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*; 443 : 818-22
98. Javed F., Klingspor L., Sundin U., Altamash M., Klinge B. and Engström P.E. (2009) Periodontal conditions, oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *BMC Oral Health*; 9-12
99. Jones S., White G. and Hunter P.R. (1994) Increased Phenotypic Switching in Strains of *Candida albicans* Associated with Invasive Infections. *Journal of Clinical Microbiology*; 32 : 2869 - 2870
100. Kaltenbach G., Vogel T., Noblet-Dick M., Heitz D., Berthel M. et Kuntzmann F. (2002) Les candidémies chez le sujet âgé : à propos de quatre cas. *Rev Méd Interne*; 23 : 328-331
101. Kaur R., Goyal R., Dhakad M.S., Bhalla P. and Kumar R. (2014) Epidemiology and Virulence Determinants including Biofilm Profile of *Candida* Infections in an ICU in a Tertiary Hospital in India. *Journal of Mycology*; 1-8

102. Kojic E.M. and Darouiche R.O. (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*; 17 : 255-267
103. Kouidhi B., Ben Gaied M., Mhadhebi L., Bakhrouf A. and Bouraoui A. (2010) The efflux pumps in medical mycology: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Journal of Medical Mycology*; 20 : 304-314
104. Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*; 70 : 878-888
105. Kumamoto C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*; 5 : 608-611
106. LaFleur M.D., Kumamoto C.A. and Lewis K. (2006) *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50 : 3839-3846
107. Lavigne J-P. and Sotto A. (2005) Les candiduries. *Prog Urol* ; 15 : 213-216.
108. Lewis K. (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol*; 64 : 357-372
109. Lewis R.E., Kontoyiannis D.P., Darouiche R.O., Raad I.I., Prince R.A. (2002) Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of *Candida* catheterrelated bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother*; 46 : 3499-3505
110. Li F., Svarovsky M.J., Karlsson A. J., Wagner J.P., Marchillo K., Oshel P., Andes D. and Palecek S.P. (2007) Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation *in-vitro* and *in-vivo*. *Eucaryotic Cell*; 6 : 931-939
111. Lima R., Shams W., Kalra S., and Borthwick T. (2010) *Candida glabrata* Liver Abscess and Fungemia Complicating Severe Calculus Cholecystitis in an Immunocompetent Nondiabetic Host. *Southern Medical Journal*; 103: 245- 247
112. Lo H.J., Kohler J.R., Di-Domenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A. and Fink G.R. (1997) Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell*; 90 : 939-949
113. Maartens G., and Wood M.J. (1991) The clinical presentation and diagnosis of invasive fungal infections. *J Antimicrob Chemother*; 28 Suppl A : 13-22
114. Martinez L.R. & Fries B.C. (2010) Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep*; 4 : 266-275

115. Martins M., Henriques M., Azeredo J., Rocha S.M., Coimbra M.A. and Oliveira R. (2007) Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell*; 6 : 2429-2436
116. Mascellino M.T., Raponi G., Oliva A., Mastroianni C.M. and Vullo V. (2012) Candidaemia in Immune-Compromised Hosts: Incidence and Drugs Susceptibility. *J Clin Exp Pathol*; 2:131
117. Mateus C., Crow S.A.Jr. and Ahearn D.G. (2004) Adherence of *Candida albicans* to Silicone Induces Immediate Enhanced Tolerance to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 48 : 3358-3366
118. Mer M. (2005) Intravascular cathéter-related infection guidelines. *The Southern African Journal of Epidemiology and Infection*; 20 : 64-70
119. Mermel L. A. (2011) What is the predominant source of intravascular catheter infections. *Clinical Infectious Diseases*; 52 : 211-212
120. Miao H., Minquan D., Mingwen F. and Zhuan B. (2007) *In-vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*; 163 : 137-143
121. Mimoz O. (2005) Comment et sur quels éléments faire le diagnostic d'infection liée au cathéter? *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*; 24 : 285-287
122. Monds R.D and O'Toole G.A. (2008) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*; 17 : 73-87
123. Mukherjee P.K. and Chandra J. (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*; 7 : 301-309
124. Mukherjee P.K., Zhou G., Munyon R., and Ghannoum M.A. (2005) *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol*; 43 : 191-208
125. Muni S., Menon S., Chande C., Gohil A., Chowdhary A. and Joshi A. (2012) *Candida* biofilm. *Bombay Hospital Journal*; 54 : 19-23
126. Nagy I., Filkor K., Németh T., Hamari Z., Vágvölgyi C. and Gácsér A. (2011) *In-vitro* interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiology*; 11:122

- 127.** Nairy H.M., Charyulu N.R., Shetty V.A. and Prabhakara P. (2011) A pseudo-randomised clinical trial of in situ gels of fluconazole for the treatment of oropharyngeal candidiasis. *Trials*; 12 : 99
- 128.** Nett J. and Andes D. (2006) *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*; 9 : 340-345
- 129.** Nett J., Lincoln L., Marchillo K. and Andes D. (2007)  $\beta$ -1, 3 Glucan as a Test for Central Venous Catheter Biofilm Infection. *The Journal of Infectious Diseases*; 195 : 1705-1712
- 130.** Nett J.E., Guite K.M., Ringeisen A., Holoyda K.A. and Andes D.R. (2008) Reduced Biocide Susceptibility in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52 : 3411-3413
- 131.** Nett J.E., Sanchez H., Cain M.T., Ross K.M., and Andes D.R. (2011) Interface of *Candida albicans* Biofilm Matrix-Associated Drug Resistance and Cell Wall Integrity Regulation. *Eukaryotic Cell*; 10 : 1660-1669
- 132.** Nobile C.J., Bruno V.M., Richard M.L., Davis D.A. and Mitchell A.P. (2003) Genetic control of chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology*; 149 : 3629-3637
- 133.** Nucci M. and Anaissie E. (2001) Revisiting the source of candidemia : skin or gut? *Clin Infect Dis*; 33 : 1959-1967
- 134.** O'Toole G.A. (2003) To Build a Biofilm. *Journal of Bacteriology*; 185 : 2687-2689
- 135.** Odds F.C. (1979) *Candida* and Candidosis, Leicester University Press, London, England
- 136.** Odds F.C. (1988) *Candida* and Candidosis, Bailliere Tindall, London, UK, 2<sup>nd</sup> edition
- 137.** Pace J.L., Rupp M.E. and Finch R.G. (2006) Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. *Taylor & Francis Group*; New York, USA
- 138.** Paulitsch A. H., Willinger B., Zsalatz B., Stabentheiner E., Marth E. and Buzina W. (2009) In-vivo *Candida* biofilms in scanning electron microscopy. *Medical Mycology*; 47 : 690-696
- 139.** Peeters E., Nelis H.J. and Coenye T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*; 72 : 157-165

- 140.** Perumal P., Mekala S. and Chaffin W.L. (2007) Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 51: 2454-2463
- 141.** Pfaller M.A. and Diekema D.J. (2007) Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*; 20 : 133-163
- 142.** Pfaller M.A. and Diekema D.J. (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*; 36 : 1-53
- 143.** Pfaller M.A., Diekema D.J., Jones R.N., Sader H.S., Fluit A.C., Hollis R.J., Messer S.A. and The SENTRY Participant Group. (2001) International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species : frequency of occurrence and *in-vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol*; 39 : 3254-3259
- 144.** Picazo J.J., González-Romo F., Candel F.J. (2008) Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents*; 32 Suppl 2: S83-S85
- 145.** Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L.Jr, Mowat E., Ramage G. and 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, *Nature Protocols*; 3 : 1494-1500
- 146.** Pires R.H., dos Santos J.M., Zaia J.E., Martins C.H.G. and Mendes-Giannini M.J.S. (2011) *Candida parapsilosis* complex water isolates from ahaemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 106 : 646-654
- 147.** Quinet B. (2006) Abord veineux de longue durée : épidémiologie, diagnostic, prévention et traitement des complications infectieuses. Session: Abord veineux de longue durée. *Archives de pédiatrie*; 13 : 714-720
- 148.** Ramage G, Rajendran R, Sherry L., and Williams C. (2012) Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*; Article ID 528521
- 149.** Ramage G., Bachmann S., Patterson T.F., Wickes B.L. and López-Ribot J.L. (2002b) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 49 : 973-980

150. Ramage G., Martinez J.P., and Lopez-Ribot J.L. (2006) *Candida* biofilms on implanted biomaterials : a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*; 6 : 979–986
151. Ramage G., Mowat E., Jones B., Williams C. and Lopez-Ribot J. (2009) Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*; 35 : 340–355
152. Ramage G., Robertson S.N. and Williams C. (2014) Strength in numbers : antifungal strategies against fungal biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 43 : 114-120
153. Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., and Lopez-Ribot J.L. (2005) *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*; 4 : 633-638
154. Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., and Lopez-Ribot J.L. (2001b) Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45 : 2475-2479
155. Ramage G., VandeWalle K., Bachmann S.P., Wickes B.L. and López-Ribot J.L., (2002a) *In-vitro* Pharmacodynamic Properties of Three Antifungal Agents against Preformed *Candida albicans* Biofilms Determined by Time-Kill Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 49 : 3634-3636
156. Ramage G., Vandewalle K., Wickes B. L., Lopez-Ribot J. L. (2001a) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*; 18 : 163-170
157. Reanis (1999) Guide pour la prévention des infections nosocomiales en réanimation. Paris : GalaxoWellcom. 2<sup>ème</sup> édition
158. Reiss E., Shadomy H.J. and Lyon G.M. (2012) Fundamental Medical Mycology. *Wiley-Blackwell* ed; Hoboken, New Jersey, USA
159. Ribaud P., Chastang C., Latgé J.P., Baffroy-Lafitte L., Parquet N., Devergie A. Espérou H. Sélimi F. Rocha V. Derouin F. Socié G. et Gluckman E. (1999) Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*; 28 : 322-230
160. Roldán S., Herrera D. and Sanz M. (2003) Biofilms and the tongue: therapeutical approaches for the control of halitosis. *Clinical Oral Investigations*; 7 : 189-197

161. Ruan S.Y., Huang Y.T., Chu C.C., Yu C.J. and Hsueh P.R. (2009) *Candida glabrata* fungaemia in a tertiary centre in Taiwan: antifungal susceptibility and outcomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 34 : 236–239
162. Ryan J.A., Abel R.M., Abbott W.M., Hopkins C.C., Chesney T.M, Colley R. Phillips K. and Fischer J.E. (1974) Catheter complications in total parenteral nutrition. A prospective study of 200 consecutive patients. *N Engl J Med*; 290 : 757-761
163. Safdar N., and Maki D.G. (2004) the pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with non-cuffed short-term central venous catheters. *Intensive Care Med*; 30 : 62-67
164. Saghrouni F., Bougmiza I., Ben Abdeljelil J., Yacoub A., Khammari I., Fathallah A., Mtiraoui A. and Ben Saïd M. (2011) Epidemiological trends in invasive candidiasis: Results from a 15-year study in Sousse region, Tunisia. *Journal de Mycologie Médicale*; 21: 123-129
165. Sahiner F., Ergünay K., Ozyurt M., Ardiç N., Hoşbul T. and Haznedaroğlu T. (2011) Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as nosocomial pathogens. *Mikrobiyol Bul*; 45 : 478-88
166. Samaranayake Y.H., Ye J., Yau J.Y.Y., Cheung B.P.K. and Samaranayake L.P. (2005) *In-vitro* Method To Study Antifungal Perfusion in *Candida* Biofilms. *J Clin Microbiol*; 43 : 818–825
167. Sanchez V., Vazquez J.A., Barth-Jones D., Dembry L., Sobel J.D. and Zervos M.J. (1993) Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: an epidemiologic study. *Am J Med*; 94 : 577-82
168. Sanguinetti M., Posteraro B., Fiori B., Ranno S., Torelli R., Fadda G. (2005) Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 668-679
169. Seabra R. and Bhogal N. (2009) Hospital infections, animal models and alternatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 28 : 561–568
170. Seneviratne C.J., Jin L.J., Samaranayake Y.H. and Samaranayake L.P. (2008) Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52 : 3259-3266

- 171.** Seneviratne C.J., Zhang T., Fang H.H.P., Jin L.J. and Samaranayake L.P. (2009) Distribution Coefficients of Dietary Sugars in Artificial *Candida* Biofilms. *Mycopathologia*; 167: 325–331
- 172.** Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G., Kim S.H., Shin D.H., Lee S.K., Suh S.P. and Ryang D.W. (2002) Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients : Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *Journal of Clinical Microbiology*; 40 : 1244-1248
- 173.** Shoham S. (2011) Invasive Candidiasis in Patients with Implants. *Curr Fungal Infect Rep*; 5 :12–17
- 174.** Shuford J.A., Piper K.E., Steckelberg J.M. and Patel R. (2007) *In-vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 57 : 277-281
- 175.** Shuford J.A., Rouse M.S., Piper K.E., Steckelberg J.M. and Patel R., (2006) Evaluation of Caspofungin and Amphotericin B Deoxycholate against *Candida albicans* Biofilms in an Experimental Intravascular Catheter Infection Model. *Journal of Infectious Diseases*; 194 : 710-713
- 176.** Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D. and Azeredo J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species : quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*; 47: 681-689
- 177.** Silva S., Henriques M., Oliveira R., Williams D. and Azeredo J. (2010) *In-vitro* Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* *Candida* Species. *Curr Microbiol*; 61: 534-540
- 178.** Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W. and Azeredo J. (2011) Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*; 19 : 241-247
- 179.** Sobel J.D. (2000) Management of infections caused by *Candida glabrata*. *Current Infectious Disease Reports*; 2 : 424-442
- 180.** Soll D.R. (2008) *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? *Current Biology*; 18 : 717-720
- 181.** Staib, P. and Morschhauser J. (2007) Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses*; 50 : 1–12

- 182.** Stephan F., Bah M.S., Desterke C., Rezaiguia-Delclaux S., Foulet F., Duvaldestin P. and Bretagne S. (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis*; 35 : 1477–1483
- 183.** Stickler D. (1999) Biofilms. *Current Opinion in Microbiology* ; 2 : 270-275
- 184.** Sudbery P., Gow N. and Berma J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*; 12 : 317-324
- 185.** Theaker C. (2005) Infection control issues in central venous catheter care. *Intensive and Critical Care Nursing*; 21: 99-109
- 186.** Thompson D.S., Carlisle P.L. and Kadosh D. (2011) Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*; 10 : 1173-1182
- 187.** Timsit J.F. (2005) Catheter-related infection: microbiologie. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*; 24 : 282-284
- 188.** Timsit J.F., Dubois Y., Minet C., Bonadona A., Lugosi M., Ara-Somohano C., Hamidfar-Roy R., and Schwebel C. (2011) New materials and devices for preventing catheter-related infections. *Ann Intensive Care*; 1: 34
- 189.** Timsit J.F., Wolff M., Mourvillier B., Schortgen F. et Régner B. (2003) Diagnostic et prise en charge des infections sur cathéter en réanimation. *Médecine et maladies infectieuses*; 33 : 619-627
- 190.** Trofa D., Gacser A., and Nosanchuk J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*; 21 : 606–625
- 191.** Tumbarello M., Posteraro B., Treccarichi E.M., Fiori B., Rossi M., Porta R., Donati K. G., La Sorda M., Spanu T., Fadda G., Cauda R. and Sanguinetti M. (2007) Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* ; 45 : 1843-1850
- 192.** Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A. Banerjee M., Ramasubramaniam A.K., Köhler J.R., Kadosh D. and Lopez-Ribot J.L. (2010) Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*; 6: e1000828. 1-13. doi:10.1371/journal.ppat.1000828

- 193.** Vandeputte P., Pineau L., Larcher G., Noel T., Brèthes D., Chabasse D. and Bouchara J.P. (2008) Molecular Mechanisms of Resistance to 5-fluorocytosine in Laboratory Mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*; 171 : 11-21
- 194.** Verstrepen K.J., Reynolds T.B. and Fink G.R. (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol*; 2 : 533–540
- 195.** Veyssier P., Domart Y. and Liebbe A.M. (1998) Infections Nosocomiales, 2<sup>ème</sup> édition. *Collection Abrégés de Médecine*; Paris, France
- 196.** Vincent J.L. (2003) Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*; 361: 2068–2077
- 197.** Vinitha M. and Ballal M. (2007) Biofilm as Virulence Marker in *Candida* Isolated from Blood. *World Journal of Medical Sciences*; 2 : 46-48
- 198.** Walsh T.J. and Rex J.H. (2002) All catheter-related candidemia is not the same: assessment of the balance between the risks and benefits of removal of vascular catheters. *Clin Infect Dis*; 34 : 600-602
- 199.** Walther A. and Wendland J. (2003) An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet*; 42 : 339–343
- 200.** Weber K., Sohr R., Schulz B., Fleischhacker M. and Ruhnke M. (2008) Secretion of E,E-Farnesol and Biofilm Formation in Eight Different *Candida* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 25 : 1859-1861
- 201.** Wesenberg-Ward K.E., Tyler B.J. and Sears J.T. (2005) Adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on native and Pluronic-treated polystyrene. *Biofilms*; 2 : 63-71
- 202.** Williams D.W., Kuriyama T., Silva S., Malic S. and Lewis M.A. (2011) *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000*; 55 : 250-265
- 203.** Yang Y.L., Lo H.J., Hung C.C. and Li Y. (2006) Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. *BMC Infect Dis*; 6 : 8
- 204.** Yeater K.M., Chandra J., Cheng G., Mukherjee P.K., Zhao X., Rodriguez-Zas S.L., Kwast K.E., Ghannoum M. A. and Hoyer L.L. (2007) Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology*; 153 : 2373-2385

- 205.** Zhou L., Tong Z.C., Wu G.F., Feng Z.H., Bai S.Z., Dong Y., Ni L.X., and Zhao Y.M. (2010) Parylene coating hinders *Candida albicans* adhesion to silicone elastomers and denture bases resin. *Archives of Oral biology*; 55 : 401-409
- 206.** Zore G.B., Archana D. Thakre, V. Rathod and Karuppayil S.M. (2010) Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses*; 54 : 99-109

**S**ites Web:

- BIOMERIEUX. Produits ATB™ FUNGUS. Accès: (22-08-2013 /10:00 AM)  
[http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?doc=FRN\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_4](http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?doc=FRN_CLN_PRD_G_PRD_CLN_4)
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : (06-09-2013 /16:00 PM)  
<http://www.who.int/gpsc/background/fr/>

## *Sixième partie*

---

# **ANNEXES**

**Annexe 1 : Préparation du PBS**

PBS = Phosphate Buffered Saline « Tampon Phosphate Salé » (10 mM tampon phosphate, 2.7 mM chlorure de potassium, 137 mM chlorure de sodium)

NaCl : 137 mM

KCl : 2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 10 mM (di-sodium hydrogénophosphate)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,76 mM (di-hydrogénophosphate)

Compléter à 1L et ajustez au pH = 7.4, puis autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes et conserver à température ambiante.

Chandra Mohan. (2003) Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems *Biosciences* ; Cat. No. 524650

**Annexe 2 :** Sites des prélèvements, dénombrement aux cellules de Thoma et identification microbienne dans chaque service du CHU de Sidi Bel Abbès.

**Annexe 2.1:** Réanimation-Annasthésie

Patients			Prélèvements (Implants médicaux)					Dénombrement et identification		
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTC	KTP	KTT	KTU	KTOB	Ecv**	compte (cellules/mL)	souches isolées
F, 18	Gent+Ampi	36,7			X				<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 31	Cefa +Cipr	37,3			X				<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 71	Gent +Cipr	38,1			X				>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 64	Gent +Cipr +Acyclovir	37,1					X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
								X	-	<i>C. albicans</i>
H, 23	Gent +Cipr	38,7				X			>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
				X					<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 17	-	37,6	X						<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 57	Cefa + oxa	38,4	X						<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 66	Amp +Claf	37,3	X						<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
F, 41	Cefa + oxa	38,0		X					>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 46	-	37,0		X					>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

\* température des patients lors des prélèvements, \*\* écouvillonnage de la langue d'un cas patiente, **F**: Femme, **H**: Homme, **ATB** : antibiothérapie, **Genta** : Gentamicine, **Ampi** : Ampicilline, **Cefa** : Cefazoline, **Cipro** : Ciprofloxacine, **Oxa** : Oxacilline, **Claf** : Claforan (Cefotaxime), **KTC** : cathéter veineux centrale, **KTP** : cathéter veineux périphérique, **KTT** : cathéter trachéotomique, **KTU** : cathéter urinaire, **KTOB** : cathéter oro-bronchique.

**Annexe 2.2:** Urologie

Patients			Implants médicaux		Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP	KTU	compte (cellules/mL)	souches isolées
F, 78	Cefa + oxa	36,7		X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 71	Gent +Ampi	37,3		X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 81	Gent +Ampi	37,4	X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

**Annexe 2.3:** Chirurgie Infantile

Patients			Implants médicaux		Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTD		compte (cellules/mL)	souches isolées
F, 08	Cipr+Ampi	37,4	X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 03	Cefa +Cipr	37,3	X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

**Annexe 2.4:** Gastro-Entérologie

Patients			Implants médicaux		Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP		compte (cellules/mL)	souches isolées
H, 58	Cipr+Ampi	37,4	X		<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 63	Cefa +Cipr	37,0	X		<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

**Annexe 2.5:** Chirurgie Générale

Patients			Implants médicaux					Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTC	KTP	KTU	KTOB	KTD	compte (cellules/mL)	souches isolées
H, 31	Cefa +Cipr	36,8	X					<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 71	Gent +Cipr	37,2			X			>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 64	Gent +Cipr	39,6				X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
F, 23	Gent +Cipr	37,0				X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 66	Amp +Claf	37,2					X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
F, 41	Cefa + oxa	37,3		X				>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 46	-	37,0		X				>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

**Annexe 2.6:** Neuro-chirurgie

Patients			Implants médicaux	Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP	compte (cellules/mL)	souches isolées
H, 66	Amp +Claf	37,2	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

**Annexe 2.7:** Pneumo-physiologie

Patients			Implants médicaux	Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP	compte (cellules/mL)	souches isolées
F, 78	Cefa + oxa	38,7	X	>10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
F, 71	Gent +Ampi	37,3	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
H, 81	Gent +Ampi	37,4	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. parapsilosis</i>

**Annexe 2.8:** Endocrinologie

Patients			Implants médicaux	Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP	compte (cellules/mL)	souches isolées
F, 78	Cefa + oxa	36,7	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
H, 71	Gent +Ampi	37,3	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
H, 81	Gent +Ampi	37,4	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>

**Annexe 2.9:** Hématologie

Patients			Implants médicaux	Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP	compte (cellules/mL)	souches isolées
H, 66	Amp +Claf	36,6	X	>10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>

**Annexe 2.10:** Traumatologie

Patients			Implants médicaux	Dénombrement et identification	
sexe & age	ATB	T (°C)*	KTP	compte (cellules/mL)	souches isolées
H, 28	Cefa + oxa	36,9	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
F, 71	Gent +Ampi	37,3	X	>10 <sup>3</sup>	<i>C. parapsilosis</i>
H, 34	Gent +Ampi	37,2	X	<10 <sup>3</sup>	<i>C. parapsilosis</i>

**Annexe 3 :** Types d'infectivités fongiques vis-à-vis des différents cathéters et des espèces isolées.

Type de cathéter / Type d'infectivité	KTP	KTC	KTU	KTT	KTOB	KTD	Espèces incriminées
<b>Contamination</b>	4	1				1	<i>C. albicans</i>
	5	3	2	2			<i>C. glabrata</i>
	2						<i>C. parapsilosis</i>
<b>Colonisation</b>	1				1		<i>C. albicans</i>
	4		1		1	2	<i>C. glabrata</i>
	1						<i>C. parapsilosis</i>
<b>Infection</b>	1				1		<i>C. albicans</i>
	1		1	1			<i>C. glabrata</i>
							<i>C. parapsilosis</i>

**KTP** : Cathéter Vasculaire Périphérique, **KTC** : Cathéter Vasculaire Centrale, **KTU** : Cathéter Urinaire, **KTT** : Cathéter Trachéotomique, **KTOB** : cathéter Oro-Bronchique, **KTD** : Cathéter de Drainage.

**Annexe 4: Espèces de *Candida* isolées du CHU de Sidi Bel Abbès**

	<b>Souches</b>	<b>Identification</b>
1	RFKTC3	<i>C. albicans</i>
2	PHKT2	<i>C. albicans</i>
3	HFKT1	<i>C. albicans</i>
4	EHKT1	<i>C. albicans</i>
5	PHKT1	<i>C. parapsilosis</i>
6	RHST3	<i>C. glabrata</i>
7	GEFKT2	<i>C. glabrata</i>
8	RFST6	<i>C. glabrata</i>
9	RHKT3	<i>C. glabrata</i>
10	RFST1	<i>C. albicans</i>
11	NHKT1	<i>C. glabrata</i>
12	UFSU1	<i>C. glabrata</i>
13	CCISD1	<i>C. glabrata</i>
14	CCISD2	<i>C. glabrata</i>
15	PFKT1	<i>C. glabrata</i>
16	RFKTC1	<i>C. glabrata</i>
17	CHSD1	<i>C. glabrata</i>
18	GEFKT1	<i>C. glabrata</i>
19	RFSU1	<i>C. glabrata</i>
20	CHKT1	<i>C. glabrata</i>
21	UHKT1	<i>C. glabrata</i>
22	RHST2	<i>C. glabrata</i>
23	RFLG1	<i>C. albicans</i>
24	UFSU2	<i>C. glabrata</i>
25	EFKT2	<i>C. albicans</i>
26	EFKT3	<i>C. albicans</i>
27	RFKT1	<i>C. glabrata</i>
28	RFKTC2	<i>C. glabrata</i>
29	RFKT2	<i>C. glabrata</i>
30	CHST4	<i>C. albicans</i>
31	CFKT3	<i>C. albicans</i>
32	CFSU2	<i>C. glabrata</i>
33	CHKTC2	<i>C. glabrata</i>
34	CHST2	<i>C. glabrata</i>
35	TFKT1	<i>C. parapsilosis</i>
36	THKT2	<i>C. parapsilosis</i>
37	THKT4	<i>C. albicans</i>

**ANNEXE 5 : Cluster Analysis of Variables: Contamination; Contamination; Contamination; ...**

Correlation Coefficient Distance, Ward Linkage  
Amalgamation Steps

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined	New cluster	Number of obs. in new cluster
1	8	90,4145	0,19171	6	9	2
2	7	81,1651	0,37670	1	3	2
3	6	81,1266	0,37747	5	7	2
4	5	75,4105	0,49179	2	8	2
5	4	60,1407	0,79719	1	5	4
6	3	43,5096	1,12981	1	2	6
7	2	40,6174	1,18765	1	4	7
8	1	17,7501	1,64500	1	6	9

**ANNEXE 6** : CMI et SCMI de l'AmB et du FCZ des souches de références et isolées du CHU de Sidi Bel Abbès.

Souches	AmB ( $\mu\text{g/ml}$ )			FCZ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	CMI	SCMI <sub>50</sub>	SCMI <sub>80</sub>	CMI	SCMI <sub>50</sub>	SCMI <sub>80</sub>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	2	4	4	4	16
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	1	1	4	4	8	32
<i>C. albicans</i> 444 IP	0,5	2	8	4	4	16
THKT2						
RHST2						
UFSU2						
RFKT1						
RFKTC2						
RFKT2	0,25	1	2	16	32	>64
RFST1						
CCISD1						
CCISD2						
GEFKT2						
RFKTC3						
PHKT1						
GEFKT1	0,5	1	4	8	8	32
RFSU1						
CFKT3						
THKT4						
PHKT2	0,5	2	4	8	0,5	0,5
HFKT1						
EHKT1						

EFKT2 EFKT3 CHST4	1	2	4	8	0,5	0,5
PFKT1 RFKTC1 CHSD1	0,25	0,25	0,5	16	8	16
CHKT1 UHKT1 RFST6 RHKT3	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1
TFKT1	1	0,5	1	8	4	16
RFLG1 CFSU2 CHKTC2 CHST2 RHST3	0,25	0,25	4	16	0,25	0,0625
NHKT1 UFSU1	2	0,5	0,25	0,5	4	4

---

# ***Publications***

# Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria

This article was published in the following Dove Press journal:  
International Journal of General Medicine  
8 January 2013  
[Number of times this article has been viewed](#)

Sidi Mohammed Lahbib Seddiki<sup>1</sup>  
Zahia Boucherit-Otmani<sup>1</sup>  
Kebir Boucherit<sup>1</sup>  
Souad Badsı-Amir<sup>2</sup>  
Mourad Taleb<sup>3</sup>  
Dennis Kunkel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory: Antifungal Antibiotic, Physico-Chemical Synthesis and Biological Activity, University of Tlemcen, Algeria; <sup>2</sup>Department of Anesthesiology, <sup>3</sup>Department of Epidemiology, University Hospital of Sidi Bel Abbes, Algeria; <sup>4</sup>Dennis Kunkel Microscopy Inc, Kailua, HI, USA

**Abstract:** Nosocomial candidiasis remains a potential risk in intensive care units (ICUs), wherein *Candida albicans* is most responsible for its occurrence. Equally, non-*C. albicans* species, especially *C. glabrata*, are also involved. These infections are frequently associated with biofilms that contaminate medical devices, such as catheters. These biofilms constitute a significant clinical problem, and cause therapeutic failures, because they can escape the immune response and considerably decrease sensitivity to antifungal therapy. The diagnosis of catheter-related candidiasis is difficult; however, the differentiation between an infection of the catheter (or other medical implant) and a simple contamination is essential to start an anti-fungal treatment. Among the methods used for this type of study is the Brun-Buisson method, but this method only examines the infectivity of catheters caused by bacteria. For this reason, we wanted to adapt this method to the yeast cells of *Candida* spp. To assess the various types of infectivity of catheters (contamination, colonization, or infection) and their corresponding rates, as well as the responsible yeast species, we conducted our study, between February 2011 and January 2012, in the ICU at the University Hospital Center of Sidi Bel Abbes, Algeria; during this study, we took photographic images of the tongue of one patient and of that patient's implanted orobronchial catheter. In addition, catheters contaminated by *C. albicans* biofilms were observed by scanning electron microscopy.

**Keywords:** ICU, contamination, colonization, infection

## Introduction

Nosocomial invasive candidiasis is a major problem, associated with significant mortality,<sup>1,2</sup> that affects 15% of nosocomial infections in patients hospitalized in intensive care units (ICUs).<sup>3</sup> Clinical signs of such infections appear late, rendering them difficult to diagnose.<sup>3,4</sup> Many yeasts are opportunistic pathogens,<sup>5</sup> and *Candida albicans* is the most common of these to colonize, but non-*albicans* species of *Candida* are increasingly involved in infection,<sup>6-8</sup> in particular, *C. glabrata*, an emerging species associated with high mortality.<sup>9</sup> Compared with *C. albicans* fungemia, the impact of *C. glabrata* fungemia on patients in the ICU is not well known.<sup>10</sup>

Candidemia is frequently associated with the colonization of medical devices, such as catheters.<sup>11</sup> In addition, a factor that is generally predisposing to invasive candidiasis in the ICU is the alteration of skin and mucus barriers caused by the use of medical devices (catheters, probes, intubation, etc).<sup>12</sup> Further, the resistance of *Candida* spp. to antifungal agents increases with the formation of biofilms into medical implants.<sup>13-15</sup>

Correspondence: Sidi Mohammed Lahbib Seddiki  
Laboratoire Antibiotique Antifongique, University of Tlemcen, BP 119, Imama 13000 – Tlemcen and the University Center of Naama 45000 – Naama, Algeria  
Tel +213 662 699 682  
Fax +213 49 797 640  
Email sdadek@hotmail.com

Indeed, *Candida* colonization appears to be a prerequisite for *Candida* infection;<sup>16</sup> therefore, it is important to distinguish between simple contamination, colonization, and infection of catheters,<sup>6,17</sup> because this differentiation remains crucial in initiating treatment.<sup>18</sup> A threshold of significance,  $\geq 10^3$  colony-forming units (CFU)/mL with or without the appearance of systemic symptoms (fever  $> 38^\circ\text{C}$ ) or local symptoms (purulent opening, insertion-site or route inflammation), determines the type of infectivity of the catheter.<sup>19</sup> The removal of the catheter is preferable when it is a gateway to candidemia. Analysis of the culture of the catheter after its ablation is necessary in confirming infection.<sup>20,21</sup>

Since there is no specific technique by which to study the different types of infectivity of catheters contaminated by *Candida* spp., our study in the ICU at the University Hospital Center of Sidi Bel Abbe, Algeria aimed to adapt the Brun-Buisson technique and previous specific bacterial definitions for the assessment of the different types of fungal infectivity of medical implants, and also to isolate and identify the involved species and calculate their corresponding rates. In addition to this, we aimed to investigate the formation of biofilms on catheter surfaces, using electronic imagery.

## Materials and methods

Based on previous results obtained from a prevalence survey that was done in June 2009 by the Epidemiology Department of the University Hospital Center of Sidi Bel Abbes (unpublished data), we conducted this study in the ICU between February 2011 and January 2012. The samples of the implanted medical devices were taken from patients hospitalized for 48 hours or more. Candidemia is considered nosocomial when it first occurs 48 hours or more after hospital admission.<sup>7,22</sup> Additionally, other samples were taken by swabbing the surface of the tongue. To transport the samples to the laboratory, a refrigerant bag was used.

## Patients

The samples were taken directly from patients who presented the most important candidiasis risk factors (implanted medical devices, broad-spectrum antibiotic therapy, long stay in the ICU, etc). For every patient, the following data were registered: age, sex, antibiotic treatment, body temperature during the sampling, and presence or absence of inflammation and/or pus along the route of the catheter.

One patient agreed to photography of the tongue; this was a diabetic woman of 64 years who suffered from meningoencephalitis. She was treated by antibiotics, gentamicin and cephalosporin three times a day at dose levels of 100 mg/day

and 3 g/day, respectively, and acyclovir (900 mg  $\times$  2/day), vitamin K (10 mg), paracetamol (1 g  $\times$  3/day), and antidiabetic treatment (insulin, 3  $\times$  8 IU/day). This patient died of a cardiac attack.

## Samples and yeast isolates

We took samples based on the method of Boucherit-Atmani et al.<sup>15</sup> Briefly, the implanted medical devices (catheters and other invasive medical devices) were taken directly from patients and placed in sterile Sabouraud liquid medium. After cutting the distal ends of the catheters, the tubes were opened in front of a torch, then rapidly flamed and sealed to avoid contamination. The tubes were then agitated in a vortex mixer for 1 minute, and purified strains were identified by a yeast identification system (API 32-C System; bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) and microculture (germ-tube and chlamydo-spore formation).

Tongue samples were collected by scraping the dorsum of the tongue with a sterile cotton swab, which was returned into the tube immediately after sampling. Then, the tube was agitated, and the different forms (yeast cells, hyphae, and pseudohyphae) were verified using light microscopy. In fact, scraping the surface of the tongue is a reliable method for detecting *Candida* spp.<sup>23</sup>

## Types of catheter infectivity

The type of infectivity of each collected medical implant was assessed using the quantitative method of Brun-Buisson<sup>24</sup> with some modifications. For this reason, the samples were vortexed for 1 minute, and then the yeasts were counted using a Thoma cell. To this end, a volume of the sample (after vortexing) was placed between the Thoma cell and the coverslip, and yeast cells were counted by light microscopy (magnification  $\times$  40). Then, the calculation was reported in CFU/mL. When cell counting was difficult due to high density of the milieu, dilutions were performed.

The different types of catheter infectivity were determined by referring to the significance threshold,  $\geq 10^3$  CFU/mL, and to the systemic and/or local clinical symptoms.<sup>19</sup>

## Biofilms observation with SEM

In order to highlight the formation of biofilms on the catheter surfaces, a central vascular catheter (CVC) and an orobronchial catheter (OBC) were removed from the aforementioned female patient after exposure times of 8 and 3 days, respectively. Biofilm samples were randomly selected and preserved with glutaraldehyde fixative (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and sent to the SEM laboratory.

Catheter-segment fixation was done according to the methods of Chandra et al.<sup>25</sup> Briefly, biofilms of *C. albicans* on catheter segments were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (0.1 M, pH 7.4) and were introduced in sterile Eppendorf tubes that were sealed with an adhesive film, numbered, placed in another vial, and left for 12 hours at 4°C before shipment to the scanning electron microscope (SEM) laboratory for observations.

SEM preparation of the catheter's pieces was performed according to Chandra et al.<sup>25</sup> The samples were examined using a Hitachi S-4800 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) field-emission SEM by Dennis Kunkel Microscopy Inc (Kailua, HI, USA).

## Results and discussion

The prevalence survey, which was conducted in June 2009 by the Epidemiology Department of the University Hospital Center of Sidi Bel Abbes, showed that 60% of the patients hospitalized in the ICU were victims of nosocomial infection, and the principal cause was the use of any type of catheter. In addition, this survey revealed widespread use of antibacterial agents, while antifungal agents were prescribed only in rare cases.

According to Avila-Aguero et al,<sup>11</sup> previous use of antibiotics, endotracheal intubation, and use of central devices constitute the risk factors for candidemia infection. Effectively, catheters are the leading cause of bloodstream infection in patients in the ICU;<sup>26</sup> half of all cases of candidemia occur in the ICU.<sup>27</sup>

In the present study, a total of 63 samples were taken from different implanted medical devices at the ICU during

the study period. Twelve strains (19.04%) of *Candida* spp. were isolated during the study period; nine strains of *C. glabrata* and only three strains of *C. albicans* were identified (Table 1).

Based on the results displayed in Table 1, *C. glabrata* was predominant compared with *C. albicans*; a ratio of 3:1 of *C. glabrata* versus *C. albicans* was observed.

The strains of *C. albicans* were isolated from the OBC and tongue of the female patient and from the CVC of another patient. The strains of *C. glabrata* were taken from different medical devices implanted into other patients.

In general, fungal infection in critically or seriously ill patients is a significant problem,<sup>16</sup> and the use of indwelling devices, such as catheters, is a source of nosocomial infection.<sup>5</sup> In addition, the vast majority of the cases of candidemia occur in hospitalized patients;<sup>28</sup> commonly affect patients in the ICU; and carry a high mortality risk.<sup>29</sup>

*C. glabrata* was previously thought to be a primarily non-pathogenic organism, but, in the past couple of decades, it has been increasingly recognized as a pathogen of problematic etiological origin in bloodstream infections.<sup>30-32</sup> Additionally, this yeast has recently emerged as an important nosocomial pathogen,<sup>9,33,34</sup> yet little is known about its epidemiology.<sup>33</sup> In fact, *C. glabrata* has been suggested to be the second most important human pathogen responsible for candidemia.<sup>35</sup>

According to Develoux and Bretagne,<sup>6</sup> among the episodes of ICU candidemia, *C. glabrata* was the second most common causative species.<sup>10</sup> However, a recent study found that no difference in mortality was associated with *C. albicans* and *C. glabrata* bloodstream infections.<sup>32,36</sup> Trick et al<sup>37</sup> have demonstrated that, among the *Candida* spp.,

**Table 1** Results of the counting and identification of yeast strains isolated from implanted devices in the ICU

Patients			Sampling sites						Count and identification	
Sex, age	ATB	T (°C) <sup>a</sup>	CVC	PVC	TP	UP	OBC	Swab <sup>b</sup>	Count (cells/mL)	Isolated strains
F, 18	Gent + Amp	36.7			X				<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
M, 31	Cefa + Cidr	37.3			X				<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
M, 71	Gent + Cidr	38.1			X				>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 64	Gent + Cidr + Acv	37.1					X		>10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
								X	-	<i>C. albicans</i>
M, 23	Gent + Cidr	38.7				X			>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
				X					<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 17	-	37.6	X						<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 57	Cefa + Oxa	38.4	X						<10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
M, 66	Amp + Cefo	37.3				X			<10 <sup>3</sup>	<i>C. albicans</i>
F, 41	Cefa + Oxa	38.0		X					>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>
F, 46	-	37.0		X					>10 <sup>3</sup>	<i>C. glabrata</i>

**Notes:** <sup>a</sup>Patient's temperature at the time of sampling; <sup>b</sup>swabbing of the patient's tongue.

**Abbreviations:** F, female; M, male; ATB, antibiotic therapy; Gent, gentamicin; Amp, ampicillin; Cefa, cefazolin; Cidr, ciprofloxacin; Acv, acyclovir; Oxa, oxacillin; Cefo, cefotaxime; CVC, central venous catheter; PVC, peripheral venous catheter; TP, tracheotomic probe; UP, urinary probe; OBC, orobronchial catheter; *C. glabrata*, *Candida glabrata*; *C. albicans*, *Candida albicans*.

the rate of *C. glabrata* has increased as a cause of bloodstream infection in American ICUs since 1993.

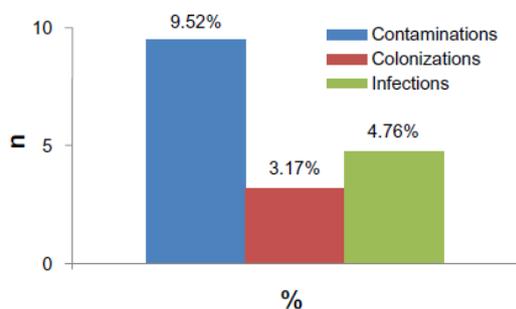
## Types of catheter infectivity

Figure 1 shows the results of the types of catheter infectivity. In total, three different types were observed: six (9.52%) cases were contaminations, two (3.17%) cases were colonizations, and three (4.76%) cases were infections. The distinction between these different infectivity types was made according to previous definitions,<sup>19,24</sup> and the counting of the yeast cells was accomplished using Thoma cells and the collected clinical data. These same observations were also distinguished in all the other medical departments of the University Hospital Center mentioned above (Seddiki et al, unpublished data, 2012).

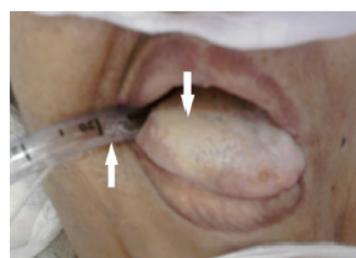
Similarly to Carrière and Marchandin,<sup>19</sup> three different types of catheter infectivity were reported: contamination, colonization, and infection. The rate of contamination of catheters was higher than the rates of colonization and infection; this explains, in part, the difficulty in diagnosis of catheter-related candidiasis.

The increase in acquired fungal infections in hospital, particularly in candidiasis, has been attributed to the ability of fungi to adhere to the invasive devices that are used for treatment.<sup>38</sup> According to Bleichner et al,<sup>39</sup> the frequency of isolation of *Candida* spp. in catheter-related infections ranges from 2% to 5%.<sup>39</sup> However, catheter-related infection is preceded by the colonization of the distal end of the catheter, and quantitative culture must be used to confirm that the catheter is the source of the signs of infection.<sup>19</sup>

Figure 2 shows the OBC colonized by *C. albicans* in the previously described patient. The count of yeast cells isolated from this catheter was higher than  $10^3$  cells/mL (Brun-Buisson technique). The patient's temperature during the sampling was 37.1°C; however, the patient was given an infusion solution of paracetamol, which prevented an increase of temperature,



**Figure 1** Rates of different types of infectivity of implanted medical devices observed in the intensive care unit.



**Figure 2** Microbial propagation between the patient's tongue and the implanted orobronchial catheter.

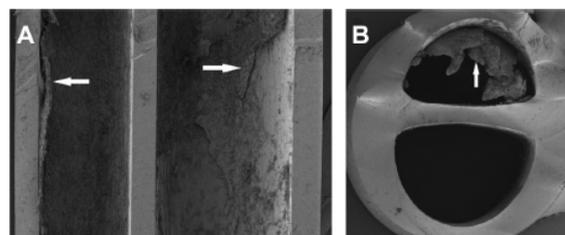
**Note:** Arrows indicate a white carpet of *Candida albicans* on the infected patient's tongue and the observed *C. albicans* biofilm on the orobronchial catheter.

and the same patient was also treated with broad-spectrum antibiotics. We also observed a white carpet on the patient's tongue, from which the isolate strain revealed *C. albicans*.

The observation of the sample (swabbing of the tongue surface) under an optical microscope revealed the existence of yeast cells and elongated hyphal forms. Interestingly, these different forms exist in the biofilms of *C. albicans*;<sup>25</sup> thus, it is possible that this carpet was a biofilm of *C. albicans*, and it may possibly have indicated a dissemination of this yeast between the tongue and the OBC implanted in the neighboring area.

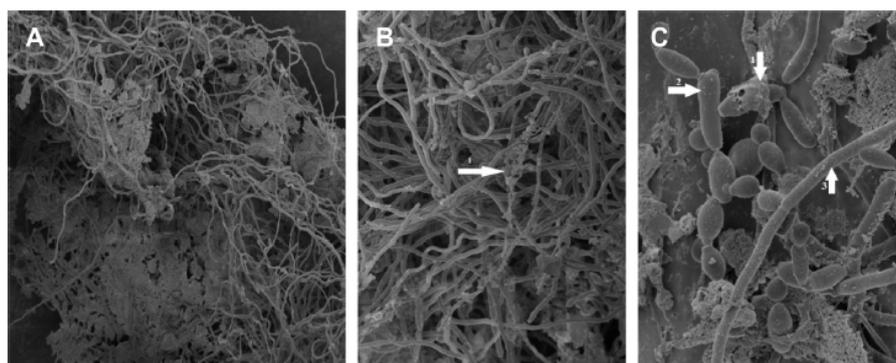
Fungi have the ability to adhere not only to human tissues, but also to any invasive devices.<sup>38</sup> In fact, the acquisition of *C. albicans* in the ICU seems to be mainly endogenous.<sup>40,41</sup> Oropharyngeal candidiasis is a common opportunistic infection occurring in immunocompromised patients.<sup>42</sup> It appears as a white, elevated, mossy substance attached to the tongue surface or oral mucosa.<sup>43,44</sup> It has been reported that oral *C. albicans* colonization increases remarkably in diabetic patients, especially in women with diabetes.<sup>45</sup> In addition, biofilms contribute to the pathogenesis of oral candidiasis,<sup>46</sup> and its presence on the surface of medical implants may constitute a risk factor for persistent candidiasis.<sup>15,47</sup>

In our study, most of the patients (including this one) had been treated with broad-spectrum antibacterial agents. *Candida* colonization, indeed, is strongly linked to the receipt of antibiotics, particularly broad-spectrum ones.<sup>48</sup>



**Figure 3** SEM of (A) longitudinal and (B) lateral cuts performed on the CVC. **Notes:** Arrows indicate a layer of *Candida albicans* biofilm attached to the inner surface of the CVC. Magnification  $\times 35$ .

**Abbreviations:** SEM, scanning electron microscope; CVC, central venous catheter.



**Figure 4** SEM of a mixture of morphological forms of *Candida albicans* biofilm developed on the inner surface of the CVC. Magnification: (A)  $\times 450$ ; (B)  $\times 1100$ ; (C)  $\times 4500$ .

**Notes:** Arrows: 1 = ECM; 2 = pseudohypha; 3 = hypha.

**Abbreviations:** SEM, scanning electron microscope; CVC, central venous catheter; ECM, extracellular matrix.

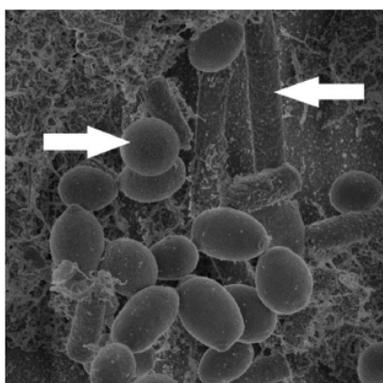
## Biofilm observation with SEM

*C. albicans* biofilm from the inner surface of the CVC segments was examined and imaged with SEM.

Longitudinal and lateral cuts performed on the CVC (Figure 3A and B, respectively) revealed a dense layer of *C. albicans* biofilm attached to the inner surface of the CVC; however, its external surface was not affected by the biofilm.

With higher magnifications of SEM, the structure of the biofilm could be demonstrated. Figure 4A–C shows a mixture of morphological forms of *C. albicans* biofilm. This biofilm revealed a dense network of yeasts, pseudohyphae, and hyphae. The extracellular matrix was also observed; it coated cells and hyphae.

The OBC of the female patient was contaminated by *C. albicans* biofilm. This is shown clearly in Figure 5, which also shows the complex structure of the biofilm. *C. albicans* biofilm was formed by yeast cells, pseudohyphae, hyphae, and a visible matrix.



**Figure 5** SEM of the contaminated OBC showing *Candida albicans* biofilm.

**Notes:** Arrows indicate a yeast cell and hypha. Magnification  $\times 6000$ .

**Abbreviations:** SEM, scanning electron microscope; OBC, orobronchial catheter.

In Andes et al,<sup>49</sup> the SEM of the biofilm on catheter segments demonstrated more clearly the heterogeneous architecture of the biofilm structure. In their work, SEM of in vivo *C. albicans* biofilm showed a mature biofilm that consisted of a dense network of yeasts cells, hyphae, and pseudohyphae. Further, the same results were observed by Hawser and Douglas<sup>50</sup> 10 years before.

In addition, biofilms of *C. albicans* consist of matrix-enclosed microcolonies containing yeasts, hyphae, and pseudohyphae. The biofilm is arranged in a bilayer structure<sup>51</sup> consisting of a thin yeast layer and an upper hyphal layer.<sup>52</sup> In a recent study, the structure of the biofilm was investigated using SEM, and this study, indeed, revealed an extracellular matrix material coating the cells.<sup>53</sup> In fact, adjacent to the catheter surface, yeast cells were densely embedded in an extracellular matrix.<sup>48</sup>

## Conclusion

Progress in the medical field is constantly evolving; however, clinical, epidemiological, and microbiological studies have so far failed to prevent nosocomial infections and, in particular, those of fungal origin. The current study is, to the authors' knowledge, the first survey of an ICU in Algeria. It highlights the nosocomial candidemia related to medical implants (catheters, probes, intubations, etc) by calculating their rates and by determining the causative strains and the various types of catheter infectivity. These infections, in fact, are serious additional risks acquired by critically ill patients who require significant intensive care.

According to the literature, there is no accepted method by which to evaluate the types of catheter fungal infectivity. Within this frame, our study has shown that the Brun-Buisson method seems to be suitable for these studies. Our results revealed three different types

of catheter infectivity: contaminations (9.52%), infections (4.76%), and colonizations (3.17%). In addition, the results prove that *C. glabrata* was strongly involved in the contamination of catheters; this species was more frequently isolated from the implanted medical devices than *C. albicans*.

On the other hand, SEM revealed the formation of biofilms of *C. albicans* on the surfaces of the catheters. Consequently, biofilms constitute a major problem in the diagnosis of candidiasis.

To conclude, it is highly recommended that vigilance be exercised when using medical implants to prevent fungal infections, especially in ICUs. To this end, in developing countries, the surveillance of nosocomial infections caused by fungi remains an open discussion, and further studies are warranted in this field.

## Acknowledgments

The authors express great appreciation for the support provided by Prof Bertrand Dupont. We also wish to thank Mr Brahim Yala, teacher of English, for reviewing and correcting this manuscript.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

- Vandijck D, Blot S, Labeau S, et al. Candidemia in critically ill patients: An analysis of daily antifungal therapy related costs. *J Mycol Med*. 2008;18(2):96–99.
- Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2010;14(11):e954–e966.
- Eloy O, Marque S, Mourvilliers B, et al. Contribution of the Pittet's index, antigen assay, IgM, and total antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis in intensive care unit. *J Mycol Med*. 2006;16(3):113–118.
- Eggimann P, Pittet D. Candidoses en réanimation [Candidiasis in the ICU]. *Réanimation*. 2002;11:209–221. French.
- Seabra R, Bhogal N. Hospital infections, animal models and alternatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(6):561–568.
- Develoux M, Bretagne S. Candidiasis and yeast infections. *EMC-Maladies Infectieuses*. 2005;2(3):119–139.
- Gürçüoğlu E, Akalın H, Ener B, et al. Nosocomial candidemia in adults: Risk and prognostic factors. *J Mycol Med*. 2010;20(4):269–278.
- Maknia F, Sellamia A, Trabelsi H, et al. Yeast species isolated in the CHU of Sfax, Tunisia. *J Mycol Med*. 2010;20(1):42–47.
- Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK Jr, Reed SD. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control*. 2010;38(1):78–80.
- Ruan SY, Lee LN, Jerng JS, Yu CJ, Hsueh PR. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(2):136–140.
- Avila-Aguero ML, Canas-Coto A, Ulloa-Gutierrez R, Caro MA, Alfaro B, Paris MM. Risk factors for *Candida* infections in a neonatal intensive care unit in Costa Rica. *Int J Infect Dis*. 2005;9(2):90–95.
- Picazo JJ, González-Romo F, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Suppl 2:S83–S85.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*. 2005;4(4):633–638.
- Khan S, Alam F, Azam A, Khan AU. Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm. *Intl J Nanomedicine*. 2012;7:3245–3257.
- Boucherit-Atmani Z, Seddiki SML, Boucherit K, Sari-Belkharoubi L, Kunkel D. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *J Mycol Med*. 2011;21(3):182–187.
- Soni N, Wagstaff A. Fungal infection. *Curr Anaesth Crit Care*. 2005;16(4):231–241.
- Veyssier P, Domart Y, Liebbe AM. *Infections Nosocomiales [Nosocomial Infections]*, 2nd ed. Paris: Collection Abrégés de Médecine; 1998. French.
- Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 1994;220(6):751–758.
- Carrière C, Marchandin H. Infections liées aux cathéters veineux centraux: diagnostic et définitions [Infection linked to central venous catheters: diagnosis and definitions]. *Néphrologie*. 2001;22(8):433–437. French.
- Timsit JF, Wolff M, Mourvillier B, Schortgen F, Régnier B. Diagnosis and management of catheter-related infections in the ICU. *Méd Mal Infect*. 2003;33(12):619–627.
- Gallien S, Sordet F, Enache-Angoulvant A. Treatment of catheter-related candidemia. *J Mycol Med*. 2007;17(1):42–49.
- Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med*. 2002;113(6):480–485.
- Kadir T, Pisiriciler R, Akyüz S, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiological and systemic factors. *J Oral Rehabil*. 2002;29(5):452–457.
- Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med*. 1987;147(5):873–877.
- Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008;3(12):1909–1924.
- Timsit JF, Dubois Y, Minet C, et al. New materials and devices for preventing catheter-related infections. *Ann Intensive Care*. 2011;1:34.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, et al; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1829–1835.
- Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, et al. Antifungal treatment of systemic candidiasis in intensive care unit. *J Mycol Med*. 2006;16(1):16–25.
- Chalmers CM, Bal AM. Management of fungal infections in the intensive care unit: a survey of UK practice. *Br J Anaesth*. 2011;106(6):827–831.
- Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15(6):569–574.
- Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):80–96.
- Ruan SY, Huang YT, Chu CC, Yu CJ, Hsueh PR. *Candida glabrata* fungaemia in a tertiary centre in Taiwan: antifungal susceptibility and outcomes. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(3):236–239.
- Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1519–1527.

34. Tortorano AM, Caspani L, Rigoni AL, Biraghi E, Sicignano A, Viviani MA. Candidiasis in the intensive care unit: a 20-year survey. *J Hosp Infect.* 2004;57(1):8–13.
35. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, et al. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;33(4):217–222.
36. Klevay MJ, Ernst EJ, Hollanbaugh JL, Miller JG, Pfaller MA, Diekema DJ. Therapy and outcome of *Candida glabrata* versus *Candida albicans* bloodstream infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(3):273–277.
37. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP; National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin Infect Dis.* 2002;35(5):627–630.
38. Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(7):533–540.
39. Bleichner G, Beaucaire G, Gottot S, et al. Infections liées aux cathéters veineux centraux en réanimation [Infections related to central venous catheters in intensive care]. *Réan Urg.* 1994;3:321–330. French.
40. Abbes S, Sellami H, Sellami A, et al. Variability of *Candida albicans* strains in ICU in Tunisia hospital. *J Mycol Med.* 2008;18(1):10–15.
41. Bouza E, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units; *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32 Suppl 2:S87–S91.
42. Nairy HM, Charyulu NR, Shetty VA, Prabhakara P. A pseudo-randomised clinical trial of in situ gels of fluconazole for the treatment of oropharyngeal candidiasis. *Trials.* 2011;12:99.
43. Hoshi N, Mori H, Taguchi H, et al. Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res.* 2011;55(1):48–52.
44. Yang YL, Lo HJ, Hung CC, Li Y. Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. *BMC Infect Dis.* 2006;6:8.
45. Javed F, Klingspor L, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engström PE. Periodontal conditions, oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *BMC Oral Health.* 2009;9:12.
46. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol.* 2007;52(12):1200–1208.
47. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat.* 2004;7(4–5):301–309.
48. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns.* 2011;37(2):181–195.
49. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and Characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.* 2004;72(10):6023–6031.
50. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* 1994;62(3):915–921.
51. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19(3):139–143.
52. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003;11(1):30–36.
53. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryotic Cell.* 2011;10(12):1660–1669.

## International Journal of General Medicine

### Publish your work in this journal

The International Journal of General Medicine is an international, peer-reviewed open-access journal that focuses on general and internal medicine, pathogenesis, epidemiology, diagnosis, monitoring and treatment protocols. The journal is characterized by the rapid reporting of reviews, original research and clinical studies across all disease areas.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-general-medicine-journal>

A key focus is the elucidation of disease processes and management protocols resulting in improved outcomes for the patient. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.



Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
www.em-consulte.com



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

## ***Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B**

*Les biofilms de Candida albicans formés dans des cathéters et des sondes et leur résistance à l'amphotéricine B*

Z. Boucherit-Atmani<sup>a</sup>, S.M.L. Seddiki<sup>a,\*</sup>, K. Boucherit<sup>a</sup>,  
L. Sari-Belkharoubi<sup>a</sup>, D. Kunkel<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Abou-bekr-belkaid, laboratoire antibiotique antifongique, physico-chimique synthèse et activité biologique, département de biologie, BP 119, Imama 13000 Tlemcen, Algeria

<sup>b</sup> Dennis Kunkel Microscopy, Inc. P.O. Box 2008 Kailua, HI 96734, USA

Received 3 March 2011; accepted 6 July 2011

### KEYWORDS

*Candida albicans*;  
Nosocomial infections;  
Catheters;  
Biofilms;  
Chlamyospore

### MOTS CLÉS

*Candida albicans* ;  
Infections nosocomiales ;

**Summary** In Algeria, many bacterial biofilms have been studied but those of fungal origin, particularly those due to the yeast *Candida albicans* remained unidentified. The present study was performed at the Chabane Hamdoune hospital in Maghnia (Algeria), where 51 strains of *C. albicans* representing 16.94% of all taken samples were isolated. They were collected from catheters and probes used in different hospital services with variable rates; the most concerned service was ICU (40.74%) followed by gynecology department (17.39%), while general surgery came third (15.79%). Testing the antifungal property of amphotericin B (AmB) we showed clearly that the sessile cells of *C. albicans* were much more resistant than their planktonic counterparts (suspended cells), especially when the resistance increased during the different phases of biofilm formation until it reached its threshold at the ripening stage (at 48 h). Furthermore, scanning electron microscopy of the isolated strains in the laboratory revealed the formation of biofilms on catheters by *C. albicans*. Surprisingly, observations revealed the presence of a new structure in these biofilms: a chlamyospore?

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Résumé** En Algérie, les biofilms bactériens dans le milieu hospitalier ont été largement étudiés, cependant les biofilms fongiques, surtout ceux de *Candida albicans* n'ont pas été clarifiés. De ce fait, notre travail a été effectué à l'hôpital Chabane Hamdoune de Maghnia (Algérie) où 51 souches de *C. albicans* ont été isolées représentant 16,94 % de l'ensemble des

\* Corresponding author.

E-mail address: sdadek@hotmail.com (S.M.L. Seddiki).

Cathéters ;  
Biofilms ;  
Chlamydo-spore

prélèvements effectués. Ces souches sont isolées des différents services de l'hôpital à partir des cathéters et des sondes après leur ablation. Il s'est révélé que le service le plus affecté est celui de l'unité des soins intensifs (40,74 %), suivi par le service de gynécologie (17,39 %), tandis que celui de la chirurgie générale se classe en troisième rang (15,79 %). Les tests antifongiques de l'amphotéricine B (AmB) ont montrés clairement que les cellules sessiles de *C. albicans* sont beaucoup plus résistantes que leurs homologues planctoniques (cellules en suspension), cette résistance augmente au cours des différentes phases de la formation des biofilms jusqu'à ce qu'elle atteigne son seuil à la phase de maturation (48 heures). La microscopie électronique à balayage effectuée sur les souches isolées de *C. albicans* prouve la formation des biofilms sur les cathéters ; étonnamment, l'observation a aussi révélée la présence d'une nouvelle structure dans le biofilm de *C. albicans* : une chlamydo-spore ?

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## Introduction

The hospital is considered an ecosystem where the patients come into contact with the microbial world and face the risk of catching an infection that is termed the nosocomial [11], however, some yeasts are opportunist pathogens that were the most responsible *Candida albicans* [4]. In fact, most of the manifestations of candidiasis are associated with the formation of biofilms at a wide range of implanted medical devices like catheters. In addition, the resistance of *C. albicans* biofilms is a multifactorial phenomenon [8] because biofilms escape the immune response [22] and significantly reduce the sensitivity to antifungal therapy [1,24]. On the other side, one distinct characteristic of *C. albicans* is its ability to produce chlamydo-spores that are formed on the ends of elongated suspensor cells attached to hyphae, and as it is known, the chlamydo-spore is a distinctive morphological feature of the fungal pathogen *C. albicans* that can be formed in nutrient depletion and oxygen-limited environments. Indeed, according to [20], the chlamydo-spore has been reported in clinical specimen and the oxygen decreased in the biofilms. The role of chlamydo-spores in the normal life cycle or pathogenicity of *C. albicans* is about to be established and this structure was rarely observed in tissue samples [3,6,25,31].

And in fact, our study was done within this framework at the hospital Chabane Hamdoune hospital in Maghnia (Algeria). The work involves isolation of the yeast *C. albicans* from catheters directly after removing them from patients, and testing their resistance to the antifungal amphotericin B (AmB) with the calculation of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Sessile Minimal Inhibitory Concentration (SMIC) using different protocols; and then their ability to form biofilms.

## Materials and methods

The samples were taken from the intensive care units, general surgery, pediatrics, internal medicine and gynecology. These samples were taken from implanted catheters and probes for 48 hours or more; according to [12], candidemia that developed after 48 hours of hospitalization were considered nosocomial.

The catheters and probes were taken directly from patients and placed in Sabouraud liquid medium. To avoid contamination, the tubes were opened in front of a torch, then quickly flamed and sealed after cutting the distal ends

of the catheters using sterile scissors, and the probes were cut using sterile scalpels. The tubes were then agitated in a vortex for 1 minute. Purified strains were identified by biochemical methods and microculture.

## Antifungal susceptibility testing

Isolated strains were subjected to the action of AmB. The ability of *C. albicans* strains to form biofilms is considered positive if the sessile minimum inhibitory concentrations (SMIC) are above the minimum inhibitory concentrations (MIC). For this, we referred to Ramage et al. 2001 [24] and NCCLS M-27A [19] protocols. Antifungal activity was tested on isolated strains and two reference strains: *C. albicans* (ATCC 10231) and *C. albicans* (IP 444).

Pure AmB (Bristol-Myers Squibb, Princeton, N.J.) was used in this study. RPMI (with glutamine, without bicarbonate, and with a pH indicator) is the broth medium recommended for the susceptibility testing of yeasts. The medium was buffered with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) "0.164 moles/L".

SMICs were determined using the XTT reduction assay described below.

## XTT reduction assay

Tetrazoliums salts "XTT" (Sigma) were used as colorimetric indicators, and yeast cells converted them to colored formazan derivatives that can be detected.

The metabolic activity of fungal cells was determined by the XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) reduction assay with minor modifications [24]. Testing these isolated strains was performed in duplicate.

## Observations of *Candida albicans* biofilms with scanning electron microscopy (SEM)

To highlight the formation of biofilms on medical implants and observe their structures, a catheter (removed from a woman patient after an exposure time of 3 days) was randomly selected and preserved with glutaraldehyde fixative (see below) and sent to "Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Kailua, Hawaii, USA" for scanning electron microscopy (SEM). The stem parts from this catheter were also examined.

The patient from who the catheter was removed for SEM imaging was a hospitalized diabetic woman in the internal medicine department, aged of 68 years and had a chronic hepatitis B.

### Sample preparation

Before sending the samples to the SEM laboratory, they were fixed with glutaraldehyde (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) referring to the previously described protocols [4,23].

To prepare the stem pieces of catheter, the procedure is as follows:

- *C. albicans* biofilm were rinsed with PBS (0.1 M, pH 7.4). For this, 2 mL of cells suspension were placed in a sterile haemolysis tube and then centrifuged at 3600 rpm for 5 minutes;
- 2 mL of PBS (0.1 M, pH 7.4) were added to the pellet (cells). The cells could survive for short period and were not affected osmotically before fixation;
- 1.5 mL of the previous suspension was introduced in a sterile eppendorf tube, glutaraldehyde (50% stock, EM grade), was added for a final concentration of 2.5% (v/v) and this mixture was then agitated slightly;
- eppendorf tubes were sealed by adding an adhesive film, numbered and then placed in another vial and left 12 hours at 4 °C before shipment to the SEM laboratory for observations.

To prepare sample of the catheter, the procedure is as follows:

- add 2.5% (v/v) glutaraldehyde (50% stock, EM grade) to 1 mL of PBS (0.1 M, pH 7.4) in an eppendorf tube;
- the parts of the catheter were cut 7 to 8 mm in length and placed in the eppendorf tubes containing the glutaraldehyde;
- the tubes were sealed and stored as described above.

### Photography by scanning electron microscopy

SEM preparation of isolated yeast and catheter pieces was performed according to [5]. The samples were examined using a Hitachi S-4800 field emission scanning electron microscope (FESEM) at the University of Hawaii (Biological Electron Microscopy Facility, Honolulu, Hawaii, USA) by "Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Kailua, Hawaii, USA".

### Result and discussion

Candidiasis is the most common fungal infection in hospitals; *C. albicans* is the most responsible of these diseases, and its origin can be a colonized catheter. These yeasts may cause a potential risk to patients by providing a permanent source of infectious agent often escaping antimicrobial treatments and the host immune defenses [13,14].

In the present study, 301 samples were taken to Hospital Chabane Hamdoune (Maghnia) and 51 strains of *C. albicans*

were isolated from catheters and probes after their ablations representing 16.94% of all samples. These strains were divided between different services as follows: general surgery, gynecology and ICU with 15, 12 and 11 strains respectively, while in the pediatric and internal medicine, seven and six strains were respectively isolated.

When calculating the rate of isolated strains of *C. albicans* by the number of samples in each department, the ICU came first place with 40.74% followed by gynecology department with 17.39% and the general surgery department with 15.79%. According to the obtained results, pediatric service and internal medicine were the least affected by these contaminations with rates of 12% and 11.66% respectively.

These results are consistent with other studies [29] that demonstrated the importance of *C. albicans* as a causative agent of opportunistic infections. Indeed, infections due to this yeast were classified in fourth place in nosocomial infections and third in catheter-related infections [10]. In addition, Hot et al. (2007) confirmed that the use of catheters is a risky factor of fungal infections [14]. Contrary to our results, Diskin (2008) found that only 2.8% of catheter-related infections are caused by *C. albicans* [7].

### Determination of Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) and Sessile Minimal Inhibitory Concentration (SMICs)

Table 1 shows the MICs and SMICs results with AmB of reference and isolated strains, the MICs of strains *C. albicans* ATCC 10231 and *C. albicans* IP 444 were identical (0.5 µg/mL).

As far as the isolated strains are concerned, the MICs of AmB were ranged from 0.5 and 2 µg/mL (Table 1).

From these results, MICs of 25 isolated strains were higher than those of reference strains. We notice that the SMICs of reference strains (*C. albicans* ATCC10231 and *C. albicans* IP 444) were 2 and 4 µg/mL respectively. Thus, these SMICs were higher than MICs, in addition, eight isolated strains had

**Table 1** MICs and SMICs of amphotericin B of reference and isolated strains according to NCCLS M27-A and Ramage et al. (2001) protocols.

*CMI et SCMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des souches de références et des souches de Candida albicans isolées selon les protocoles de NCCLS M27-A et de Ramage et al. (2001).*

Number of strains	Rates (%)	MIC (µg/mL)	SMIC (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	—	0.5	2
<i>C. albicans</i> IP444	—	0.5	4
3	6.38	0.5	0.5
1	2.13	0.5	1
2	4.26	1	0.5
2	4.26	1	1
4	8.51	0.5	4
14	29.79	0.5	8
7	14.89	1	8
8	17.02	1	16
6	12.76	2	16

SMICs between 0.5 and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; these SMICs were identical to MICs. From the same table, 39 strains had SMICs included between 4 and 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , these values were significantly higher than MICs. In fact, these results conducted to the following: the sessile cells of reference and isolated strains were much more resistant to AmB than planktonic cells, especially when the biofilm made mature (data not shown). These results showed that reference strains and 39 isolated strains had the ability to form biofilms [24]; however, eight isolated strains could not form biofilms.

Our results, indeed, are consistent with those of others [4,27] who marked the MIC of a strain of *C. albicans* as 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while the SMIC is 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As it is known, AmB has an inhibitory effect on sessile cells of *C. albicans* at higher concentrations than that of its therapeutic range [2,9,23], it is true that *C. albicans* biofilms are less susceptible to many antifungal agents [1,15,21] and the formation of biofilms leads to a numerous therapeutic failures in the antifungal treatment [18].

### Observation of *Candida albicans* biofilm with scanning electron microscopy

Fig. 1 and Fig. 2 show SEM images of biofilm of isolated strain MIFKT4.

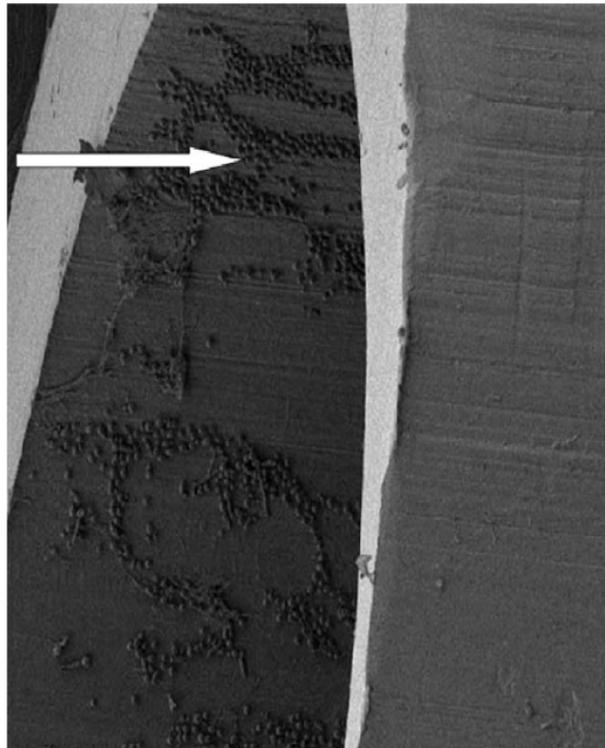
Fig. 1 is an SEM image of an infected catheter (inner surface) by *C. albicans* MIFKT4, we observe areas consisting of yeast cells attached to the inside of the catheter, these yeast cells formed the first layer of the biofilm, and they

adhere strongly to the surface of the catheter. We also observe some clear areas where the biofilms were detached after the 1-minute vortex treatment. This implies that the biofilms of *C. albicans* cannot be detached completely in the vortex for 1 minute; thus, this operation does not affect the biofilm yeast cells adhesion. On the other hand, we did not view the extracellular matrix (Fig. 1).

Indeed, scanning electron microscopy provides detailed images of the surface topography of biofilms at high magnification, allowing clear view of yeast biofilms on the inner surfaces of catheters, but it results in the dehydration of extracellular matrix due to measurements made during sample preparation (fixation and dehydration in the laboratory of electronic imaging).

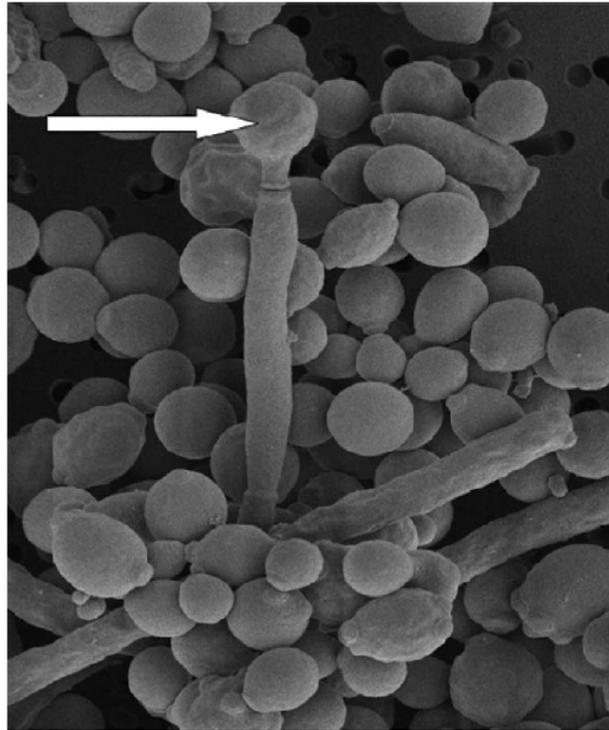
In contrast, the detachment of biofilms of *C. albicans* plays an important role in biomaterials' infections, and cells biofilms are not sufficiently dispersed by vortexing alone [26]. Moreover, our results are consistent with reports [15,16] which demonstrated that the basal layer of *C. albicans* biofilms consists of yeast cells.

Fig. 2 shows the strain MIFKT4 detached from the biofilm after catheter vortexing for 1 minute. We observe a dense layer of yeast cells that are detached from the surface of the catheter; we also observe hyphae and pseudohyphae characterizing mature biofilms. We obtained other SEM images that showed the existence of these forms (unpublished data). It is therefore evident that the strain *C. albicans* MIFKT4 formed the biofilm on the internal surface of the catheter.



**Figure 1** SEM of the infected catheter on its inner surface by *Candida albicans* MIFKT4. The arrow indicates the yeast cells (magnification  $\times 110$ ).

Microscopie électronique à balayage du cathéter infecté par la souche de *Candida albicans* MIFKT4 sur sa face interne. La flèche indique les cellules de levures. (Grossissement  $\times 110$ ).



**Figure 2** SEM of the recovered biofilm of the strain *Candida albicans* MIFKT4 after vortexing the catheter for 1 minute. The arrow indicates the Chlamydospore (magnifications  $\times 4000$ ).

*Microscopie électronique à balayage de la souche Candida albicans MIFKT4 isolée après agitation du cathéter au vortex pendant une minute. La flèche indique la chlamydospore (grossissements  $\times 4000$ ).*

Surprisingly, we also observed a different structure from yeast cells and filamentous forms compared to others that we obtained by the SEM, it was found that this structure was unique and not like other structures of yeast blastospores. Thus, we think that this structure is a chlamydospore. Among all isolated strains of *C. albicans*, only the strain MIFKT4 presented the chlamydial structure in the biofilm (Fig. 2).

A mature biofilm of *C. albicans* influenced by the phenotypic changes is formed from complex combinations of cell types and exists as yeast cells, hyphae and pseudohyphae [2,28,30]. On the other hand, some environmental conditions guide to the formation of chlamydospores like the limit of oxygen, nutrient depletion and low cellular metabolic activity [20]. In addition, farnésol (a quorum sensing in *C. albicans* biofilms) which inhibits the formation of filaments also stimulates the formation of chlamydospores [17]. Besides, most of the *C. albicans* clinical isolates are able to induce the formation of chlamydospores and this, in fact, indicates the important role of chlamydospores in *C. albicans* biology [28].

## Conclusion

Nosocomial infections caused by bacteria associated with medical implants, especially catheters, have been the subject of intense researches for a long time in Algeria, but the infections of fungal origin, particularly those caused by *C. albicans* have not been clarified yet.

The importance of conducting our study at Chabane Hamdoune Hospital (Maghnia-Algeria) was to evaluate the rate of contamination of catheters and probes by *C. albicans*, to check its ability to form biofilms and to test its resistance to AmB.

In this study, 51 strains of *C. albicans* representing 16.94% of all taken samples were isolated. They were divided between different services as follows: general surgery, gynecology and ICU with 15, 12 and 11 strains respectively, while in the pediatric and internal medicine, seven and six strains were respectively isolated.

The severity of these infections is due to the insignificant response of biofilms to AmB, indeed, *C. albicans* sessile cells are more resistant than their planktonic counterparts. Moreover, this resistance increases with the development of biofilms, from the adhesion phase to the maturation phase.

Most isolated strains have the ability to form biofilms, and SEM images of some catheters proved the formation of biofilms by *C. albicans*. The yeast cells of strain MIFKT4 adhered to the inner surface of the catheter, forming the first layer of the biofilm, however, we observed for the first time a chlamydial form within *C. albicans* biofilm.

The essential recommendations summarize in the limiting of the indications and duration of catheterization, and manipulations on infusion lines should be minimized.

Future studies may hopefully look into the management of nosocomial infections that are caused by other *Candida* strains and other fungal organisms.

Finally, investigating the possible role of chlamydo spores in *C. albicans* biofilms will be an exciting challenge for future researches. It is, therefore, important to make researches to see if and how *C. albicans* biofilms benefit from the ability to form chlamydo spores.

### Disclosure of interest

The authors declare they have no conflict of interest concerning this article.

### Acknowledgments

We would like to thank Prof Mahmoud A. Ghannoum for his recommendations and suggestions that have been invaluable for our project. We also wish to thank Mr. Brahim Yala, teacher of English for his help.

### References

- [1] Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1884–7.
- [2] Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:588–94.
- [3] Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L, Chenebault JM. *Candida albicans* chlamydo spores observed in vivo in a patient with AIDS. *Ann Biol Clin (Paris)* 1988;46:817–8.
- [4] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385–94.
- [5] Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc* 2008;3:1909–24.
- [6] Cole GT, Seshan KR, Phaneuf M, Lynn KT. Chlamydo spore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol* 1991;37:637–46.
- [7] Diskin CJ. Heparin, biofilm, and catheter-related sepsis. *Diag Microbiol Infect Dis* 2008;61:80–1.
- [8] Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001;33:1387–92.
- [9] Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002;19:139–43.
- [10] Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003;11:30–6.
- [11] Gaynes R, Richards C, Edwards J, Emori TG, Horan T, Alonso-Echanove J, et al. The National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Hospitals. Feeding back surveillance data to prevent hospital-acquired infections. *Emerg Infect Dis* 2001;7:295–8.
- [12] Gürcüoğlu E, Akalın H, Ener B, Ocakoglu G, Şırtas M, Akçağlar S, et al. Nosocomial candidemia in adults: risk and prognostic factors. *J Mycol Med* 2010;20:269–78.
- [13] Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2128–31.
- [14] Hot A, Mittaine B, Dupont B. Infections fongiques invasives du grand prématuré. *J Mycol Med* 2007;17:33–41.
- [15] Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1773–80.
- [16] Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:608–11.
- [17] Martin SW, Douglas LM, Konopka JB. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydo spores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot Cell* 2005;4:1191–202.
- [18] Miao H, Minquan D, Mingwen F, Zhuan B. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2007;163:137–43.
- [19] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- [20] Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamydo spore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 2003;149:3629–37.
- [21] Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2454–63.
- [22] Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005;4:633–8.
- [23] Ramage G, VandeWalle K, Bachmann SP, Wickes BL, López-Ribot JL. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3634–6.
- [24] Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2475–9.
- [25] Schonborn C, Schmidt G. Demonstration of *Candida albicans* chlamydo spores in the dermatological specimen. *Mykosen* 1971;14:119–25.
- [26] Sellam A, Al-Niemi T, McInnery K, Brumfield S, Nantel A, Suci PA. A *Candida albicans* early stage biofilm detachment event in rich medium. *BMC Microbiol* 2009;9:1–22.
- [27] Shuford JA, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. *J Infect Dis* 2006;194:710–3.
- [28] Sonneborn A, Bockmuhl DP, Ernst JF. Chlamydo spore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 1999;67:5514–7.
- [29] Wesenberg-Ward KE, Tyler BJ, Sears JT. Adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on native and Pluronic-treated polystyrene. *Biofilms* 2005;2:63–71.
- [30] Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:350–7.
- [31] Wilborn WH, Montes LF. Scanning electron microscopy of oral lesions in chronic mucocutaneous candidiasis. *JAMA* 1980;244:2294–7.