



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

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 activité biologique

MEMOIRE

Présenté

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie Appliquée

Par

Inscrit sous le N°: 972
Date le:
Code: 1609-12

M^r SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib

Thème

**Etude de quelques facteurs de pathogénicité
liés aux infections fongiques hospitalières
(production de biofilms et résistance)**

Soutenue en 2010

Devant le jury :

Président : M^r Boucherit Kebir

Maître de Conférences, Université Tlemcen

Promoteur : M^{me} Boucherit -Atmani Zahia

Maître de Conférences, Université Tlemcen

Examineurs : M^{me} Sari Lamia

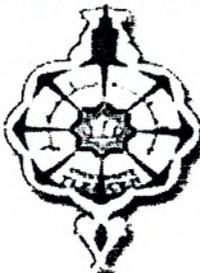
Maître de Conférences, Université Tlemcen

M^{me} Hassaïne Hafida

Maître de Conférences, Université Tlemcen

M^r Drissi Mourad

Maître de Conférences, Université Tlemcen



Année Universitaire : 2009 - 2010

RESUME

Candida albicans est une levure pathogène pour l'homme, elle est responsable de plus de 75% de mycoses invasives ou systémiques. Actuellement, ces infections sont classées au quatrième rang des infections nosocomiales. Ces dernières, sont liées essentiellement aux dispositifs médicaux tels que les cathéters et les sondes urinaires] qui favorisent la formation des biofilms.

Dans ce contexte nous avons entrepris cette étude au niveau de l'hôpital CHABANE HAMDOUNE de Maghnia, qui consiste à isoler des souches de *Candida albicans* à partir de cathéters et de sondes urinaires usés directement après leurs excisions des patients et de vérifier, d'une part, leur pouvoir à former des biofilms, d'autre part, de tester leur résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B, l'antifongique le plus utilisé en milieu clinique.

Sur 301 prélèvements, 51 souches de *Candida albicans* ont été isolées. Il ressort de cette étude que les tests antifongiques vis-à-vis de l'AmB montrent clairement que les cellules sessiles (biofilms) de *Candida albicans* sont largement plus résistantes que leurs homologues planctoniques. De plus, la résistance du biofilm à l'AmB dépend de la concentration cellulaire de départ, du renouvellement du milieu de culture et de la durée d'incubation qui traduit le degré de maturation du biofilm.

De plus, l'imagerie en microscopie électronique effectuée au laboratoire « Dennis Kunkel Microscopy, Inc » en USA montre la formation, par *C. albicans*, de biofilms sur les surfaces internes des cathéters.

Mots clés : *Candida albicans*, cathéters, biofilms, amphotéricine B, microscopie électronique.

SUMMARY

Candida albicans is a yeast pathogenic for humans, it is responsible for more than 75% of systemic fungal infections. Currently, these infections are ranked fourth in nosocomial infections. These are primarily related to medical devices, such as catheters and urinary probes that promote the formation of biofilms.

In this context we undertook this study at the hospital CHABANE HAMDOUNE of Maghnia, which is to isolate strains of *C. albicans* from catheters and urinary probes worn directly after excision from patients and, first, checking their powers to form biofilms, secondly, to test their resistance against amphotericin B (AmB).

From 301 samples, 51 strains of *C. albicans* was isolated. It appears from this study that the antifungal tests against AmB show clearly that sessile cells of *C. albicans* are much more resistant than their planktonic counterparts. Moreover, resistance of biofilm to AmB depends on the concentration of the starting inoculum, the renewal of culture medium and the incubation period and therefore the degree of maturation of the biofilm.

Images of electron microscopy performed in the laboratory "Dennis Kunkel Microscopy, Inc." shows the formation biofilms by *C. albicans* on the internal surfaces of catheters.

Keywords : *Candida albicans*, catheters, biofilms, amphotericin B, electron microscopy.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الرَّحْمَنُ ﴿١﴾ عَلَّمَ الْقُرْآنَ ﴿٢﴾ خَلَقَ الْإِنْسَانَ ﴿٣﴾ عَلَّمَهُ الْبَيَانَ ﴿٤﴾

Je dédie ce modeste travail :

A mon grand-père qui m'a toujours soutenu lors des instants de dépressions,
Mille mercis pour ses prières et ses 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 des leurs. Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux.

A ma femme bien aimée, pour son sacrifice 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 fille Asma, chez qui je voie la continuité de ce que je fais. Que Dieu la
garde et la bénisse.

A mon oncle Abdelkader, qui m'a toujours tenu la main dans mes périodes
difficiles... merci pour ne pas m'avoir laissé tomber.

A mes sœurs, à mon frère et leurs petites familles.

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.



Remerciements

Ce travail a été effectué dans le laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique Université Abou bekr Belkaïd TLEMCEM et au laboratoire « Dennis Kunkel Microscopy, Inc. USA »

Mes sincères remerciements et gratitude sont adressés à M^r Boucherit K., Maître de conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, Directeur du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique », pour m'avoir accordé l'accès à son laboratoire et pour avoir accepté de présider le jury. La réussite de ce travail ne saurait être possible sans le grand apport de sa part, je voudrais lui dire merci.

Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement M^{me} Boucherit-Atmani Z., Maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, qui m'a encadré tout au long de ce mémoire, sans la quelle rien ne serait là aujourd'hui, 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.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à M^{me} Sari L. Maître de Conférences Classe B à la Faculté de Médecine de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail et qui m'a fait le grand honneur de faire partie du jury de ce travail. Je l'assure de ma profonde gratitude, ainsi que de ma sincère reconnaissance.

Je suis très sensible à l'honneur que me font M^{me} Hassaine H. et M^r Drissi M. Maîtres de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je ne voudrais pas oublier de remercier M^r. Kunkel D., PhD., 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.

Le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation, j'exprime ma profonde reconnaissance à M^{me} Malek F., M^{me} Taleb S., M^r Rahmoun A. et D^r Bouarfa A., pour leur aide et soutien, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

Cette étude est l'aboutissement d'un travail d'équipe, 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 pour toutes leurs attentions, ainsi que pour les moments de détente et de sympathie que nous avons partagés ensemble.

Je n'oublierai évidemment pas de remercier, du fond du cœur, tout le personnel de l'hôpital CHABANE HAMDOUNE de Maghnia, à leurs têtes, M^r Benyekhou C., Directeur de l'hôpital.

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Première partie : Synthèse bibliographique	
1-Généralités.....	2
2- Caractères morphologiques de <i>Candida albicans</i>	7
3- Phases de formation du biofilm de <i>Candida albicans</i>	10
4- Architecture des biofilms.....	15
5- Quorum sensing	17
6- Résistance des biofilms aux antimicrobiens.....	19
Deuxième partie : Matériel et méthodes	
1- Prélèvements, isolement et identification de <i>C. albicans</i>	23
1.1- Prélèvements	23
1.2- Isolement et purification.....	25
1.3- Identification	25
1.3.1- Test de blastèse.....	25
1.3.2- Microculture sur le milieu PCB.....	25
1.3.3- Auxanogramme de carbone	25
1.3.4- Zymogramme ou test de fermentation des sucres.....	26
1.3.5- Résistance à l'actidione.....	26
1.3.6- Assimilation du nitrate de potassium.....	26
2- Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées.....	27
2.1- Détermination des CMI et SCMI	27
2.1.1- Détermination des CMI.....	27
2.1.2- Test de réduction du XTT	28
2.1.3- Détermination des SCMI.....	28
a- Préparation des souches	28
b- Formation des biofilms	29
c- Test antifongique	29
2.2- Effet de la concentration cellulaire de départ sur les CMI et les SCMI.....	31
2.3- Détermination des SCMI au cours des phases de formation des biofilms....	31
2.4- Effet du renouvellement du milieu de culture sur les SCMI.....	31

Dans le milieu hospitalier, l'utilisation des implants médicaux, essentiellement les cathéters et les sondes urinaires, a connu un essor important ces trente dernières années. (BOO et coll., 2005)

Pour diverses raisons, ces implants sont, pendant des durées variables, laissés en place, ce qui peut servir de support pour l'adhésion des micro-organismes d'où la formation des biofilms. Ces derniers peuvent présenter un risque potentiel pour les patients en servant de source permanente de microorganismes et en échappant, à la fois, aux traitements antimicrobiens ainsi qu'aux défenses immunitaires de l'hôte.

Selon la littérature, beaucoup d'études sur les biofilms d'origines bactériennes sont réalisées, principalement dans le domaine médical, par contre, ceux d'origines fongiques, notamment causées par la levure *Candida albicans*, sont moins éclaircis et sont restés dans l'ombre.

Les candidoses acquises dans les hôpitaux liées aux cathéters se classent au troisième rang des infections nosocomiales. (Alem et coll., 2006) Elles sont redoutables en raison de l'absence d'antifongiques efficaces et non toxiques d'une part. D'autre part, à la résistance accrue des levures aux agents antifongiques habituellement utilisés en milieu hospitalier. Cette résistance est accentuée par la formation des biofilms.

C'est dans ce cadre là que notre étude a été entreprise au niveau de l'hôpital CHABANE HAMDOUNE de Maghnia.

Elle consiste à rechercher et à isoler les levures de *Candida albicans* à partir des cathéters et des sondes urinaires usés, directement après leurs ablations et de vérifier leurs pouvoirs à former des biofilms, et en fin de tester leur résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B en calculant les Concentrations Minimales Inhibitrices « CMI » et les Sessiles Concentrations Minimales Inhibitrices « SCMI » (des biofilms) selon différents protocoles.

1 - Généralités

L'hôpital (ou tout autre établissement de soins) peut être considéré comme un écosystème où le patient entre en contact avec un univers microbien parfois redoutable et risque ainsi de contracter une infection que l'on qualifie de nosocomiale ou hospitalière, qui n'était ni en incubation ni présente lors de l'admission du malade. [(Le Minore et Veron, 1990), (Beaucaire, 1997)]

Depuis une vingtaine d'années, la fréquence des infections fongiques a fortement augmenté au niveau des hôpitaux. Plusieurs microorganismes sont à l'origine de ces infections nosocomiales, le genre *Candida* est le plus incriminé. Il est en effet responsable de plus de 17 % des infections nosocomiales fongiques. [(Vincent et coll., 1995), (Gauzif et coll., 2003)]

Les candidoses sont des affections cosmopolites provoquées par des levures appartenant au genre *Candida*, leur spectre clinique est varié, il va des atteintes superficielles aux localisations profondes ou disséminées. L'épidémiologie des candidoses invasives ou systémiques a considérablement évolué, leur fréquence et leur gravité sont en progression constante en milieu hospitalier. [(Pellegrino et coll., 2003), (Kibbler, 2007), (Shorr et coll., 2007)]

Ce sont des infections graves responsables d'une morbi-mortalité élevée, notamment chez les immunodéprimés (SIDA, greffés d'organes, diabétiques, ...). [(Dunagan, 1992), (Chabasse et coll., 1999), (Eloy et coll., 2006), (Gallien et coll., 2007)]

On note également l'émergence d'infections mycosiques profondes sur cathéters. [(Veyssier et coll., 1998), (Douglas, 2002), (López-Ribot, 2005)]

Cet accroissement est retrouvé quelle que soit la structure hospitalière concernée (centre hospitalier général, centre hospitalier régional, centre hospitalo-universitaire) et a fait passer la proportion des infections fongiques de 6 à 10,4 % en dix ans. [(Beck-Sague et Jarvis, 1993), (Eggimann et Pittet, 2002)]

Généralement, il est difficile de faire la distinction entre colonisation et infection par l'espèce *Candida*, c'est dire le signe d'alarme que peut constituer l'apparition d'une candidose chez un sujet à risque ayant un syndrome infectieux inexpliqué, et donc,

Première partie :

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

un traitement antifongique systémique est indispensable. [(Develoux et Bretagne, 2005), (Anane et Khalfalleh, 2007), (Girou, 2008)]

Cependant, malgré l'émergence d'autres espèces de *Candida*, *Candida albicans* est, sans conteste, la levure le plus souvent responsable des infections fongiques systémiques nosocomiales. [(Calandra et coll., 1989), (Larpent, 1991), (Eggimann et Pittet, 2002), (Dekeyser et coll., 2003)]

Ces levures sont souvent saprophytes et non pathogènes pour l'individu normal, mais profitent d'une altération des défenses immunitaires de l'hôte pour proliférer. De ce fait, les échecs thérapeutiques résultent plus du terrain favorable de l'hôte que de l'agressivité des espèces fongiques impliquées. [(Counelle De Pontanel et coll., 1987), (Chabasse et coll., 1999), (Haynes, 2001)]

Par ailleurs, l'utilisation des cathéters a connu un essor considérable lié aux progrès médicaux, cependant, la principale complication des cathéters est l'infection. [(Hennequin 1996), (Veysier et coll., 1998), (BOO et coll., 2005)]

En effet, l'augmentation des infections à *Candida* au cours des dernières décennies est presque parallèle à l'augmentation de l'utilisation généralisée d'une large gamme de dispositifs médicaux implantés (sondes, prothèses, cathéters...) [(Leone et coll., 2000), (Chandra et coll., 2001a), (Ramage et coll., 2005)]

Les infections sur cathéter sont responsables d'une augmentation de la durée de séjour, du coût de l'hospitalisation et de la morbidité en raison d'une prescription accrue d'antibiotiques et de la prolongation de la durée d'hospitalisation. Cette attitude a des effets indésirables et des conséquences néfastes. [(Figuerola-Damian et coll., 1994), (Digiovine et coll., 1999), (Saidi et coll., 2006), (Kibbler, 2007)]

Le retrait du cathéter est, donc, souhaitable lorsqu'il constitue la porte d'entrée d'une candidémie, et la mise en culture de celui-ci est indispensable après son ablation. [(Pellegrino et coll., 2003), (Timsit et coll., 2003), (Gallien et coll., 2007), (Borecká-Melkusová et Bujáková, 2008)]

Les cathéters sont utilisés également pour le drainage efficace de vessie. Chez les malades sondés, l'infection urinaire est la complication la plus fréquente, elle représente entre 30 et 40 % de toutes les infections nosocomiales, le plus souvent manuportée lors

des manipulations de sondes, [(Veyssier et coll., 1998), (Léone et coll., 2000), (Botto, 2003), (Anders, 2005)]

Le risque est encore aggravé en cas de sondage prolongé et peut être un marqueur de candidose disséminée, par conséquent, l'ablation de la sonde entraîne un pourcentage plus important d'éradication que le traitement antifongique. [(Pittet et coll., 1994a et b), (Eggimann et Pittet, 2002), (Botto, 2003), (Develoux et Bretagne, 2005)]

Le principal mode de colonisation du cathéter se fait au site d'insertion, lors de la pose ou ultérieurement, par la flore cutanée locale du patient migrant le long du trajet sous-cutané du cathéter. [(Mermel et coll., 2001), (Douglas, 2002), (Kaltenbach et coll., 2002)]

L'infection de la voie veineuse peut aussi provenir de plusieurs sources. (Figure N°1) [(Nitenberg et Antoun, 1991), (Veyssier et coll., 1998)]

Les levures peuvent coloniser l'extrémité du cathéter et forment des biofilms, elles sont, souvent, introduites à partir de la peau du patient ou de la main du personnel soignant. [(Goldmann et Pier, 1993), (Saiman et coll., 2001), (Douglas, 2003), (Hot et coll., 2007)]

De plus, en 2003, Gauzif et ses collaborateurs ont montré que les biofilms de *Candida* réduisent considérablement la sensibilité aux antifongiques, ce qui augmente le risque d'infections hospitalières.

Plusieurs facteurs favorisent l'élaboration du biofilm, la plus importante reste la rugosité accrue de la surface qui influe positivement sur la rétention des microorganismes. C'est pourquoi, les modifications des surfaces peuvent être une approche potentiellement utile pour réduire ou gérer la formation des biofilms de *Candida albicans* sur les dispositifs médicaux. [(Chandra et coll., 2005), (Nett et Andes, 2006), (Whitehead et Verran, 2006)]

Il est, donc, évident, du point de vue épidémiologique, que les biofilms jouent un rôle dans les maladies infectieuses. [(Bell, 2001), (Donlan et Costerton, 2002)]

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 avec des biomatériaux implantés et la plupart des surfaces d'accueil. [(Gouin et Viggiano, 1996), (Ramage et coll., 2005)]

Mais avant d'aller plus loin, il est nécessaire de rappeler les caractères morphologiques de *C. albicans* qui sont liés à son pouvoir pathogène ainsi que les caractéristiques et l'architecture des biofilms.

2 - Caractères morphologiques de *Candida albicans*

Candida albicans est une levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multilatéral, productrice de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture. (Develoux et Bretagne, 2005)

C'est un champignon unicellulaire eucaryote retrouvé à la surface de la plupart des muqueuses humaines, commensale des muqueuses digestives, et saprophyte de la flore vaginale. [(Hogan et Kolter 2002), (Lafleur et coll., 2006), (Hot et coll., 2007), (Ader et coll., 2008)]

Elle peut exister en tant que cellule de levure, hyphes ou pseudohyphes. [(Chandra et coll., 2001a), (Walther et Wendlend, 2008)]

C'est un champignon dimorphique, lorsque ce microorganisme adhère à une surface, il forme un biofilm ce qui implique des changements considérables dans la forme (phenotypic switching) et la fonction. [(Alem et coll., 2006), (Saidi et coll., 2006), (Jain et coll., 2008)]

Le dimorphisme est nécessaire pour le développement d'un espace structuré, il joue un rôle prépondérant dans la formation du biofilm de *Candida albicans*. [(Douglas, 2003), (Saidi et coll., 2006), (Krom et coll., 2007)] (Figure N° 2)

Les cellules constitutives des biofilms sont appelées cellules sessiles, elles présentent des propriétés phénotypiques qui sont radicalement différentes de celles de leurs homologues planctoniques (c'est-à-dire les cellules non adhérentes ou flottantes). [(Stickler, 1999), (Ernst et coll., 2005), (Al-Dhaheri et Douglas, 2008)]

En fonction de l'environnement, la capacité de modification du phénotype et de la tendance de *C. albicans* à induire la filamentation semble être un facteur de virulence en soi pour cette levure. [(Jones et coll., 1994), (Lo et coll., 1997) (Develoux et Bretagne, 2005), (Alem et coll., 2006)] (Figure N° 3)

En effet, l'association entre changements phénotypiques et virulence de cette espèce est un indicateur de ce phénomène qui est un facteur d'agressivité important dans les candidoses invasives. (Jones et coll., 1994)

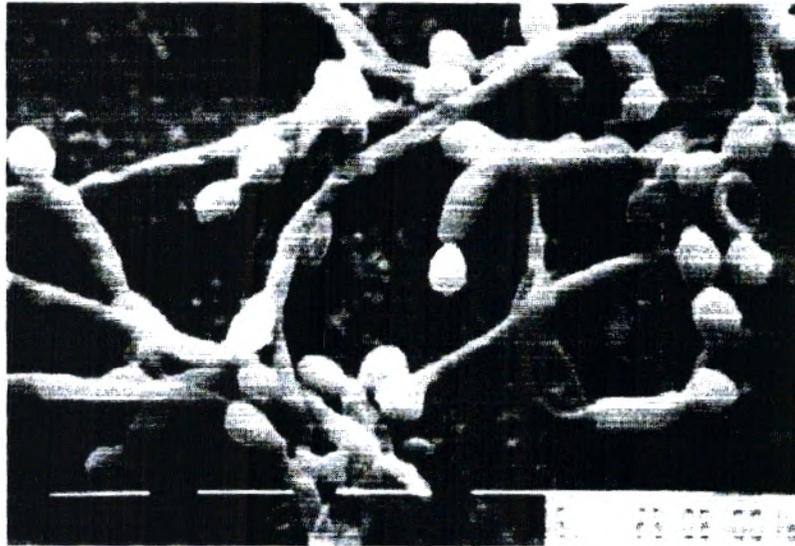


Figure N° 2 : Microscopie électronique à balayage d'un biofilm formé par *Candida albicans* sur un disque préparé à partir d'un cathéter intra vasculaire. Bar = 10 microns. (Jabra-Rizk, 2004)

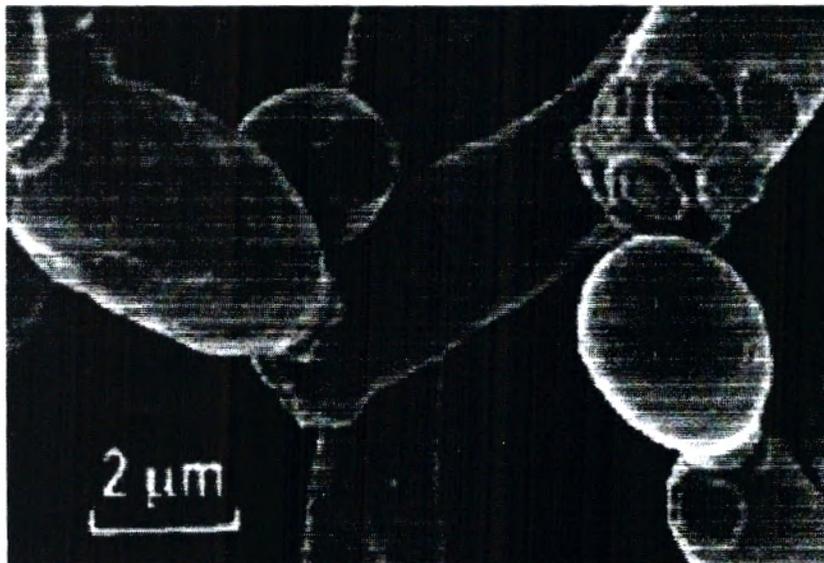


Figure N° 3 : Biofilm de *Candida albicans* au cours de la croissance : structure en bouquet. (Garcia-Sanchez, 2004)

3 - Phases de formation du biofilm de *Candida albicans*

Si les mécanismes moléculaires exacts diffèrent d'un organisme à un autre, les étapes du développement du biofilm semblent être conservées au sein d'un large éventail de microbes. (O'toole, 2003)

La formation des biofilms est un phénomène extrêmement complexe, sa constitution nécessite plusieurs étapes et se déroule selon une séquence bien établie. [(Chandra et coll., 2001a), (Botto, 2003), (Haras, 2005)]

Ces étapes comprennent l'attachement des cellules à un substrat, la croissance et l'agrégation des cellules en microcolonies, la maturation et le maintien de l'architecture du biofilm avec l'élaboration du quorum sensing. [(O'toole, 2003), (Li et coll., 2007)]

La progression d'un biofilm mature de *Candida albicans* est tributaire de l'adhésion cellulaire, de la production d'une matrice extracellulaire et de la transition levure-hyphes. (Nett et Andes, 2006)

L'adhésion joue un rôle majeur tout au long de l'élaboration d'un biofilm à *Candida albicans* :

- Premièrement, les cellules s'accrochent à la surface et se lient les unes aux autres pour la formation d'une couche basale.
- deuxièmement, la liaison des hyphes les uns aux autres pour la stabilisation du biofilm mature. (Soll, 2008)

Les cellules du biofilm de *C. albicans* adhèrent dans un premier temps à la surface. Cette adhésion est souvent citée comme la première étape du processus d'infection pour le genre *Candida*. [(Haynes, 2001), (Soll, 2008)]

La phase d'adhésion est divisée en deux étapes «réversible» et «irréversible» du fait que l'attachement initial à la surface est souvent faible, cette première phase est suivie d'une période de formation de tubes germinaux. [(Baillie et Douglas, 1999), (Monds et O'toole, 2008)]

Au cours de la phase de maturation, la quantité du matériel extracellulaire augmente avec le temps d'incubation, jusqu'à ce que la levure soit complètement enfermée dans

cette matière. À ce stade, il est difficile de se concentrer sur la base formée de communauté de cellules couvertes par la matrice. (Chandra et coll., 2001a)

Selon Ramage et ses collaborateurs en 2005 et Nett et Andes en 2006, la formation du Biofilm se déroule en trois phases de développement. (Figure N° 4)

- Phase d'adhésion (6 h) : adhésion au substrat et prolifération des cellules
- Phase intermédiaire (12 h) : agrégation cellulaire, formation de micro-colonies et production de la matrice extracellulaire (EPS)
- Phase de maturation (48 h) : transition des cellules de levure vers des formes filamenteuses (pseudohyphes et hyphes) encastrés dans une matrice extracellulaire.

Par contre, selon Jabra-Rizk (2004), ces trois phases se répartissent comme suit :

- Phase d'adhésion : de 0 à 11 h
- Phase intermédiaire : de 12 à 30 h
- Phase de maturation : de 30 à 72 h ;

Au départ (0 à 2 h), la majorité des cellules de *Candida albicans* sont présentes sous forme de levure en adhérant à la surface. Entre 3 et 4 h, de distinctes microcolonies apparaissent sur la surface, mais surtout, il n'y a pas de matériel extracellulaire au début de formation du biofilm.

A 11 h, les communautés de *Candida albicans* apparaissent comme des morceaux épais de champignons, en raison de la croissance cellulaire le long de zones de regroupement des surfaces.

La phase intermédiaire de développement est caractérisée par l'émergence de la majorité du matériel non cellulaire (12 à 14 h), qui apparaît comme un voile (film) couvrant les microcolonies fongiques. (Jabra-Rizk, 2004)

entrecoupées par des canaux d'eau, ce qui fournira un mécanisme pour la circulation des éléments nutritifs. [(Donlan, 2001a), (Coogan et coll., 2006), (Da-Silva et coll., 2008)]

Durant le développement du biofilm de *Candida albicans*, les cellules libèrent des substances polymériques, la matrice extracellulaire (EPS), joue un rôle important dans la structure et la fonction des biofilms. [(Ramage et coll., 2001b et 2002b), (Soll, 2008), (Kokar et coll., 2009)] (Figure N° 7)

La composition biochimique de l'EPS est contrôlée par la communauté microbienne, elle dépend de la maturité du biofilm et de l'environnement géochimique local. (Jiao et coll., 2010)

On trouve, parmi les constituants de la matrice, le glucan, les protéines, le phosphore, les hexosamines, le mannose et le galactose, toutefois, la composante majeure de la matrice est le glucose. [(Baillie et Douglas, 2000), (Al-Fattani et Douglas, 2006)]

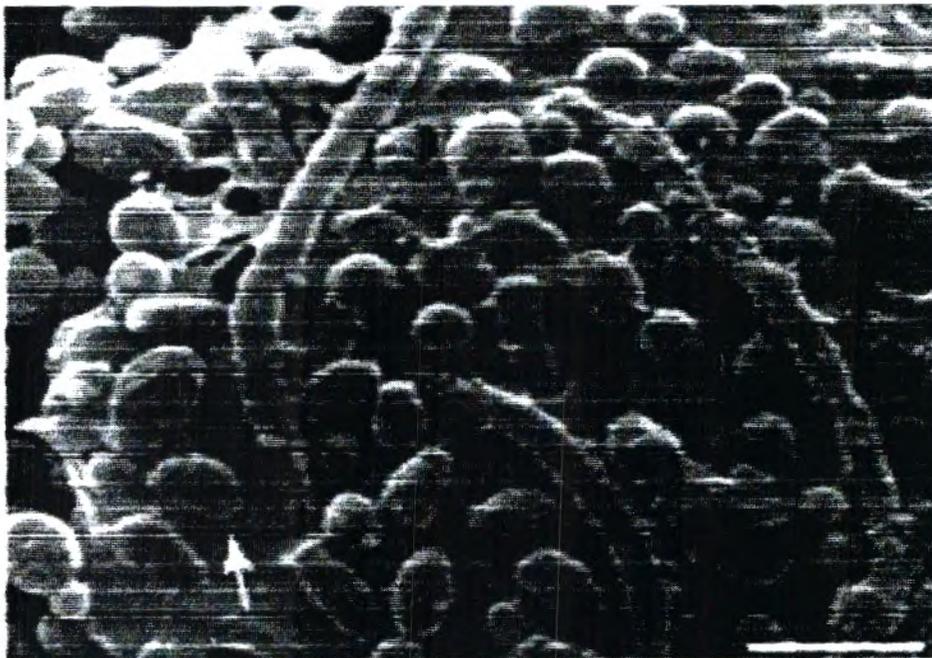


Figure N° 7 : Biofilm de *Candida albicans* formé sous des conditions d'écoulement sur un filtre en acétate de cellulose dans un système fermenteur. Indiqué par une flèche, la matrice. Bar = 10 μ m. (Douglas, 2003)

5- Quorum Sensing

Beaucoup de microorganismes sécrètent et utilisent, pour leur communication intercellulaire, des molécules capables de transférer le signal qui peut être auto reconnu. C'est un système de signalisation cellulaire sophistiqué et fondamental pour la formation de biofilms microbiens appelé quorum sensing. [(Hogan, 2006a), (Soll, 2008), (Walther et Wendlend, 2008)]

Le Quorum Sensing « senseur du quorum » est impliqué dans la régulation des différentes étapes du développement du biofilm. Il s'agit d'une signalisation intercellulaire qui permet aux microbes d'évaluer leur densité de population et de la contrôler en induisant ou réprimant l'expression de gènes contrôlés par le quorum sensing. [(Hogan, 2006b), (Monds et O'toole, 2008), (Irie et Parsek, 2008)]

Cette stratégie de communication « cellule-cellule » a des avantages dans le bien-être du biofilm par la prévention et le contrôle de la surpopulation inutile (compétition pour les nutriments) et a des implications importantes dans le processus infectieux. (Ramage et coll., 2005)

De même pour les bactéries, les cellules fongiques utilisent la régulation par le biais du quorum sensing pour former les biofilms. (Hogan, 2006a)

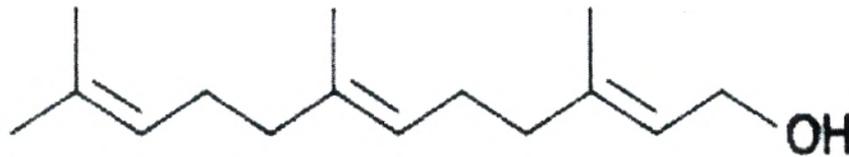
Candida albicans est le premier champignon chez laquelle ce système a été mis en évidence. [(Hogan, 2006a), (Weber et coll., 2008)]

En effet, deux molécules sont impliquées dans le Quorum Sensing chez *Candida albicans*. Il s'agit du farnésol et du tyrosol qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire des cultures denses. [(Hornby et coll., 2003), (Hogan, 2006a)] (Figure N°8)

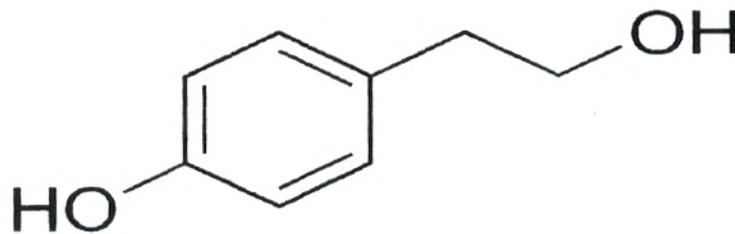
Le tyrosol joue un rôle dans la croissance et la morphogénèse de *Candida albicans* en assurant un contrôle positif pour le passage à la forme hyphale, il stimule la filamentation dans des conditions permissives pour la formation des tubes germinaux. [(Chen et coll., 2004), (Ramage et coll., 2005)]

Par contre, le farnésol, un sesquiterpène synthétisé à partir du farnésyl phosphate, assure un contrôle négatif du Quorum Sensing, il fonctionne comme un signal entre les cellules en inhibant la formation d'hyphes et la colonisation des surfaces, et par

conséquent, il freine la formation du biofilm. [(Hornby et coll., 2003), (Sato et coll., 2004), (Ramage et coll., 2005), (Weber et coll., 2008), (Williams et Cámara, 2009)]



Farnésol



Tyrosol

Figure N° 8 : structure chimique du farnésol et du tyrosol [(Oh et coll., 2001), (Irie et Parsek, 2008)]

La synthèse du farnésol et du tyrosol diffère selon les phases du développement des biofilms, et la réponse cellulaire au Quorum Sensing s'accorde avec l'accumulation de l'un ou de l'autre durant la phase correspondante. [(Irie et Parsek, 2008), (Monds et O'toole, 2008)]

En 2006, Alem et ses collaborateurs rapportent que le tyrosol intervient dans la phase initiale du biofilm, alors que le farnésol dans la phase de maturation.

L'action du tyrosol est plus importante pendant les phases initiales et intermédiaires de la formation de biofilm, elle est supérieure à celle du farnésol durant les 14 premières

Par conséquent, les infections liées au biofilm sont, par nature, difficile à traiter et à éliminer totalement par des régimes de traitement standard. [(Ramage et coll., 2001b), (Ernst et coll., 2005), (Perumal et coll., 2007)]

Les biofilms de *Candida albicans* sont en fait communément résistants à un large éventail d'agents antifongiques classiques, y compris l'amphotéricine B. [(Kuhn et coll., 2002b), (Mukherjee et Chandra, 2004)]

Il s'agit d'un antifongique polyénique, isolé en 1956 par Gold et coll. à partir de *Streptomyces nodosus*, actinomycète du sol Vénézuélien. Malgré plus d'un demi-siècle d'existence, l'amphotéricine B, reste le traitement de première ligne des mycoses systémiques ou profondes. [(Patel, 1998), (Chabasse et coll., 1999)]

Il est à noter que cliniquement, l'amphotéricine B, est moins efficace vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* (cellules organisées en biofilms) que sur les cellules planctoniques. [(Hawser et Douglas, 1995), (Douglas, 2003)]

Ces auteurs ont signalé que la CMI de l'amphotéricine B a été jusqu'à 200 fois plus élevée pour les biofilms de *C. albicans* par rapport à celle de leurs homologues planctoniques.

En effet, Hawser et Douglas (1995), Bachmann et coll., (2003), et Mukherjee et Chandra (2004) ont montré l'absence d'activité du fluconazole et la résistance accrue à l'amphotéricine B contre les biofilms de *Candida albicans*.

Les mécanismes de résistance des biofilms aux agents antimicrobiens sont complexes et mal compris. [(Ribaud et coll., 1999), (Ramage et col, 2002b)]

La résistance du biofilm est un phénomène multifactoriel, elle constitue un large spectre de défense qui soit efficace contre de nombreux types d'agents antifongiques. [(Ramage et coll., 2001a et 2005), (Al-Dhaheri et Douglas, 2008)]

La formation d'une matrice polymérique extracellulaire est à l'origine de la résistance des biofilms aux agents antifongiques, elle retarde la diffusion des médicaments à travers les biofilms. (Mukherjee et Chandra, 2004)

Ainsi, la structure du biofilm peut modérer la pénétration d'un agent antimicrobien, ce qui laisse le temps aux cellules d'adopter une protection physiologique. (Stickler, 1999)

Ce matériel extracellulaire complexe pourrait fonctionner à défendre contre les cellules phagocytaires et à servir d'échafaudage à maintenir l'intégrité du biofilm. (Blankenship et Mitchell, 2006)

Toutefois, la matrice extracellulaire joue un rôle partiel dans la résistance des cellules sessiles, mais d'autres facteurs sont probablement aussi impliqués. [(Mukherjee et Chandra, 2004), (Haras, 2005), (Ramage et coll., 2005)]

L'augmentation de la résistance aux 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. [(Mateus et coll., 2004), (Nett et coll., 2008)]

D'après Ramage et coll., (2001a), la densité cellulaire d'un biofilm explique partiellement la résistance accrue des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques.

Cette résistance pourrait être due, en partie, à la surface induite par la sup-régulation des pompes à efflux. (Jabra-Rizk et coll., 2004)

Pour s'adapter aux différents besoins au cours de sa formation, les biofilms de *Candida albicans* présentent des changements dans l'expression de certains ensembles de gènes dans les différentes phases de développement. (Yeater et coll., 2007)

En effet, l'expression des gènes codant pour les pompes à efflux augmente au cours de la formation et le développement du biofilm. (Ramage et coll., 2002b)

Candida albicans exprime les gènes CDR (*Candida* Drug Resistance) et MDR1 (Multi Drug Resistance) dans les trois étapes du développement du biofilm. (Mukherjee et coll., 2003)

Dans l'étude faite par Mateus et coll., (2004), l'expression des gènes CaMDR1, CDR1, et les promoteurs CDR2, a été plus importante dans les cellules adhérentes que dans les cellules planctoniques.

Néanmoins, Mukherjee et coll., (2009) signalent que l'utilisation des formules lipidique de l'amphotéricine B est une approche effective pour le traitement des biofilms de *Candida albicans* qui contaminent les cathéters. De leur côté, Martinez et coll., (2010) ajoutent que le chitosan peut être utilisé comme un agent antimicrobien pour la prophylaxie et/ou le traitement des cathéters, ou autres implants médicaux, contre leurs infections par les biofilms fongiques.

Pour mettre le point sur ce genre d'infections et, afin d'évaluer la sensibilité des biofilms de *Candida albicans* vis-à-vis de l'amphotéricine B, nous avons procédé à l'isolement de souches directement des cathéters et des sondes usés afin de déterminer leurs capacités à former des biofilms et de calculer les CMI et SCMI "des cellules sessiles" de l'AmB à l'égard de ces souches.

Deuxième partie :

MATERIEL ET METHODES

1. Prélèvements, isolement et identification de *Candida albicans*

Ce travail a été réalisé au niveau de : hôpital Chabane Hamdoune de Maghnia (Tlemcen), laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université de Tlemcen et laboratoire Dennis Kunkel Microscopy, Inc. USA.

1.1. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués entre le 25/11/2008 et le 22/01/2009 au niveau des services de réanimation, chirurgie générale, pédiatrie, médecine interne et gynécologie de l'hôpital Chabane Hamdoune (Tableau N°1).

Ces prélèvements ont été réalisés à partir des cathéters et des sondes implantés depuis 48 heures et plus, selon les recommandations de Quinet (2006).

Les cathéters et les sondes utilisés sont pris directement des patients et mis dans le milieu Sabouraud liquide. 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 sont coupées à l'aide de bistouris stérile. Les tubes sont, ensuite, agités au vortex pendant une minute, selon la technique décrite par Brun-Buisson et coll., (1987)

D'autres prélèvements ont été effectués sur des sondes nasales, des sondes de drainage et des lames de drainage.

Les tubes contenant les échantillons sont marqués et incubés à l'étuve à 37 °C pendant 24 à 48 heures, voire 72 heures.

Tableau N° 1 : Répartition des prélèvements selon les services.

Service	N^{bre} de prélèvements	Taux des prélèvements (%)
<i>Réanimation</i>	27	8,97
<i>Chirurgie générale</i>	95	31,56
<i>Pédiatrie</i>	60	19,94
<i>Médecine Interne</i>	50	16,61
<i>Gynécologie</i>	69	22,92
Total	301	100

1.2. Isolement et purification

À partir des tubes présentant un trouble, des boîtes de pétri préalablement coulées avec la gélose sabouraud sont ensemencées par stries, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Ensuite, une colonie est prélevée de la gélose, repiquée dans le milieu sabouraud liquide stérile et incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Chaque souche pure est ensemencée sur gélose sabouraud inclinée en tube puis incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures et conservée à 4 °C.

1.3. Identification

L'identification des souches isolées à partir des implants médicaux est réalisée selon les tests biochimiques et la microculture.

1.3.1 Test de blastèse

Appelé aussi test de germination ou de Tschadjian. Il consiste à émulsionner une pointe de pipette de levures dans 1 ml de sérum humain, puis à l'incuber à 37 °C pendant 3 à 4 heures.

S'il s'agit de *C. albicans*, on observe dans presque 90 % des cas un tube germinatif partant de la levure sans présence de constriction à la base. (Drochey et Vieu, 1957)

1.3.2 Microculture sur le milieu PCB

Une colonie de levures est prélevée puis ensemencée par stries sur gélose PCB (pomme de terre, carotte, bile) en créant de 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 ensuite incubée à 25 °C pendant 48 heures. La présence de chlamydospores (spores globuleuses de 10 à 15 µm entourées d'une paroi épaisse) signifie qu'il s'agit dans 95 % des cas de *C. albicans*. (Drochey et Vieu, 1957)

1.3.3 Auxanogramme de carbone

Sur milieu à auxanogramme de carbone, la surface est ensemencée en nappe par 2 ml d'une suspension levurière puis laissée reposer pendant 20 minutes. Le surplus est jeté puis laissé 10 minutes pour sécher. Cinq (5) puits sont creusés à l'emporte-pièce avec le dos d'une pipete pasteur stérile, dans chaque puits sont déposés 30 µl de solution de sucre à tester (3%). L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures.

S'il y a croissance autour du puits, il y a assimilation du sucre. (Segretain et coll., 1979)

1.3.4 Zymogramme ou test de fermentation des sucres

Les levures sont ensemencées dans des tubes de gélose molle contenant un sucre (3 %). Une piqûre centrale est réalisée par l'anse de platine chargée d'une colonie déjà purifiée. Les sucres à tester en zymogramme sont les mêmes que pour l'auxanogramme de carbone.

La fermentation du sucre se traduit par le virage de l'indicateur coloré du rouge vers le jaune, le dégagement du gaz CO₂ se révèle par l'apparition de bulle d'air dans la gélose après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures. (Segretain et coll., 1979)

1.3.5 Résistance à l'actidione

Il s'agit d'un antifongique (cycloheximide) isolé de *Streptomyces griseus* par Whiffen en 1948, qui empêche les moisissures de pousser sur les milieux de Sabouraud. *Candida albicans* résiste à cet antifongique.

A l'aide d'une anse de platine, l'ensemencement est réalisé en stries sur boîte de pétri coulée par la gélose sabouraud additionnée de 0,04 mg/ml d'actidione puis incubé à 37°C pendant 48h. (Segretain et coll., 1979)

1.3.6 Assimilation du nitrate de potassium

Sur milieu à auxanogramme d'azote, la surface de la gélose est ensemencée en nappe par 2 ml d'une suspension levuriènne puis laissée reposer pendant 20 minutes. Le surplus est jeté puis laissé 10 minutes pour sécher. Un puits est creusé à l'emporte-pièce à l'aide d'une pipete pasteur stérile, dans lequel on dépose 30 µl de KNO₃ (3 %). L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures. S'il y a croissance autour du puits, il y a assimilation de l'azote. (Segretain et coll., 1979)

2. Evaluation du potentiel à former les biofilms des souches étudiées

Dans le but de vérifier l'aptitude des souches isolées à former les biofilms, ces dernières sont soumises à l'action d'un agent antifongique pour mettre en évidence une éventuelle résistance des levures sessiles. Ce test consiste à calculer les concentrations minimales inhibitrices «CMI» ainsi que les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles «SCMI», selon différents protocoles. L'antifongique choisi est l'amphotéricine B pure provenant du laboratoire SIGMA.

Le pouvoir des souches de *Candida albicans* à former les biofilms est jugé positif si les concentrations minimales inhibitrices calculées selon le protocole de Ramage et coll., (2001a) sont supérieures aux concentrations minimales inhibitrices calculées selon le protocole du NCCLS M27-A. Les premières, des cellules sessiles, sont dénommées "SCMI", les secondes sont désignées par "CMI" (des cellules planctoniques).

Seules les cellules adhérentes aux parois forment des biofilms, celles qui n'ont pas la capacité de les former vont être éradiquées suite au lavage par le PBS. L'activité antifongique de l'amphotéricine B est testée sur des souches isolées de différents services, ainsi que deux souches de référence, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* 444 IP.

2.1. Détermination des CMI et SCMI

2.1.1. Détermination des CMI

Les CMI des cellules planctoniques des différentes souches sont déterminées selon la méthode de microdilution décrite par le NCCLS M27-A.

Pour chaque souche, une série de dilutions doubles de l'antifongique est réalisée. Pour cela, 100 µl d'une solution d'amphotéricine B sont placés dans chaque puits jusqu'à la fin de la ligne de la microplaque avec des dilutions réalisées dans un ordre décroissant (64 à 0,5 µg/ml) à partir d'une solution mère d'amphotéricine B à 128 µg/ml. 100 µl d'une culture de *Candida albicans* à une concentration cellulaire de départ de $2,5 \times 10^3$ cellules/ml, dénombrés sur cellule de Thoma, sont ajoutés dans chaque puits. Le témoin consiste à mettre dans un puits 200 µl de culture sans antifongique.

Les CMI ont été déterminées en utilisant le test de réduction au tétrazolium (XTT).

2.1.2. Test de réduction du XTT (Ernst et Rogers, 2005)

L'activité métabolique des cellules fongiques a été déterminée par le XTT [2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide] qui est converti en formazane, produit dérivé de couleur qui peut être quantifié à l'œil nu.

La solution mère de XTT (5 mg / ml) a été préparée en dissolvant 5 mg de XTT dans 1 ml de PBS préchauffé (bain marie). La solution mère a été stérilisée par filtration à travers un filtre de taille des pores de 0,22 μm , puis mise, séparément en volume de 10 ml, dans des tubes stériles (volume suffisant pour l'incubation d'une microplaque). Les tubes sont ensuite stockés à -20 °C. Le XTT est sensible à la lumière, et de ce fait, les tests ont été effectués dans l'obscurité.

La solution mère du ménadione (10 mM) a été préparée en dissolvant 0,017 g de ménadione dans 10 ml d'acétone. Juste avant utilisation, 10 ml de la solution mère du XTT est décongelée et additionnée de 1 μl de ménadione.

Dans chaque puits de la microplaque (contrôles incluses), 100 μl de la solution XTT/ménadione sont ajoutés.

Les microplaques sont, ensuite, recouvertes de papier aluminium stériles puis placées dans une étuve à 35 °C pendant 4 à 5 heures.

Si le tétrazolium est réduit par les cellules viables, la solution dans les puits se transforme en couleur orange visible à l'œil nu et les CMI sont déterminées à partir des premiers puits présentant un virage de la couleur vers l'orange.

2.1.3. Détermination des SCMI

Pour les cellules sessiles (des biofilms), les SCMI des différentes souches sont déterminées selon la méthode de microdilution décrite par Ramage et coll., (2001a).

Il s'agit d'une méthode standard *In Vitro* pour tester la susceptibilité antifongique des biofilms de *Candida albicans*.

a. Préparation des souches

Les souches ont été inoculées avec une anse de platine dans 20 ml du milieu Sabouraud liquide puis placées dans un agitateur orbital (100 tr / min) à 30 °C. Dans ces conditions, toutes les souches sont récupérées en phase de bourgeonnement.

Tableau N° 2 : Nombres de prélèvements et de souches de *Candida albicans* isolées dans chaque service

Service	N ^{bre} de prélèvements	N ^{bre} de souches	Taux (%)
<i>Réanimation</i>	27	11	40,74
<i>Chirurgie Générale</i>	95	15	15,79
<i>Pédiatrie</i>	60	7	11,66
<i>Médecine Interne</i>	50	6	12
<i>Gynécologie</i>	69	12	17,39
Total	301	51	

En calculant le taux de souches isolées de *Candida albicans* selon le nombre de prélèvements dans chaque service, le service de réanimation vient en premier rang avec 40,74 % suivi du service de gynécologie avec 17,39 % puis du service de chirurgie générale avec 15,79 %.

D'après ces mêmes résultats, nous constatons que les services les moins concernés par les contaminations des cathéters et des sondes par la levure *Candida albicans*, selon le nombre de prélèvement, sont les services de médecine interne et de pédiatrie avec des taux respectifs de 12 et 11,66 %.

Ces résultats rejoignent ceux de Pfaller et coll., (2000) et Wesenberg-Ward et coll., (2005), qui mettent en évidence l'importance de la levure *Candida albicans* comme agent étiologique des maladies opportunistes, ainsi, Alem et coll., (2006), ont classé les infections dues à cette espèce au quatrième rang des infections nosocomiales et au troisième rang des infections fongiques liées aux cathéters.

2. Evaluation du potentiel des souches isolées à former les biofilms

Selon Ramage et coll. (2001a), l'accroissement des CMI chez les levures par rapport à la méthode du NCCLS M27-A témoigne de leur capacité à former des biofilms. C'est pourquoi nous avons entrepris de déterminer les CMI des souches que nous avons isolées suivant les deux méthodes précédentes, celle du NCCLS M27-A et celle de Ramage et coll., (2001a). L'ensemble des résultats de tous les tests de sensibilités à l'amphotéricine B des souches de références et des souches isolées sont regroupés dans l'annexe 2.

2.1. Détermination des CMI et SCMI

Il faut signaler qu'au cours des différents repiquages, nous avons perdu quatre souches (RHS4, GKT3, CHKT9 et PKT6).

2.1.1 Détermination des CMI par la méthode de NCCLS M27-A

Le tableau N° 3 regroupe les résultats des CMI de l'amphotéricine B, selon la méthode du NCCLS M27-A des souches de références (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* 444 IP) et des souches isolées de l'hôpital.

Selon le protocole de NCCLS M27-A, les CMI des souches *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* 444 IP sont identiques (0,5 µg/ml).

Pour les souches isolées, les CMI de l'AmB varient entre 0,5 µg/ml et 2 µg/ml. D'après ces résultats, 25 souches isolées ont des CMI plus élevées que celles des souches de références. Cependant, ces CMI restent dans l'intervalle des CMI établies par Hammond, (1977).

Tableau N° 3 : Concentrations Minimales Inhibitrice de l'AmB vis-à-vis des souches de références et des souches isolées selon les protocoles de NCCLS M27-A.

Nombre de souches	CMI ($\mu\text{g/ml}$) d'AmB « NCCLS M27-A »
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,5
<i>Candida albicans</i> 444 IP	0,5
22	0,5
19	1
6	2

Nous remarquons que les CMI de l'AmB des souches de références (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* 444 IP) sont de 2 µg/ml et 4 µg/ml respectivement. Ces CMI sont supérieures à celles obtenues par la méthode du NCCLS M27-A.

8 souches isolées ont des CMI comprises entre 0,5 et 1 µg/ml, ces CMI sont identiques à celles obtenues par la méthode du NCCLS M27-A.

39 souches ont des CMI qui varient entre 4 et 16 µg/ml, ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues par la méthode du NCCLS M27-A.

Selon Ramage et coll., (2001a), l'accroissement des CMI des souches de références et des 39 souches isolées témoigne de leur capacité à former des biofilms, dans ce cas, nous parlons de SCMI (CMI des cellules sessiles). En revanche, 8 souches n'ont pas formé de biofilms. (Annexe 2)

Nos résultats sont en accord avec ceux de Chandra et coll., (2001b) qui ont signalé que la CMI d'une souche de *Candida albicans* est de 0,25 µg/ml, alors que sa SCMI est de 8 µg/ml, ces mêmes résultats sont signalés dans les travaux de Shuford et coll., (2006). L'amphotéricine B a un effet inhibiteur sur les cellules sessiles de *Candida albicans* à des concentrations plus élevées de sa marge thérapeutique. [(Douglas, 2002), (Ramage et coll., 2002a), (Blankenship et Mitchell, 2006)]

De plus, les biofilms de *Candida albicans* sont moins sensibles à de nombreux agents antifongiques. [(Kuhn et coll., 2002b), (Perumal et coll., 2007), (Coogan et coll., 2006), (Al-Dhaheri et Douglas, 2008)]

A contrario, Kuhn et coll., (2002b) ont trouvé que les CMI de l'AmB vis-à-vis de deux souches de *Candida albicans* provenant de cathéters varient entre 0,25 µg/ml et 0,5 µg/ml et que leurs SCMI étaient égales à 4 µg/ml. Pareillement, Shuford et coll., (2007) distinguent que les CMI de 30 souches de *C. albicans* étaient égales à 0,5 µg/ml et les SCMI à 2 µg/ml.

Les résultats que nous avons obtenus ainsi que ceux de Mukherjee et Chandra (2004) et Seneviratne et coll., (2008), peuvent expliquer un certain nombre d'échecs thérapeutiques dans les traitements antifongiques, ces auteurs ont pu conclure que les

SCMI des antifongiques vis-à-vis des biofilms à *Candida albicans* sont 30 à 2000 fois plus élevées que celles calculées pour les cellules planctoniques.

La formation des biofilms a augmenté de manière significative les niveaux de résistance aux antifongiques classiques. [(Baillie et Douglas, 1999), (Miao et coll., 2007)]

Les biofilms de *Candida albicans*, comme ceux des bactéries, sont très résistants aux agents antimicrobiens. [(Hawser et Douglas, 1995), (Seneviratne et coll., 2008), (Hasan et coll., 2009)]

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

2.2. Effet de la concentration cellulaire de départ sur les CMI et SCMI

Les résultats des tests antifongiques vis-à-vis de l'AmB en utilisant des concentrations cellulaires de départ égales à 10^8 cellules/ml sont représentés dans le tableau N° 5.

Nous constatons que les CMI et SCMI de *Candida albicans* ATCC 10231 sont inchangées (32 $\mu\text{g/ml}$), alors que *Candida albicans* 444 IP a une CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$ et une SCMI de 64 $\mu\text{g/ml}$.

16 souches isolées ont des CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$ et des SCMI de 32 $\mu\text{g/ml}$ alors que 11 souches ont des CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$ et des SCMI de 16 $\mu\text{g/ml}$. D'autre part, 4 souches présentent des CMI et SCMI ayant 8 $\mu\text{g/ml}$ et 64 $\mu\text{g/ml}$ respectivement et seulement une souche présente des CMI et SCMI de 4 $\mu\text{g/ml}$ et 32 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Par contre, 2 souches ont des CMI et SCMI inchangées (16 $\mu\text{g/ml}$).

Ces résultats mettent en évidence l'augmentation de la résistance à l'amphotéricine B de *Candida albicans* ainsi que l'amplification de celle-ci sur les cellules sessiles par rapport aux cellules planctoniques, ils vont dans le même sens que ceux de Perumal et coll., (2007) qui ont montré qu'à haute densité cellulaire, les cellules planctoniques de toutes les souches testées de *Candida albicans* ont montré une sensibilité réduite de 80 % vis-à-vis de l'AmB par rapport à leurs homologues sessiles qui développent une tolérance à des concentrations élevées d'agents antifongiques.

Par contre, selon Seneviratne et coll., (2008), l'augmentation de la concentration cellulaire de départ de 10^6 à 10^8 cellules/ml n'induit pas une augmentation significative de la CMI (elle passe de 0,23 $\mu\text{g/ml}$ à 0,93 $\mu\text{g/ml}$), toutefois, les SCMI, avec la même densité cellulaire au sein des biofilms étaient plus élevées (15 $\mu\text{g/ml}$ et 30 $\mu\text{g/ml}$).

Tableau N° 5 : CMI de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles des souches de références et isolées de *Candida albicans* avec l'inoculum de 10^8 cellules/ml.

Nombre de souches	CMI ($\mu\text{g/ml}$) d'AmB « cellules planctoniques »	SCMI ($\mu\text{g/ml}$) d'AmB « cellules sessiles »
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	32	32
<i>C. albicans</i> 444 IP	16	64
1	4	32
11	8	16
5	8	32
4	8	64
2	16	16
16	16	32

2.3. Détermination des SCMI au cours des phases de formation des biofilms

Sur le tableau N° 6 sont regroupés les résultats des tests de sensibilité à l'amphotéricine B₃ des cellules sessiles des souches de références et des souches isolées durant la formation des biofilms après :

- La phase d'adhésion (après 4 heures d'incubation)
- La phase intermédiaire (après 24 heures d'incubation)
- La phase de maturation (après 48 heures d'incubation)
- Les biofilms vieux (après 72 heures d'incubation)

Tableau N° 6 : SCMI de l'AmB vis-à-vis des souches de références et des souches isolées de *Candida albicans* durant la formation des biofilms.

Nombre de souches	SCMI (µg/ml) de l'AmB			
	4 h	24 h	48 h	72 h
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	1	2	8
<i>C. albicans</i> 444 IP	0,5	1	4	4
2	0,5	2	8	8
4	0,5	2	16	16
2	0,5	2	8	4
4	0,5	2	16	8
3	0,5	1	8	16
4	0,5	4	4	8
2	0,5	16	16	16
9	1	2	8	8
4	1	4	16	16
4	1	2	8	4
1	1	2	8	16

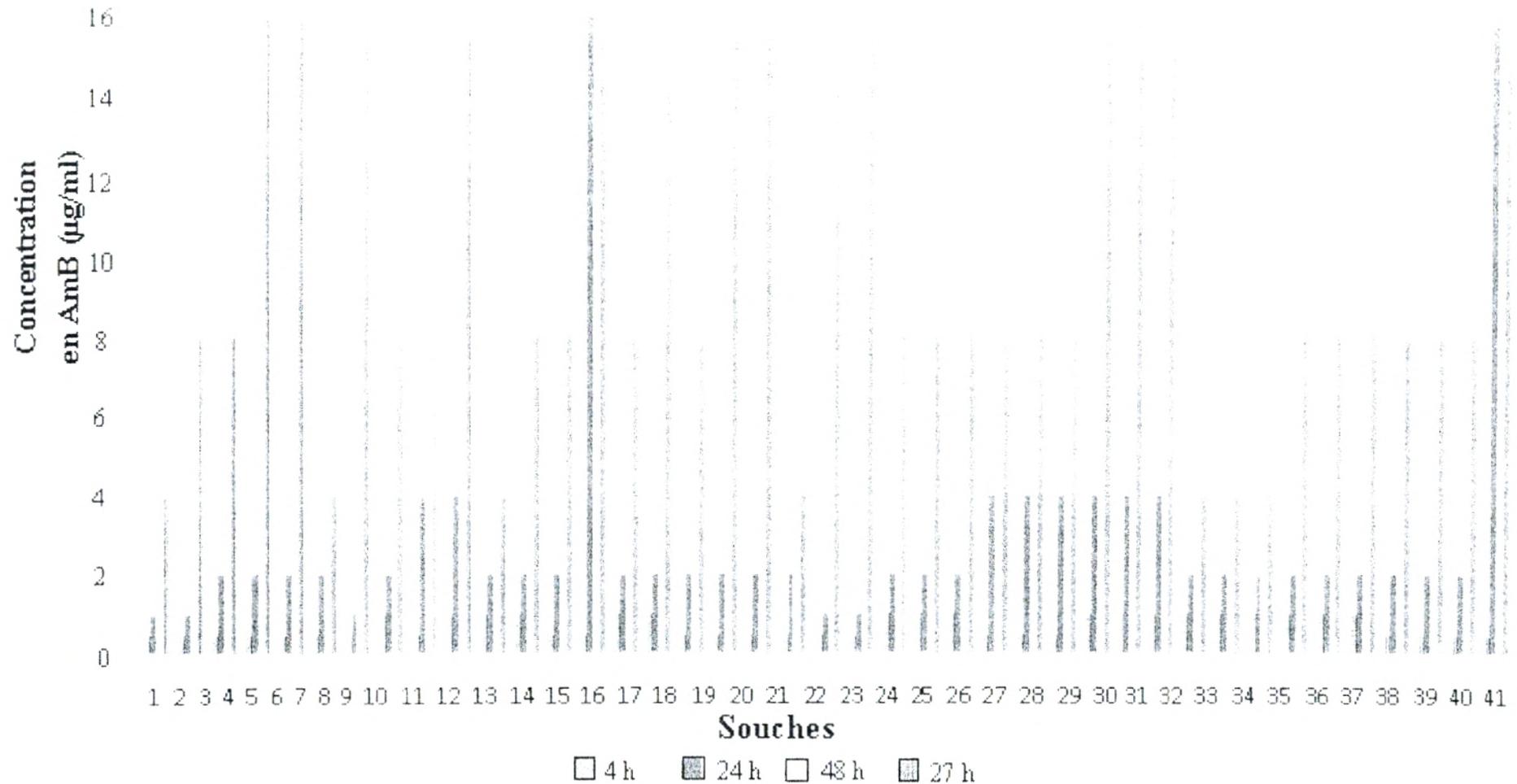


Figure N° 10 : Détermination des SCMI de l'AmB des souches de références et des souches isolées de *Candida albicans* durant les différentes phases de la formation des biofilms (de 1 à 41 numéro des souches, voir Annexe 1).

Les résultats que nous avons obtenus sont comparables à ceux de Lamfon et coll., (2004) qui ont observé que la sensibilité de *C. albicans* aux antifongiques est modifiée tout au long des différentes phases de développement du biofilm. Ce dernier devient plus résistant après la maturation (plus de 24 h). Ceci peut être dû, en partie, à la formation de la matrice exopolymérique qui, selon Ramage et coll., (2002b) et Al-Fattani et Douglas, (2006) contribue significativement à la résistance des biofilms de *Candida* aux médicaments, en particulier dans des conditions similaires à celles trouvées *in vivo* dans les infections des cathéters.

La matrice exopolymérique empêche la pénétration du médicament dans le biofilm et retarde ou limite sa diffusion, cette dernière dépend de la nature chimique de l'antifongique ainsi que celle de la matrice du biofilm. [(Mukherjee et Chandra, 2004), (Perumal et coll., 2007), (Subha et Gnanamani, 2008)]

D'après Ramage et coll., (2001b) la matrice extracellulaire est absente durant la phase initiale du développement des biofilms de *Candida albicans*, ce qui explique les faibles SCMI de l'AmB des souches testées à la phase d'adhésion (4 heures).

D'autre part, Mukherjee et coll., (2003) en examinant le contenu de la membrane, ont indiqué que le niveau des stéroïdes est modulé au cours de la formation du biofilm de *Candida albicans*. L'ergostérol est réduit dans la phase de maturité et intermédiaire du biofilm par rapport à la première phase, c'est pourquoi l'effet de l'AmB est réduit en phase mature des biofilms de *C. albicans*. De plus, les niveaux des stéroïdes au sein des biofilms de *C. albicans* à 6 h étaient semblables à ceux des cellules planctoniques.

Pour illustrer l'évolution de la résistance des souches isolées, nous avons calculé les moyennes des résultats des tests antifongiques regroupés sur le tableau N°6.

Ces moyennes sont calculées pour chaque phase du développement des biofilms. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure N°11.

La résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B augmente conjointement avec la formation du biofilm de *C. albicans*, mais après la phase de maturation (48 heures), elle s'accroît de manière secondaire par rapport aux phases précédentes.

Blankenship et Mitchell, (2006) soulignent que la résistance semble être régie différemment entre les biofilms de *Candida albicans* précoces et tardives.

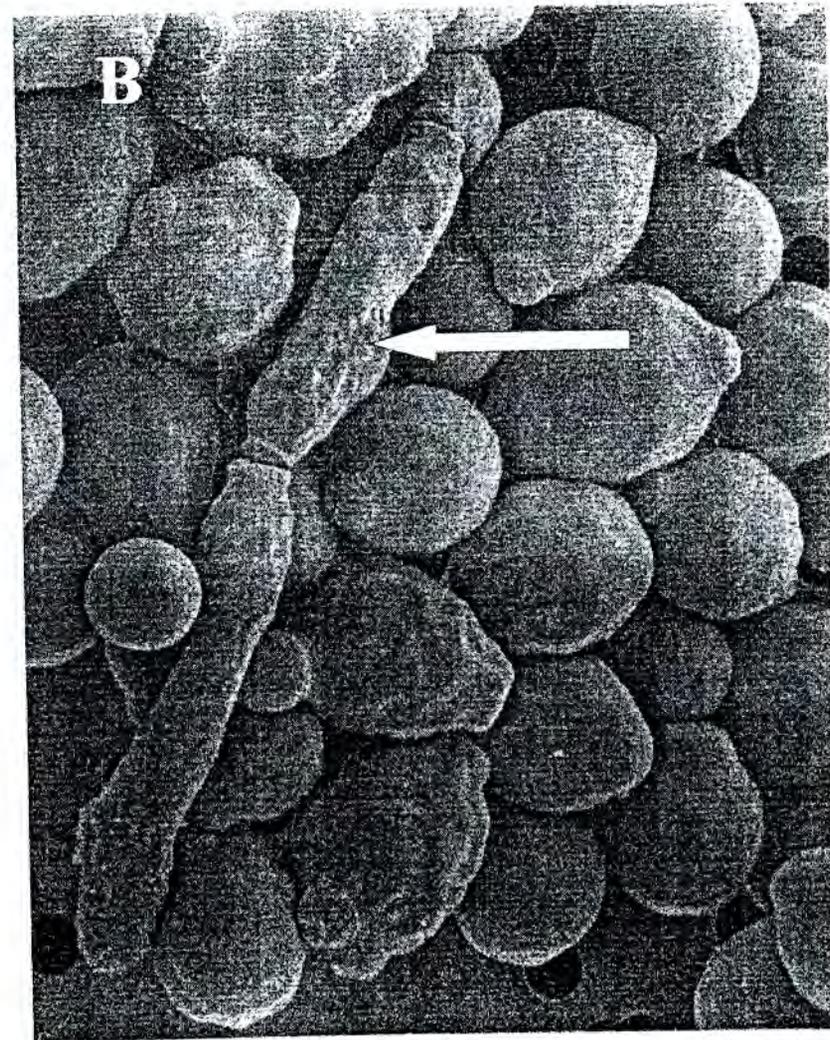
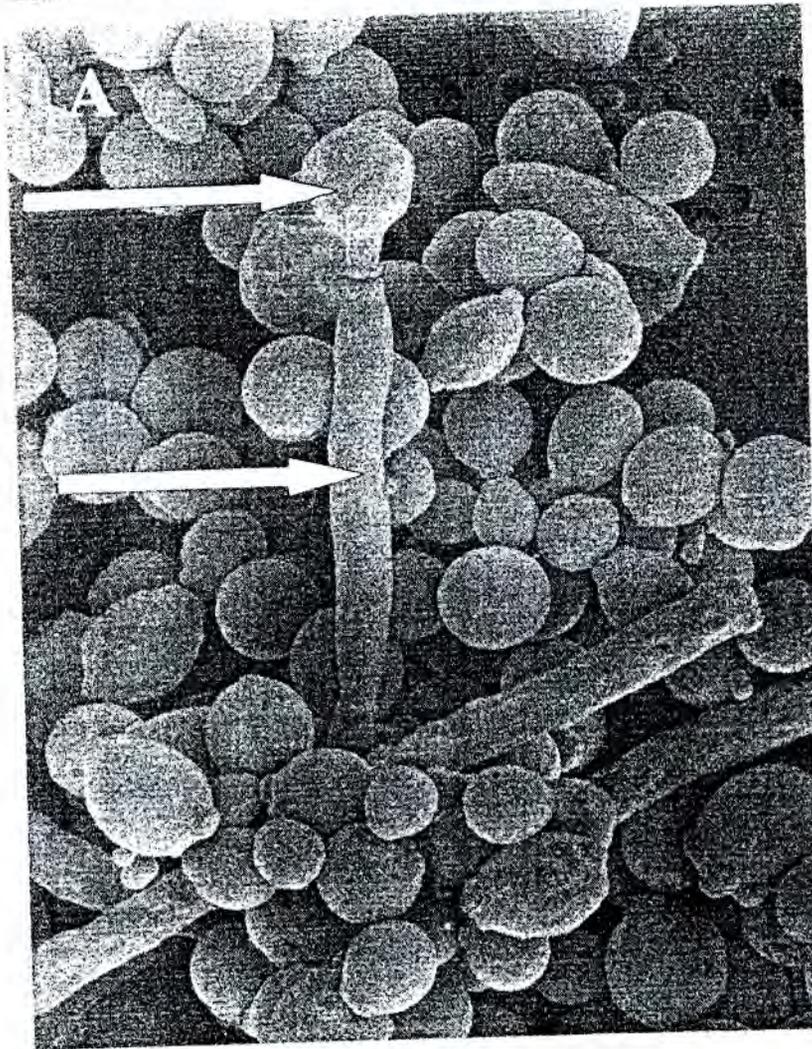


Fig. 2. Microscopie électronique à balayage des biofilms récupérés des souches (A) MIHKT4 et (B) GKT10 après leur immersion dans un milieu nutritif pendant une minute. Les flèches indiquent (A) unilarydospore et hypha et (B) pseudohypha (grossissements respectifs $\times 4,000$ et $\times 3,000$).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Baillie et Douglas, (1999), Kumamoto, (2002) et Kuhn et coll., (2002a) qui signalent qu'au microscope électronique, la couche basale des biofilms de *C. albicans* est constituée de cellules de levure, de plus, cette couche a un rôle important dans l'ancrage du biofilm à la surface des cathéters. Les cellules de *C. albicans* adhèrent à la surface des cathéters après l'installation d'une fine couche des protéines de l'hôte. [(Douglas, 2002), (Douglas, 2003), (Yeater et coll., 2007), (Soll, 2008)]

Quelle que soit la voie par laquelle les germes s'implantent sur le cathéter, ils vont dans un premier temps coloniser la plaque de fibrine qui se dépose sur la portion intra-vasculaire du cathéter, dont certains produisent et s'entourent d'une matrice exopolymérique. Ce manchon de fibrine est constant, quel que soit le type de cathéter. [(Albanese et Durbec, 1992), (Quinet, 2006)]

Sur la photo N° 2 sont montrés les biofilms récupérés des souches : MIHKT4 (A) et GKT10 (B) après leur agitation au vortex pendant une minute.

Nous distinguons, une dense couche de cellules de levure qui s'est détachée des surfaces des cathéters avec la formation des hyphes et de chlamydospore (photo N° 2A), et de pseudohyphes (photo N° 2B).

Rappelons que *Candida albicans* peut exister sous forme de levure, hyphes ou pseudohyphes dans un biofilm mature. [(Baillie et Douglas, 1998), (Allem et coll., 2006), (Saidi et coll, 2006)]

Chez *C. albicans*, les conditions environnementales régissent la formation de chlamydospores. Le farnésol, qui inhibe la formation des filaments, stimule également la formation de chlamydospores, indiquant que le quorum sensing peut également avoir un rôle positif quant à la formation des biofilms. [(Lo et coll., 1997), (Enjalbert et coll., 2005), (Martin et coll., 2005)]

Des études récentes ont révélé l'implication du gène EFG1 dans la formation de biofilms de *Candida albicans*, en outre, la formation de chlamydospores est également tributaires des Efg1. [(Ramage et coll., 2002c) (Biswas et coll., 2007)]

De plus, Citiulo et coll., (2009) indiquent que les chlamydospores sont des structures qui peuvent être viables *in vivo*. Âgés de 5 à 15 jours, ils peuvent produire des chlamydospores filles, des blastospores ainsi que des hyphes et pseudohyphes.

Les infections nosocomiales d'origines bactériennes liées aux implants médicaux, notamment les cathéters, font l'objet d'intenses recherches depuis longtemps laissant dans l'ombre les infections d'origines fongiques et plus particulièrement celles causées par *Candida albicans*.

L'importance de mener notre étude à l'hôpital Chabane Hamdoune de Maghnia (Algérie) était d'évaluer le taux de contaminations des cathéters et des sondes par la levure *Candida albicans*, de vérifier son pouvoir à former des biofilms et de tester sa résistance vis-à-vis de l'amphotéricine B, traitement de première ligne des mycoses systémiques ou généralisées.

Il ressort de notre étude que sur les 301 prélèvements effectués, 51 souches de *Candida albicans* ont été isolées, soit un taux de 16,94 %. Elles se répartissent dans les différents services comme suit : chirurgie générale, gynécologie et réanimation 15, 12 et 11 souches respectivement, alors que dans les services de pédiatrie et de médecine interne, 7 et 6 souches ont été, respectivement, isolées.

Chez 39 souches de *Candida albicans* isolées, le pouvoir de la formation des biofilms est considéré comme positif, la gravité que peut présenter les contaminations des cathéters et des sondes par cette levure est accentuée par la réponse insignifiante des biofilms à l'amphotéricine B. en effet, les cellules sessiles de *Candida albicans* (formant des biofilms) sont plus résistantes que leurs congénères planctoniques (16 µg/ml pour les premières contre 0,5 µg/ml pour les secondes).

Cette résistance augmente conjointement avec :

- 1- L'augmentation de la concentration cellulaire de départ (4 fois plus élevée en passant de la densité cellulaire de 10^6 à 10^8 cellules/ml).
- 2- Les différentes phases de développement des biofilms (de 0,73 µg/ml « phase d'adhésion » à 10,46 µg/ml « phase de maturation »).
- 3- Le renouvellement du milieu de culture.

En fin, les images de la microscopie électronique de deux cathéters contaminés mettent en évidence la formation des biofilms par la levure *Candida albicans* sur les parois internes de ces cathéters.

- 50 - Éloy O., Blancb V., Pina P., Gaudart A., Bressolle M.-L., Plainvert C., Decousser J.-W., Pangon B., Allouch P.-Y. (2006) le Collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH). Épidémiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique ColBVH. *Pathologie Biologie* ; 54 : 523 - 530.
- 51 - Enjalbert B., Smith D. A., Cornell M. J., Alam I., Nicholls S., Brown A. J. P. and Quinn J. (2005) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* ; 17 : 1018 - 1032.
- 52 - Ernst E.J., Rogers P.D. (2005) *Methods in Molecular Medicine. Antifungal Agents : Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey, *Humana Press* ; 1543 - 1894.
- 53 - Figueroa-Damián R., Ortiz-Ibarra F.J. and Arredondo-García J.L. (1994) Nosocomial infections of gynecologic-obstetrical origin at a perinatal care hospital. *Salud Publica Mex* ; 36 (1) : 10 - 16.
- 54 - 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.
- 55 - Garcia-Sánchez S., Aubert S., Iraqui I., Janbon G., Ghigo J.-M. and d'Enfert C. (2004) *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns, *Eukaryotic Cell* ; 3 (2) : 536 - 545.
- 56 - Gauzif R. et col. (2003) faut-il traiter et comment traiter les candidoses en réanimation. ?. *Presse Med.* 32 (15/03/03) 440 - 449. In revue française des laboratoires N° 352
- 57 - Girou E. (2008) Comment diminuer en pratique les infections nosocomiales en réanimation ? *Réanimation* ; 17 : 275 - 279.
- 58 - Gold, W., Stout H. A., Pagano J. F. and Donovick R. (1956). Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by streptomycete. I. *In vitro* studies. *Antibiotics Annu* ; 3 : 579-586.
- 59 - Goldmann D. A and Pier G. B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin. Microbiol. Rev* ; 6 : 176 - 192
- 60 - Gouin F. et Viggiano M. (1996) Candidoses systémiques : épidémiologie et diagnostic. *Rean. Urg* ; 5 (4) : 7 - 11.
- 61 - Hammond S. M. (1977) Biological activity of polyene antibiotics. *Prog. Med. Chem* ; 14 : 105 - 283.
- 62 - Haras D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques* ; 93 : 27 - 41.

- 63 - Harding M. W., Marques L. L. R., Howard R. J. and Olson M. E. (2009) Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology* ; 17 (11) : 475 - 480
DOI:10.1016/j.tim.2009.08.007
- 64 - 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.
- 65 - Hawser, S. P. and Douglas L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 39 : 2128 - 2131.
- 66 - Haynes K. (2001) Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology* ; 9 (12) : 591 - 596
- 67 - Hennequin C. (1996) Epidémiologie des mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien. *Rev Méd Interne* ; 17 : 754 - 760.
- 68 - Hogan D. A. (2006a) Quorum Sensing: Alcohols in a Social Situation. *Current Biology* ; 16 (12) : 457 - 458. DOI : 10.1016/j.cub.2006.05.035.
- 69 - Hogan D. A. (2006b) Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi, *Eukariotic Cell* ; 5 (4) : 613 - 619.
- 70 - Hogan D. A. and Kolter R. (2002) *Pseudomonas-Candida* Interactions: An Ecological Role for Virulence Factors. *Science* ; 296 : 2229 - 2232.
- 71 - 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, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 47 (7) : 2366 - 2369.
- 72 - Hot A., Mittaine B. and Dupont B. (2007) Infections fongiques invasives du grand prématuré. *Journal de Mycologie Médicale* ; 17 : 33 - 41.
- 73 - Irie Y. and Parsek M. R. (2008) Quorum Sensing and Microbial Biofilms, *Current Topics in Microbiology and Immunology* ; 322 : 67 - 84
- 74 - Jabra-Rizk M. A., Falkler W. A. and Meiller T F., (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance, *Emerging Infectious Diseases* ; 10 (1) : 14 - 19.
- 75 - Jain N., Hasan F. and Fries B.C. (2008) Phenotypic Switching in Fungi, *Current Fungal Infection Reports* ; 2 : 180 - 188
- 76 - 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 (6) : 1697 - 1703.

- 147 - Timsit J.-F., Wolff M., Mourvillier B., Schortgen F. et Régnier B. (2003) Diagnostic et prise en charge des infections sur cathéter en réanimation. *Médecine et maladies infectieuses* ; 33 : 619 - 627.
- 148 - Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi 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 (6) : 1843 - 1850. DOI : 10.1128/JCM.00131-07.
- 149 - Veyssier P., Domart Y. et Liebbe A. M. (1998) Infections nosocomiales, Masson 2^{ème} édition. Paris
- 150 - Vincent J. L., Bihari D. J., Suter P. M., Bruining H. A., White J., Nicolas-Chanoin M. H., Wolff M., Spencer R. C. and Hemmer M. (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study. *JAMA* ; 274 : 639 - 644.
- 151 - Walther A. and Wendland J. (2008) Hyphal Growth and Virulence in *Candida albicans*, *Human and Animal Relationships* ; 2nd Edition, The Mycota VI
- 152 - 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 (5) : 1859 - 1861. DOI : 10.1128/AAC.01646-07.
- 153 - 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, Cambridge University Press. DOI : 10.1017/S1479050505001687
- 154 - Whitehead K. A. and Verran J. (2006) The effect of surface topography on the retention of microorganisms, *Food and Bioprocess Processing* ; 84 (C4) : 253 - 259. DOI : 10.1205/fbp06035.
- 155 - Williams P. and Cámara M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology* ; 12 : 1 - 10. DOI : 10.1016/j.mib.2009.01.005
- 156 - Wimpenny J. W. T. and Colasanti R. (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbial Ecol* ; 22 : 1 - 6.
- 157 - 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. DOI : 10.1099/mic.0.2007/006163-0.

Sixième partie :

ANNEXES

Annexe 2 : résultats des tests antifongiques de l'AmB vis-à-vis des souches de références et des souches isolées.

	Inoculum (cellules / ml)	CMI selon Ramage et coll., (2001a)								
		CMI selon NCCLS M27-A		Milieu de culture non renouvelé				Milieu de culture renouvelé		
		2,5×10 ³	1×10 ⁸	1×10 ⁶				1×10 ⁸	1×10 ⁶	1×10 ⁸
Phase du biofilm (heures)	-	-	4	24	48	72	48	48	48	
1	<i>Candida albicans</i> 444 IP	0,5	16	0,5	1	4	4	64	8	64
2	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5	32	0,5	1	2	8	32	4	64
3	RFS9	0,5	16	0,5	2	8	8	32	16	64
4	RHS1	1	16	0,5	2	16	16	32	16	64
5	GKT10	1	16	0,5	2	16	16	32	32	64
6	MIFKT2	1	16	0,5	2	8	4	16	8	64
7	GKT8	0,5	8	0,5	1	8	16	16	16	64
8	CFKT4	1	8	1	2	8	8	32	8	64
9	CHSN2(L)	0,5	8	0,5	4	4	8	16	8	64
10	GS1	2	16	1	4	16	16	32	16	32
11	MIHKT(VIH1)	0,5	16	1	2	8	4	32	16	64
12	CHSD(L)	0,5	8	1	2	8	8	16	8	64
13	MIHKT4	1	8	0,5	2	16	8	64	32	64
14	RHS2	2	8	0,5	16	16	16	32	16	64
15	GKT11	1	16	1	2	8	8	32	16	64
16	CFKT2	0,5	16	1	2	8	16	32	16	64
17	GKT5	0,5	16	0,5	2	8	8	32	16	64
18	RHS2	1	16	0,5	2	16	16	32	16	64
19	PKT2	1	16	0,5	2	16	16	32	32	64
20	CHL2(SN)	1	16	0,5	2	8	4	16	16	64
21	CHL(SD)	0,5	8	0,5	1	8	16	16	8	64
22	GKT4	0,5	8	0,5	1	8	16	16	16	64
23	PKT5	1	8	1	2	8	8	32	8	64

24	GKT2	1	8	1	2	8	8	32	8	64
25	CHD(SN)	1	8	1	2	8	8	32	16	64
26	GKT9	0,5	8	0,5	4	4	8	16	8	64
27	MIFKT3	0,5	8	0,5	4	4	8	16	8	64
28	RFS10	0,5	8	0,5	4	4	8	16	8	64
29	RFS3	2	16	1	4	16	16	32	16	32
30	PKT1	2	16	1	4	16	16	32	16	32
31	RHS5	2	16	1	4	16	16	32	16	32
32	CHSN1	0,5	16	1	2	8	4	32	16	64
33	RFS11	0,5	16	1	2	8	4	32	16	64
34	CHL(SN)	0,5	16	1	2	8	4	32	16	64
35	GKT6	0,5	8	1	2	8	8	16	8	64
36	PKT3	0,5	8	1	2	8	8	16	16	64
37	CFKT5	0,5	8	1	2	8	8	16	8	64
38	MIFKT1	1	8	0,5	2	16	8	64	32	64
39	RHKT1	1	8	0,5	2	16	8	64	32	64
40	PKT7	1	8	0,5	2	16	8	64	32	64
41	CHSN(L)	2	4	0,5	16	16	16	32	16	64
42	RFKT2	0,5	8	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1
43	GKT1	1	16	0,5	1	0,5	1	4	1	2
44	CHL	1	4	0,5	1	1	1	2	1	2
45	PKT4	1	8	0,5	1	1	1	2	1	2
46	CHKT6	1	8	0,5	0,5	0,5	1	2	1	2
47	CFKT3	0,5	4	0,5	0,5	0,5	0,5	2	1	2
48	MIHKT5	0,5	4	0,5	1	1	0,5	4	1	2
49	GKT7	0,5	16	0,5	0,5	0,5	1	1	1	2

❖ Les concentrations minimales inhibitrices sont exprimées en µg/ml

❖ G : gynécologie, R : réanimation, C : chirurgie générale, MI : médecine interne, P : pédiatrie.

❖ H : homme, F : femme.

❖ KT : cathéter, S : sonde urinaire, SN : sonde nasale, SD : sonde de drainage, L : lame de drainage.

Annexe 3 : préparation de la solution PBS, pH = 7,4.

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_2HPO_4 : 10 mM (di-sodium hydrogénophosphate)
- KH_2PO_4 : 1.76 mM (di-hydrogénophosphate)

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

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